

**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

TELMO AGUSTÍN MEJÍA GARCÍA

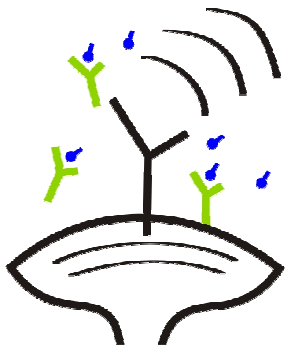
**MODULAÇÃO DA VIA DA PI3K/AKT EM CULTURA DE
CÉLULAS DE RETINA: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E
VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR CÁLCIO-
CALMODULINA.**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM NEUROIMUNOLOGIA

Orientador: Dr. Roberto Paes de Carvalho

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMINOLOGIA**

TELMO AGUSTÍN MEJÍA GARCÍA

MODULAÇÃO DA VIA DA PI3K/AKT EM CULTURA DE CÉLULAS DE RETINA: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E VIAS DE SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR CÁLCIO- CALMODULINA

Niterói, 27 de novembro de 2008.

Prof. Dr. Jamil Assreuy – UFSC.

Profa. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo – UERJ.

Profa. Dra. Ana Lúcia Marques Ventura – UFF.

(Revisor e Suplente) Prof. Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira – UFF.

(Orientador) Prof. Dr. Roberto Paes-de-Carvalho- UFF.

Mejía García, Telmo Agustín

Modulação da via da PI3K/AKT em células de retina em cultura: papel do óxido nítrico e vias de sinalização mediada por cálcio-calmodulina./ Telmo Agustín Mejía García. Niterói: UFF, 2008. XIV, 163f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paes de Carvalho.

Tese (Doutorado) – UFF/Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia, 2008.

Referências Bibliográficas:

1.NO. 2. AKT/PKB. 3. Retina. 4. L-ARG. 5. CHX. 6. ANIS. 7. Translocação nuclear.
I. Paes-de-Carvalho, R. II. Universidade Federal Fluminense,
Programa de Pós-graduação Neuroimunologia. II. Título.

TELMO AGUSTÍN MEJÍA GARCÍA

**MODULAÇÃO DA VIA DA PI3K/AKT EM CULTURA DE CÉLULAS
DE RETINA: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E VIAS DE
SINALIZAÇÃO MEDIADAS POR CÁLCIO-CALMODULINA**

Trabalho desenvolvido no laboratório de Neurobiologia Celular do
Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF.

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Neuroimunologia, da
Universidade Federal Fluminense, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do título
de Doutor em Neuroimunologia.

Orientador: Dr. Roberto Paes de Carvalho

**NITERÓI
2008**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Programa de Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob orientação do Prof. Roberto Paes de Carvalho e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pelo Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

“Quem começa com certeza, terminará com dúvidas, mas quem se contentar em começar com dúvidas, poderá terminar com certeza” Sir Francis B.

Dedico este trabalho de tese a minha querida família: meus pais Anderson Bermudes e María Graciela, e aos meus irmãos: Bulmer e Ericka María.

AGRADECIMENTOS

Registro aqui, acima de tudo, meu sincero agradecimento ao bondoso Pai Celestial, que me criou e me concedeu a oportunidade, aqui no Brasil, para continuar os meus estudos de pós-graduação. Deus seja honrando e glorificado eternamente por todas as criaturas da terra. Assim diz o Senhor Deus:

“Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem o forte, na sua força, nem o rico, nas suas riquezas; mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me conhecer e saber que eu sou o Senhor Deus e faço misericórdia, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o Senhor”.

(Jer.9:23-24)

Ao Prof. Roberto Paes de Carvalho, meu orientador, pelo acompanhamento acadêmico em todos os momentos deste trabalho. A confiança e apoio de um bom amigo. Muito obrigado!.

À minha querida família: meu pai, Anderson e minha mãe, Maria Graciela, que sempre me estimularam a seguir em frente incondicionalmente. Orando dia-a-dia para que eu consiga alcançar o alvo fixado e seus bons conselhos através da palavra inspirada.

Aos meus queridos irmãos Bulmer e Ericka que me acompanharam até na dissertação final de doutorado.

A minha querida Roxana, pessoa como ela não existe na vida (vc é mil, viu?) por seu carinho incondicional, o amor de toda a vida. Por isso e muitas coisas mais: Te amo!.

Agradeço em forma especial aos companheiros do laboratório que fizeram parte desta etapa do meu desenvolvimento profissional. A amizade, inteligência e alegria de vocês, desde os mais antigos e mais recentes. A todos em geral. Obrigado!.

À prof.^a Elizabeth Giestal de Araújo pela simpatia e seu jeitinho meigo de colocar as coisas, ao incentivo e conhecimento oferecido.

A todos os professores do curso de Neuroimunologia, Chico, Gawri, Tereza, Isabel, Cláudio, Ana, Karin e Paulinha pela dedicação para ensinar tudo que eu queria e precisava aprender.

A Elaine C. B. Coelho e Luzeli Ribeiro de Assis (amiga de sempre) pelo apoio técnico, a eficiência e boa vontade que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa ProcaD que contribuiu através de auxílios concedidos e colaboração com o professor Marco A. Máximo Prado por sua boa vontade e competência técnica na realização das imagens de imunofluorescência e a todos os alunos e estagiários do laboratório de neurofarmacologia da UFMG pela receptividade e ajuda prática.

Ao professor Luiz Leão Roberto pela competência e boa vontade com que revisou este trabalho de tese.

RESUMO

Estudos prévios têm demonstrado que o óxido nítrico (NO), produzido a partir do doador SNAP, inibe a apoptose em cultura purificada de neurônios de retina através de um mecanismo dependente de GMP-cíclico, ativação da PKG, e também envolvendo várias proteínas cinases como PI3K, MEK, PKA, e CaMKs. A via da PI3K/AKT e NO são importantes sinalizadores envolvidos na sobrevivência celular que também apresentam um papel importante na plasticidade do Sistema Nervoso central (SNC). O propósito do presente estudo foi determinar o papel de NO endógeno, advindo da L-ARG ou do NO exógeno, advindo do SNAP, na modulação do nível de fosforilação da AKT/PKB em células de retina em cultura. Culturas preparadas a partir de embriões de galinha de 8 dias foram tratadas ou não com SNAP ou L-ARG e em seguida determinados os níveis de fosforilação da AKT/PKB no sítio da Serina-473 ou Treonina-308. Nossos resultados demonstram que SNAP e L-ARG promovem aumento da fosforilação da AKT/PKB de modo concentração e tempo dependente, através da ativação da Guanilil ciclase solúvel (GC-solúvel). Este efeito foi bloqueado com ODQ ou LY83583 e foi mimetizado por 8Br-GMP cíclico, um ativador da PKG, ou YC-1, um ativador da GC-solúvel. NO entanto, o efeito do NO foi bloqueado por LY294002, Wortmannin, KN93 ou KN62, sugerindo a participação das vias da PI3K e das CaMKs respectivamente. De modo interessante, o pré-tratamento com EGTA, BAPTA ou tapsigargina (TPG), quelantes de cálcio, ou Trifluorperazina (TRF) e W-7, inibidores de calmodulina, foi capaz de bloquear o efeito de SNAP e L-ARG. Estes dados sugerem que o efeito depende de um aumento de cálcio intracelular e dependência de calmodulina. O NO exógeno (SNAP) ou endógeno (L-ARG) promovem o influxo de cálcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) através de canais de cálcio tipo L. Por outro lado, a ativação de receptor de glutamato do tipo NMDA induz a fosforilação da AKT/PKB de modo mimetizado por inibidores da síntese de proteínas (CHX ou ANIS). Esses inibidores aumentam o “pool” intracelular de L-ARG e promovem a síntese de NO. Um resultado adicional mostra que o tratamento com SNAP ou L-ARG promove a translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo. Concluímos que o NO de origem exógena ou endógena modula o nível da fosforilação da AKT/PKB nas culturas de retina de galinha.

SUMMARY

Previous studies have shown that nitric oxide (NO), produced from the NO donor S-nitroso-Acetyl-D-L-Penicillamine (SNAP), inhibits apoptosis of purified retinal neurons in cultured through a cGMP/PKG-dependent mechanism also involving multiple kinase pathways including PI3K, MEK, PKA and CaMKs. The PI3K-AKT pathway and NO are important molecules with neuronal survival-promoting properties and which have shown to play an important role in plasticity associated with CNS development. The purpose of this study was to explore whether endogenous NO produced from L-ARG or exogenous NO from NO donor SNAP exerts its vital effects by activating the AKT protein kinase in cultures of chick retinal neurons. Cultures prepared from 8 day-old-chick embryo retinas were treated or not with SNAP or L-ARG and processed for the detection of AKT phosphorylation levels on Ser-473 and Thr-308 sites.

Our results demonstrate that either SNAP or L-ARG lead to enhanced AKT phosphorylation in a concentration and time-dependent manner through the activation of soluble guanylyl cyclase. The effect was blocked by the enzyme inhibitors ODQ or LY83583, and mimicked by 8-Bromo cyclic GMP, a PKG activator or YC-1, a guanylyl cyclase activator. In addition, the effect of NO was also suppressed by LY294002, Wortmannin, KN93 or KN62, respectively indicating the involvement of phosphatidylinositol 3 kinase and calcium calmodulin-dependent protein kinase signaling pathways. Interestingly, pre-treatment by EGTA, a calcium chelator, or BAPTA-AM or Tapsigargin, intracellular calcium chelators, or Triflorperazine or W-7, calmodulin inhibitors, also abrogated the effects of SNAP or L-ARG. This revealed that the phosphorylation of AKT/PKB is mediated by calcium influx from extracellular medium and a calmodulin-dependent mechanism. NO from L-ARG or SNAP promoted Ca^{2+} -influx through L-type Ca^{2+} channels. Furthermore, we found that NMDA receptor activation stimulates AKT/PKB and can be mimicked by cycloheximide or anisomycin (CHX, ANIS), two inhibitors of protein synthesis, and a consequent increase of an intracellular L-ARG pool available for NO synthesis. An additional result shows that activated AKT/PKB was translocated from cytoplasm to nucleus upon stimulation with SNAP or L-ARG. We then conclude that generation of endogenous or exogenous NO participates in the activation of AKT protein kinase in retinal neurons.

LISTA DE ABREVIATURAS

FAD: Flavina nuclotídeo
ERK: Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
eNOS : Óxido nítrico sintase endotelial
EEAT1: Transportador de aminoácidos excitatórios 1
EDRF: fator de relaxamento derivado do endotélio
E8: dia embrionário, ex.: E8 oitavo dia embrionário
DNA: Ácido desoxirribonucleico
CREB: Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc
CaMKIV: Proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina IV
CAMKII: Proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina II
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
AMPc: 3' 5' monofosfato de adenosina
AMPA: Receptor AMPA
AMPA/KaR: Receptores AMPA e Kainato
AMPA: α - amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
KA: Kainato
JNK: Cinase da região N-terminal de c-jun
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
iGluR: Receptor ionotrópico de glutamato
Heme: Protoporfirina férrica
HB₄: Tetrahidrobiopterina
GSK3 β : Glicogênio sintase cinase 3 β
Gs: Proteína G estimulatória
GMPc: 3' 5' monofosfato cíclico de guanosina
GluR: Receptor de glutamato
GCs: Guanilil ciclase solúvel
GABA: Ácido gama aminobutírico
FMN: Flavina mononucleotídeo
L-AP4: L-2-amino-4-fosfonobutirato
MAPKs: Proteínas cinases ativadas por mitógenos
mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato
MK801: 5-metil-10,10-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina
NADPH: Nicotinamida dinucleotídeo
NFKB: Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
NMDA: N-metil-d-aspartato
NMDAR: Receptor NMDA
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NO⁻: Ânion nítróxido
NO: Óxido nítrico
NO⁺: Cátion nitrosênio
NOS: Óxido nítrico sintase
ONOO⁻: Peroxinitrito
OH[.]: Radical hidroxila
ODQ: 1h-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3,a]quinoxalina-1
O₂⁻: Ânion superóxido
PLC: Fosfolipase C
PKG: Proteína cinase dependente de GMPc
PKC: Proteína cinase C
PKA: Proteína cinase dependente de AMPc

PI3K: Cinase dependente de fosfatidilinositol-3
PC12: Células de feocromocitoma
P90: ver RSK
PSD95: Proteína de densidade pós-sináptica
Q1: Domínio rico em glutamina 1
RSK: Cinase ribossomal s6
Ras: Proteína GTPase monomérica
SNC: Sistema nervoso central
SNAP: S-Nitroso-N-acetil-penicilamina
TGF β : Fator de transformação tumoral β
Trk: Cinase relacionada à tropomiosina
RTC: Receptor tirosina cinase.

INDICE

	Página
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	
1.1. A Retina	1
1.2. Glutamato como Neurotransmissor no SNC	7
1.3. Receptor de NMDA	8
1.4. A L-Arginina	12
1.5. Óxido Nítrico	12
1.6. Papel do NO na Retina	20
1.7. A via da PI3K/AKT	22
1.8. A via da AKT/PKB e NO	26
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Materiais	29
3.2. Culturas mista	29
3.3. Cultura purificada de Neurônios	30
3.4. Cultura de PC12 e SN56	30
3.6. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	31
3.7. Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)	32
3.8. Fragmentação de DNA	33
3.9. Western blot	33
3.10. Ensaio de Captação de Cálcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$)	35

3.11. Quantificação de Nitrito (Reação de Griess)	35
3.12. Imunocitoquímica	36
4. RESULTADOS	
4.1. Células de retina em cultura tratadas com salina Hank's por 24 hrs.	37
4.2. SNAP, doador de NO exógeno promove a fosforilação da AKT/PKB	41
4.3. Efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB está associado com GMPc	46
4.4. Tratamento com Tratamento com L-ARG mimetiza o efeito de NO	50
4.5. Formação do NO endógeno via ativação da nNOS na AKT/PKB	53
4.6. A fosforilação da AKT/PKB induzida por Glutamato	56
4.7. Fosforilação da proteína cinase AKT/PKB por NO requer de Ca ²⁺	60
4.8. Fosforilação da AKT/PKB por quelantes intracelulares de Ca ²⁺	65
4.9. Inibidores de calmodulina (CAM) regulam a fosfo-AKT/PKB	70
4.10. Proteína cinases dependentes de Ca ²⁺ -CaM e fosfo-AKT/PKB	72
4.11. Tirosina cinase Src na fosforilação da AKT/PKB por NO	76
4.12. NO fosforila a proteína cinase Src ^{Tyr-416}	79
4.13. A via da PI3K participa na fosforilação da AKT/PKB por NO	83
4.14. H ₂ O ₂ mimetiza o efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB	86
4.15. Inibidores da síntese de proteínas (CHX e ANIS) na P-AKT	92
4.16. Inibição da NOS com L-NAME inibe o efeito de CHX e ANIS	96
4.17. A via de sinalização de NO na fosforilação da AKT/PKB e ERK ½	99
4.18. NO na translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo	102
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

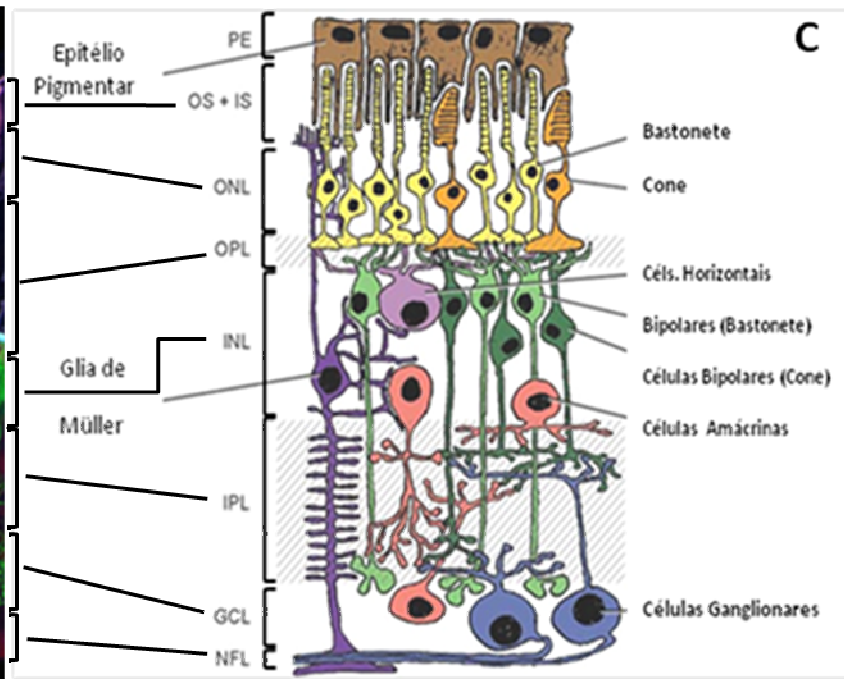
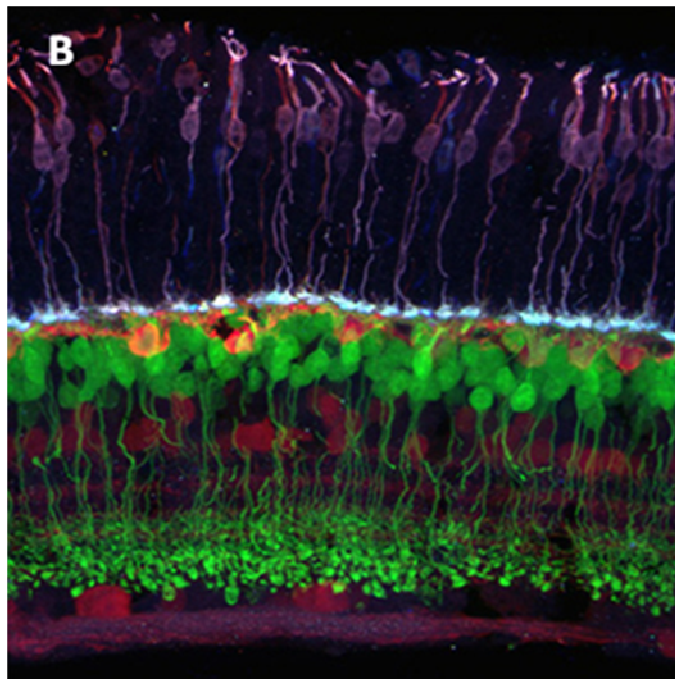
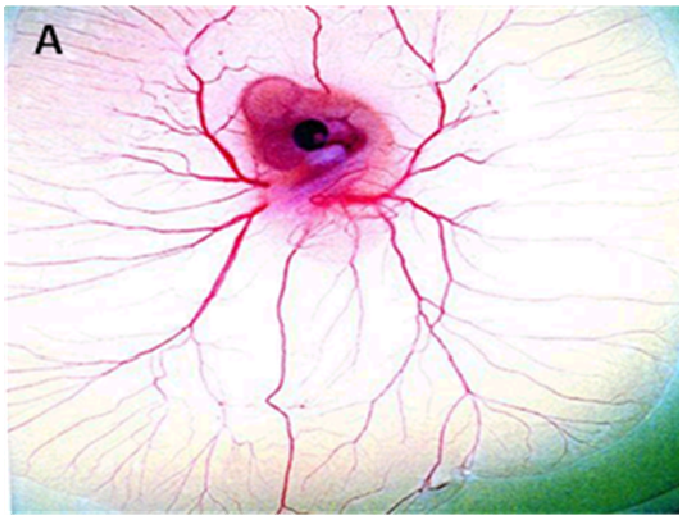
1. INTRODUÇÃO

1.1. A RETINA

Embora todas as partes do olho sejam importantes para perceber a informação visual, a retina é certamente a parte mais importante do sistema visual. Trinta e oito por cento de fibras cérebro-aférentes pertencem ao sistema visual, o que justifica o papel predominante deste sistema sensorial na percepção humana (Gerhart e Kirchner, 1997 para revisão). A retina é essencialmente uma porção do sistema nervoso que é projetado externamente do cérebro com o fim de receber os feixes de luz provenientes do mundo externo. Desde as primeiras descrições de Cajal, a retina tem sido utilizada em numerosos estudos, tais como arquitetura neuronal, circuitaria sináptica e correlações entre estrutura e função (Spence e Robson, 1989).

Em decorrência de sua organização celular muito bem definida, o estudo das funções neuronais neste modelo é muito explorado tanto em períodos precoces quanto tardios do desenvolvimento. A retina é constituída de uma fina camada de tecido nervoso localizada na parte posterior do globo ocular. Uma vantagem importante da retina é a possibilidade de cultivar suas células dissociadas (neurônios e/ou células gliais) *in vitro* onde, os contatos sinápticos e as funções neuroquímicas são restabelecidos de forma similar ao que acontece “*in vivo*” (de Mello, 1980).

A organização celular da retina é muito bem definida e consiste de cinco camadas principais: três compostas de corpos celulares e duas de prolongamentos (esquema 1). Na camada mais externa, isto é, mais próxima ao epitélio pigmentar, está o segmento externo dos fotorreceptores, células diferenciadas de forma a captar luz (fótons) e transduzir estímulos elétricos em variações de potencial de membrana.



Esquema 1: Estrutura da retina mostrando os tipos e as camadas celulares.

(A) Fotografia característica de embrião de galinha de E8. (B), Marcação por imunofluorescência dos tipos celulares na retina de vertebrado (adaptado de webvision.med.utah.edu/Fisher.html e (C), Representação esquemática da retina mostrando as disposições das camadas e os tipos celulares. (PE) Epitélio pigmentar, (OS+IS) Segmento externo dos fotorreceptores, (ONL) Camada nuclear externa, (OPL) Camada plexiforme externa, (INL) Camada nuclear interna, (IPL) Camada plexiforme interna, (GCL) Camada de células ganglionares, (NFL) Fibras do nervo óptico. (adaptado de Morgan J. e R. Wong (2008) e <http://wbmo.mpimf-eidelberg.mpg.de/~teuler/startpage.htm>).

Os sinais codificados por essas células são transmitidos através das células ganglionares aos centros visuais superiores, onde serão interpretados (Kolb, 1994 para revisão).

Os fotorreceptores se subdividem em cones e bastonetes que diferem em termos de morfologia e em sensibilidade à luz. Os cones são sensíveis à luminosidade mais intensa e têm os segmentos externos de forma cônica, sendo responsáveis pela visão cromática. Os bastonetes são responsáveis por uma visão noturna e acromática. Além disso, os bastonetes apresentam o segmento externo alongado, o que possibilita uma maior absorção de luz. A propagação de sinais na retina é modulada por interações celulares laterais. Assim, os fotorreceptores transmitem a informação para as células ganglionares, sendo esta via de transmissão mediada pelas células bipolares. A informação é modulada por aferências de células horizontais e amácrinas (Barnstable, 1995).

Limitando inferiormente a camada de fotorreceptores, está localizada a camada plexiforme externa, composta de processos neurais da camada nuclear interna e processos dos fotorreceptores. Na camada nuclear interna estão as células bipolares, que transmitem os sinais dos fotorreceptores até as células ganglionares (verticalmente), células horizontais e amácrinas, que transmitem o sinal neural horizontalmente.

A população de células gliais constitui-se de um tipo predominante chamado de células de Müller. Seus núcleos se encontram na região média da camada nuclear interna. Estas células dispõem-se radialmente, atravessando toda a retina desde a membrana limitante externa até a membrana limitante interna sendo, na verdade, ambas formadas pela expansão da membrana plasmática das células de Müller.

Após a camada nuclear interna, está localizada a camada plexiforme interna, contendo processos neurais que se projetam à camada ganglionar. Finalmente, as células

ganglionares emitem axônios que saem da retina e formam o nervo óptico, transmitindo os impulsos nervosos em forma de potenciais de ação a centros superiores para um posterior processamento da imagem (Kolb, 1994 para revisão).

A retina tem origem a partir da invaginação da vesícula óptica primária, dois ou três dias após a fecundação, formando a vesícula óptica secundária. A retina neural deriva da camada mais interna deste olho primitivo. A camada mais externa, em contato com o mesenquima circunvizinho, dá origem à esclera e coróides para constituir o epitélio pigmentar da retina (ERP).

O desenvolvimento completo da retina de pinto é concluído em aproximadamente três semanas e finalizado essencialmente na hora da eclosão (Hamburger e Hamilton, 1951). Embora a atividade elétrica possa ser registrada nos primeiros dias da formação da retina, um eletroretinograma em sua forma madura só é possível em E19 (Mey e Thanos, 2000 para revisão). A formação do globo ocular já é visível no primeiro dia após a fecundação (Hamburger e Hamilton, 1951), mas os primeiros estudos a respeito da histogênese da retina só foram desenvolvidos após o terceiro dia de fecundação (Coulombre, 1955; Kahn, 1974; Mishima e Fujita, 1978; Prada et al., 1979).

A retina desenvolve-se nas direções centro-periférica e dorso-ventral. Estudos feitos por Kahn (1974) na retina posterior, próxima às papilas ópticas, indicam que a maioria dos neurônios da retina fazem o ciclo mitótico entre o terceiro e quarto dia de incubação (E3 e E4) e a maioria dos fotorreceptores e células ganglionares começam a se diferenciar entre E3 e E5.

Entre E3 e E4 a retina neural se invagina e se une ao epitélio pigmentar formando a vesícula óptica com duas camadas. De E4 a E8 a área da retina é aumentada pela disposição de células nas margens da vesícula óptica. O espessamento da retina é feito pela adição de células à camada adjacente ao epitélio pigmentar. Entre E6 e E10 as

camadas da retina tornam-se diferenciadas, similares a observada em animais adultos. Em E6 nenhuma das camadas plexiformes está evidente e a retina é relativamente indiferenciada; mas a camada de fibras ópticas pode ser observada, e dentro do neuroepitélio existem células grandes, próximas à camada de fibras ópticas, que podem ser células ganglionares pós-mitóticas. As células ganglionares podem ser reconhecidas pelo seu grande tamanho entre E6 e E7, ao mesmo tempo em que o primeiro axônio da célula ganglionar atinge o tectum óptico; mas a camada de células ganglionares e a camada plexiforme interna não podem ser visualizados até E7. A camada plexiforme externa só se torna visível após E9. As primeiras células a iniciarem o processo de diferenciação são as células ganglionares que estão em contato com o humor vítreo (Adler, 1993; Kahn, 1973; Fujita e Horü, 1963). Logo após, inicia-se a diferenciação das células amácrinas, das células horizontais, fotorreceptores e finalmente das células bipolares (Prada et al., 1979; Mishina e Fujita, 1978; Kahn, 1974,1973).

Na retina, em E10, todas as camadas celulares podem ser observadas, além de uma espessa camada plexiforme interna e uma delgada camada plexiforme externa. As células de Müller, que formam a glia da retina, já estão presentes na retina em torno de E4 (Coulombre, 1955). As primeiras conexões sinápticas são visualizadas na camada plexiforme interna, por volta de E14, e na plexiforme externa, por volta de E15, (Hughes e La Velle, 1974; Sheffield e Fischman, 1970; Coulombre, 1955). Após E15, já são encontrados os cones e bastonetes na superfície da retina neural, ocorrendo a diferenciação estrutural dos segmentos externos dos fotorreceptores até E21 (momento da eclosão) (Mason e Bighouse, 1975; Araki, 1984).

1.2. GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISSOR NO SNC.

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Em 1986, Miller e Slaughter verificaram altos níveis de glutamato em fotorreceptores e células bipolares. A presença de receptores glutamatérgicos foi posteriormente descrita na retina de vertebrados (Watkins, 1989).

Os receptores de glutamato, de uma forma mais ampla, são divididos em duas principais classes: metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos possuem sete domínios transmembrana, são de ação lenta e mobilizam vias de sinalização de segundo mensageiro através da ativação de enzimas de membrana (Monaghan et al., 1989; Schoepp et al., 1990). A tabela 1 mostra os grupos a que pertencem os subtipos de receptores metabotrópicos, seus agonistas seletivos e a via de sinalização intracelular a que estão acoplados. Os receptores ionotrópicos são responsáveis pelos mecanismos de ação rápida do SNC (Monaghan et al., 1989; Schoepp et al., 1990; Watkins et al., 1990). Entre a classe de receptores de tipo ionotrópico (canais iônicos), são descritos três subtipos: receptores de AMPA (α -amino-5metil-4-isoxalona propionato) e kainato, conhecidos como receptores de tipo não-NMDA, e os próprios receptores de tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato).

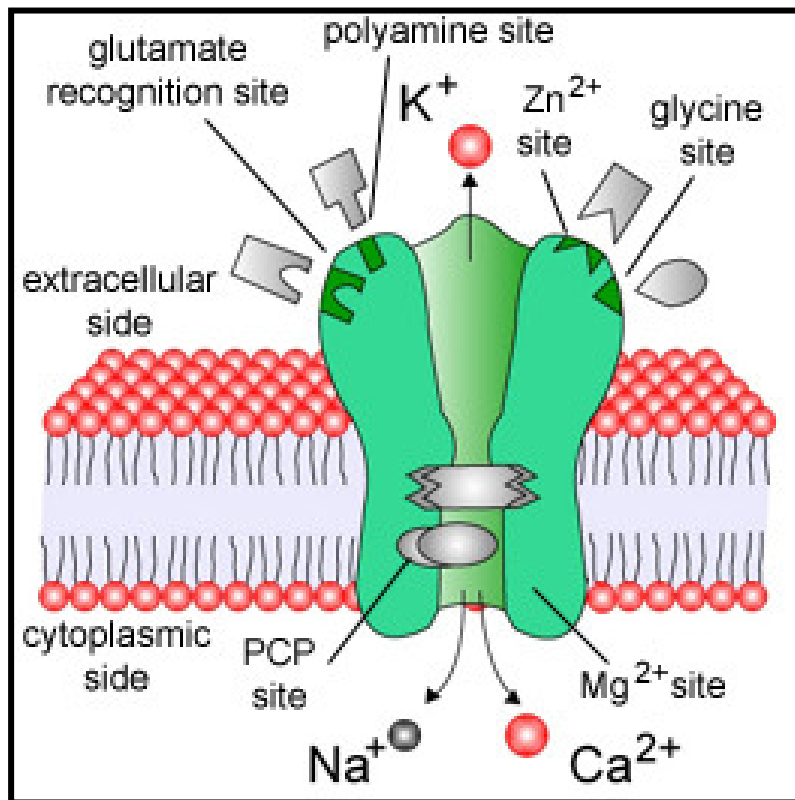
TABELA 1: Divisão dos subtipos de receptores metabotrópicos em grupos por subunidades e via de transdução de sinal.

Subtipos	Grupos	Agonistas Seletivos	Via transducional
mGluR1 mGluR5	I	DHPG	Ativação da fosfolipase C
mGluR2 mGluR3	II	DCG-IV	Inibição da Adenilil Ciclase
mGluR4 mGluR6 mGluR7 mGluR8	III	L-AP4	Inibição da Adenilil ciclase

Os receptores de tipo não-NMDA possuem arranjos multiméricos de quatro subunidades e quatro domínios transmembrana. Os receptores de tipo AMPA são compostos de subunidades como GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 (Nakanishi, 1992) e os receptores kainato são compostos pelas subunidades GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2 (Hollmann et al., 1994). Ambos são descritos como receptores que, quando ativados, promovem a despolarização da célula, pois na maioria das conformações, permitem a entrada de íons sódio (Pláteník et al., 2000). O receptor AMPA pode conduzir íons divalentes como o cálcio (Ca^{2+}) quando a subunidade GluR2 está ausente, pois esta possui um resíduo de arginina carregado positivamente que reduz a permeabilidade ao cálcio (Hume et al., 1991).

1.3. RECEPTOR DE NMDA

O receptor NMDA tem ampla distribuição no SNC e é descrito em quase todos os neurônios desde os períodos iniciais do desenvolvimento. Nesta fase, é responsável pela sinalização da sobrevivência ou morte das células neuronais (Ikonomidou et al., 1999), ou períodos de diferenciação (Yun et al., 1999). O receptor NMDA pode ter o seguinte arranjo de subunidades na sua composição, formando um tetrámero: NR1 (Sugihara et al., 1992; Nakanishi e Masu, 1994), NR2A, NR2B, NR2C, NR2D (Konishi et al., 1991; Moriyoshi et al., 1991; Monyer et al., 1992; Ishii et al., 1993), NR3A e NR3B, sendo que as subunidades NR1 e NR2 são as mais encontradas e importantes, pois são sítios para a glicina (co-agonista) e o glutamato respectivamente (Esquema 2). Diferentes combinações geram receptores com características funcionais farmacológicas diferentes, principalmente no que concerne à subunidade NR2 (Moriyoshi et al., 1991, Kutsuwada et al., 1992; Meguro et al., 1992; Buller et al., 1994). Algumas das mudanças relacionam-se ao tempo de abertura do canal e também a sua condutância (Gibb e



Esquema 2: Representação esquemática dos sítios de ligação de agonistas e antagonistas ao receptor NMDA e sua permeabilidade iônica, (PCP) Poro do canal (http://www.uc.cl/sw_educ/neurociencias/html/084.html).

Colquhoun, 1992). Normalmente, para que o receptor seja funcional é necessário a co-expressão de uma subunidade NR1 e uma ou duas subunidades NR2.

Para ser ativado, o receptor NMDA necessita que ocorram dois eventos simultâneos. Primeiro deve ocorrer uma despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio (Mg^{2+}) de maneira voltagem dependente. Esta despolarização é gerada pela ativação prévia dos receptores AMPA/Kainato através do seu ligante glutamato, permitindo a entrada de íons sódio na célula e a saída do magnésio do canal por diferença de potencial. Concomitante a isso é necessária ligação da glicina e do glutamato para ativação deste receptor.

Após a saída do íon magnésio e a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, ocorre um elevado influxo de cálcio pelo receptor (MacDermott et al., 1986), assim da entrada de sódio e a saída de potássio em menor proporção. Este aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva a inúmeros eventos na célula: permite entre outras ações, remodelagem do citoesqueleto (Forsher, 1989), ativação de proteínas cinases dependentes de cálcio e, conseqüentemente, liberação de neurotransmissores, estando por isso relacionado com a potenciação de longa duração (LTP), aprendizado e plasticidade neural (Collingridge e Bliss, 1987; Olney, 1989; Wood et al., 1990; Scatton, 1993). A entrada de cálcio também promove aumento na síntese de óxido nítrico (NO), visto que a enzima óxido nítrico sintase (NOS), que o produz, é dependente de Ca^{2+} /calmodulina (Gally et al., 1990).

Embora consideremos habitualmente a glicina como co-agonista do receptor, Schell e colaboradores, em 1995, mostraram que a D-serina possui alta afinidade pelo sítio da glicina. Além de ser predominantemente encontrada no cérebro (Hashimoto et al., 1993), está presente em altas concentrações no prosencéfalo, córtex cerebral e hipocampo e em baixas concentrações no diencéfalo, mesencéfalo e cerebelo

(Hashimoto et al., 1993; Nishikawa, 2005). Isto sugere que a D-serina funciona como um co-agonista endógeno do receptor NMDA. Outros estudos recentes demonstraram que receptores de NMDA do córtex motor formados pelas subunidades NR1/NR3 podem ser completamente ativados apenas com a ligação da glicina, sem depender do glutamato ou NMDA e ser inibido por D-serina. Deste modo, tanto glutamato como NMDA seriam incapazes de produzir qualquer efeito ou teriam efeitos muito reduzidos (Chatterton et al., 2002; Fuchs et al., 2005).

Outra forma de se modular o receptor é através da fosforilação/defosforilação dos seus resíduos. PKC, PKA, CaMKII são exemplos de cinases que fosforilam o NMDAR e aumentam sua atividade. Em contraposição, as fosfatases dos tipos 1 e 2A defosforilam o receptor, diminuindo sua atividade (Wang et al., 1994; Gerber et al., 1989; Chen e Huang, 1992; Ramam et al., 1996; Omkumar et al., 1996). A modulação do receptor NMDA se torna extremamente importante a partir do momento que a presença em excesso de neurotransmissores excitatórios no meio extracelular ativam os receptores de maneira persistente, levando a um aumento exacerbado nos níveis intracelulares de cálcio e, em consequência, gerando eventos de excitotoxicidade (Choi, 1988). O cálcio desencadeia uma série de fenômenos na célula que a levam à morte tais como: a ativação de lipases e proteases citoplasmáticas e despolarização da membrana mitocondrial (Desse et al., 1993), a inibição da síntese de ATP pela mitocôndria e o aumento da formação de radicais livres (Nicholls, 1985; Dugan et al., 1995; Bindokas et al., 1996).

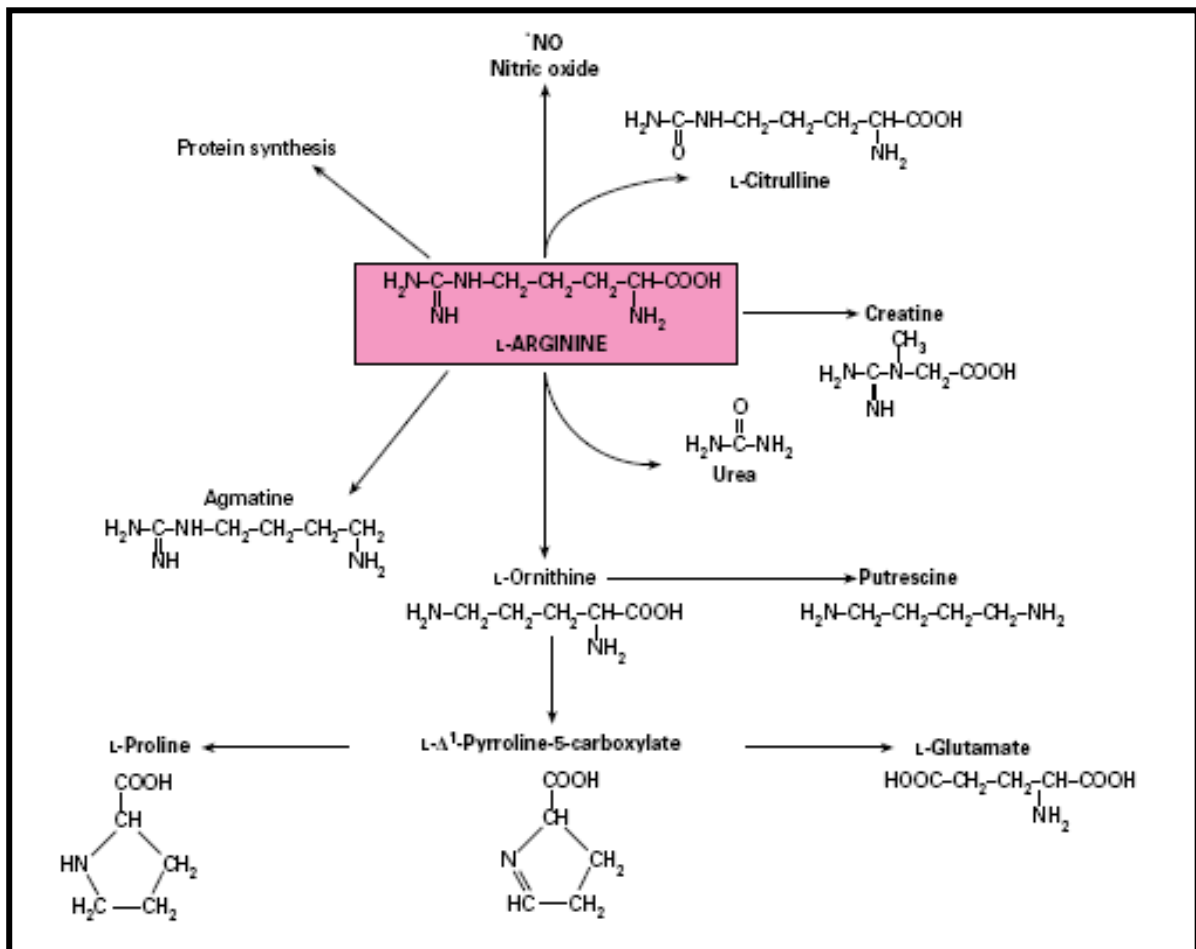
1.4. A L-ARGININA

A L-Arginina (L-ARG) é requerida para síntese de várias substâncias tais como a creatinina e agmatina, proteínas e NO. Todas estas reações dependem da concentração intracelular de L-ARG e para isto duas vias podem ser descritas: síntese de L-ARG a partir de outros substratos do ciclo de Krebs ou transporte de L-ARG do meio extracelular para compartimentos intracelulares. As principais vias nas quais a L-ARG está envolvida são descritas no esquema 3.

No SNC, as enzimas mitocondriais carbamoilfosfato sintetase e ornitina transcarbamilase não são expressas e, portanto, a síntese de L-ARG é proveniente da reciclagem da citrulina (L-Cit), da via da agmatina e de proteínas. Não há um órgão que possua todas as enzimas participantes do metabolismo da L-ARG demonstradas no esquema 3 (Wiesinger, 2001). Os estudos sobre a L-ARG se intensificaram com a descoberta que ela seria o precursor para síntese de nitritos e nitratos (Hibbs et al., 1987) e, posteriormente, observaram que este aminoácido era também precursor da produção de óxido nítrico (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Moncada et al., 1988). A L-ARG é convertida a L-Cit e NO de forma estequiométrica, por ação catalítica de um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico síntases (NOS), sendo esta a única via fisiológica conhecida de produção de NO (Förstermann et al., 1991; Griffith e Stuehr, 1995).

1.5. ÓXIDO NITRICO

O óxido nítrico (NO), um radical livre, atua como uma molécula sinalizadora de grande instabilidade e de vida curta, e difunde-se facilmente pela membrana celular. Usando microsensores seletivos para o NO, demonstrou-se uma alta concentração de NO em zonas adjacentes à membrana plasmática de uma célula endotelial (Malinski et al., 1993). O NO com propriedades de radical livre, não apresenta carga, já que de seus 11 elétrons de valência um não está emparelhado. Devido à sua condição de radical



Esquema 3: Metabolismo da L-arginina em células de mamíferos (Wu e Morris, 1998)

livre, o NO reage rapidamente com outras moléculas que contêm elétrons não emparelhados, como são os outros radicais livres e metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} do grupo heme). O NO pode oxidar-se parcialmente, perder o único elétron e transformar-se em cation nitrosônio [NO^+], que é mais estável que o NO^\cdot (Stamler et al., 1992; Butler et al. 1995). Também pode reduzir-se ganhando um elétron e formar o íon nitroxila [NO^-]. Este intermediário reativo pode aparecer em solução aquosa nos estados singlete (HNO) e triplete (NOH) e apresentar diversas propriedades químicas. Se, em

determinadas situações “in vivo” ocorre esse intercâmbio de formas singlete e triplete é matéria de debate (Miranda et al., 2000, 2003). Embora o radical livre formado por espécies reativas de nitrogênio (ERN) possa ter estados de oxidação $+1$, $+2$ ou $+3$, a forma mais conhecida é o NO^\bullet com um número de oxidação de $+2$. Se o estado de oxidação for $+1$ é representado por (NO^-) , e se for $+3$ o cátion nitrosônio (NO^+) (Pagliaro, 2003 para revisão).

O (NO^-) , (NO^+) e outros produtos de oxidação do NO podem atuar sobre outras moléculas através de reações de nitração (via ONOO^- , pela reação de $\text{NO} + \text{O}_2^{\bullet-}$) ou nitrosilação (adição de um grupo NO^\bullet a um grupamento heme, formando um produto nitrosil-heme (Miranda et al., 2003). Tendo em conta que cada uma destas espécies químicas apresenta uma reatividade característica, acredita-se que a reatividade e o metabolismo do NO são influenciados pelas características do meio e as espécies químicas formadas.

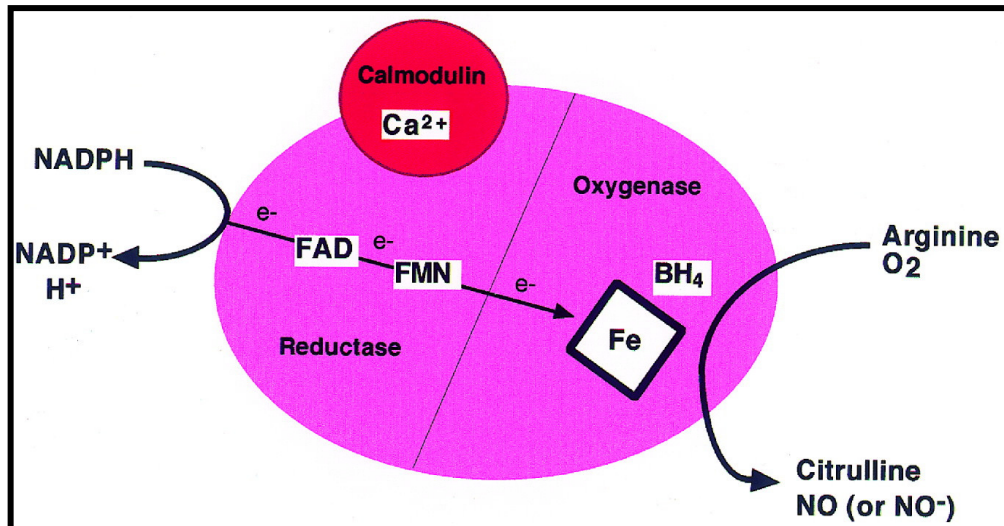
A síntese de NO ocorre em presença de oxigênio molecular sendo catalisado por enzimas que convertem estequiometricamente o aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. Essas enzimas, denominadas Óxido Nítrico Sintases (NOS) distribuem-se amplamente pelos tecidos animais. A atividade da NOS neuronal, ou isoforma I (nNOS), é regulada pela concentração de cálcio intracelular (Bredt e Snyder, 1990). Existem mecanismos adicionais de regulação da nNOS. Por exemplo, esta enzima é sensível às variações da concentração de L-arginina e/ou cofatores como NADPH (Esquema 4). Provavelmente, o NO produzido contribua para a inibição da atividade da NOS por um mecanismo de retroalimentação negativa ligando-se ao grupo heme da NOS em forma reversível (Roger e Ignarro, 1992). Outros investigadores sugerem que o NO bloqueia completamente a enzima citocromo P450 redutase, numa concentração

menor que 70 nM (Mayer 1995). Contudo, estudos com a NOS purificada revelaram que esta não foi apreciavelmente inibida por doadores de NO (Mayer 1995).

A iNOS ou isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente no citoplasma de modo habitual, sendo induzida por agentes agressores como ocorre nos macrófagos, linfócitos e/ou outras células por lipopolisacarídeos bacterianos e/ou citocinas (Stuehr et al., 1991). Vários grupos clonaram a iNOS a partir de músculo liso (Teng et al., 1998), hepatócitos de camundongo (Stuehr et al., 1991) e hepatócitos de humanos (Geller et al., 1993). Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos ou outras células ativadas, é tóxico para as bactérias, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável por grande número de processos inflamatórios (Nathan e Xie, 1994).

A eNOS ou isoforma III é constitutivamente expressa em células endoteliais e também é ativada por um mecanismo dependente de Ca^{+2} /calmodulina, podendo ser chamada também de cNOS ou EC-NOS (NOS endotelial-constitutiva). O gene codificante da isoforma III foi clonado a partir de células endoteliais de boi e de humanos, confirmando o local preferencial de produção e ação (Pollock et al., 1991).

O receptor biológico para o NO mais estudado é a Guanilil Ciclase solúvel (sGC). No SNC, esta enzima apresenta uma distribuição diferencial, sendo relativamente abundante no estriato, núcleo accumbens, substância negra (Hoffman et al., 1997), neocórtex, cérebro (Ariano et al., 1982), bulbo olfatório e algumas zonas do tronco encefálico (Furuyama et al., 1993).



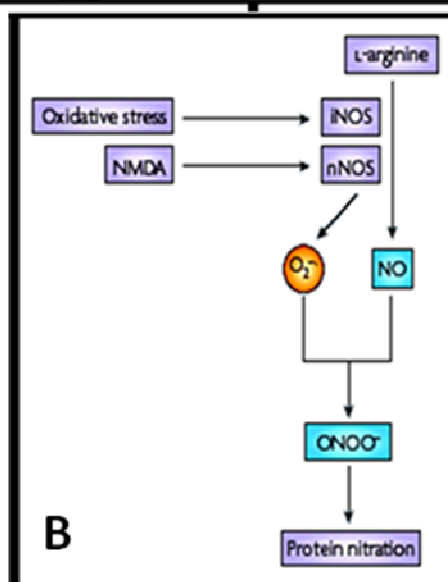
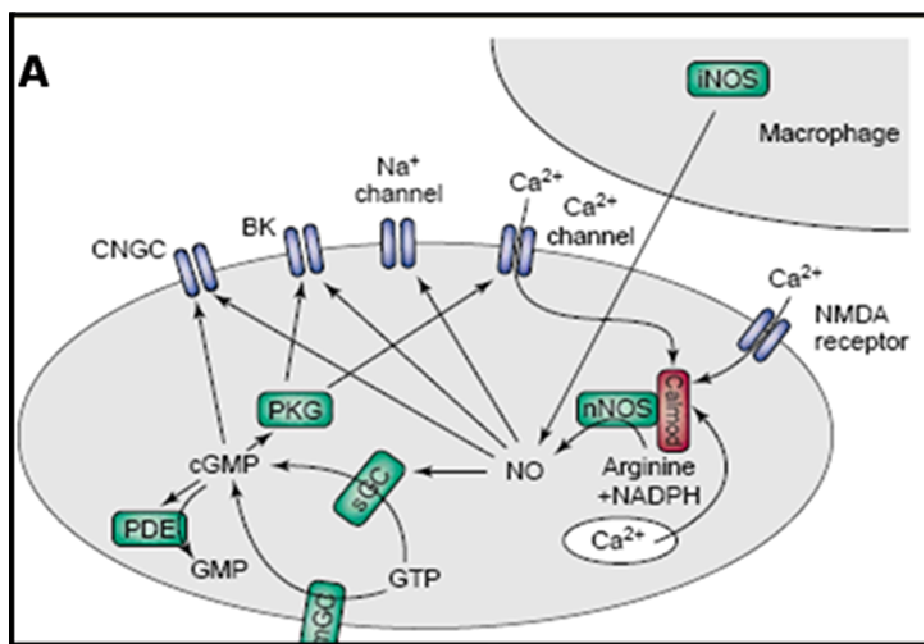
Esquema 4: Produção de NO pela enzima Óxido Nítrico Sintase em presença de cofatores e formação do complexo cálcio-calmodulina. A enzima utiliza como substrato a L-arginina (L-ARG) e produz estequiometricamente NO e citrulina. FAD, Flavina dinucleotídeo. FMN, Flavina mononucleotídeo. BH₄, Tetrahydrobiopterina. NADP⁺, Nicotinamida dinucleotídeo fosfato. (Tirado de Alderton et al., 2001).

A ativação da sGC pelo NO causa um aumento da concentração intracelular de GMPc, a partir da hidrólise de GTP (Schmidt et al. 1993). O monóxido de carbono (CO) pode ter um efeito semelhante ao NO em ativar a sGC, mas são necessários estudos adicionais para esta caracterização (Schmidt et al. 1992; Pineda et al., 1996). Tem sido descrito três sítios de ação específicos para o GMPc com importância neurobiológica: a) Ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) (Wang e Robinson, 1997); b) Fosfodiesterases ativadas ou inibidas por GMPc e c) canais iônicos da membrana plasmática (Vincent, 1994) (Esquema 5).

O NO tem a potencialidade de reagir com grupos tióis (SH) de moléculas protéicas com diferentes funções celulares, tais como receptores e/ou enzimas (Stamler et al., 1992; Montague et al., 1994). Por exemplo, a nitrosilação de grupos tióis do

receptor tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) dessensibiliza o receptor e inibe a excitotoxicidade celular (Lei et al. 1992). A ligação entre uma proteína e NO através de um grupo tiól (RS-NO) pode derivar da formação de uma ligação disulfeto (RS-SR) ou formação de um ácido sulfénico (RS-OH). Os três tipos de ligação são reversíveis mediante uma reação de óxido-redução (Hogg, 2000). Outros alvos susceptíveis de S-nitrosilação são as proteínas P21 Ras, caspase-3, e o receptor de rianodina (Gow e Ischiropoulos, 2001 para revisão). Outra função atribuída às reações de S-nitrosilação é a eliminação do excesso do NO, no meio intracelular. Por exemplo, a ligação do NO a metalotioneína, proteína com um alto conteúdo de resíduos cisteína, é considerada um possível mecanismo alternativo de seqüestro do NO, que poderia evitar seus efeitos neurotóxicos (Hogg, 2000).

A reação do NO com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) forma peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula reativa e tóxica para a célula que medeia outra propriedade de NO na nitração de proteínas. Demonstrou-se que $ONOO^-$ pode se decompor em radicais livres tóxicos e em dióxido de nitrogênio (N_3O_1) (Alvarez et al., 1995; Radi, 1996; Denicola et al., 1995; 1996). A enzima superóxido dismutase (SOD), ao converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, prolonga a meia vida do NO em sistemas biológicos (Gryglewski et al., 1986) o que possibilita a utilização desta moléculas nos trabalhos experimentais como reguladores do ânion superóxido (Bredt e Snyder, 1989).



Esquema 5: Mecanismo de ação de óxido Nítrico. A) A via de NO/GMPc relacionada a ativação de canais controlados por nucleotídeos (CNGC) e canais de K⁺ controlados por Ca²⁺ (BK) Retirada de Ahern et al., 2002. B) Mecanismo de síntese de peroxinitrito. Retirado de Calabrese et al., 2007.

Por último, a formação de nitrotirosina tem sido demonstrada em algumas doenças inflamatórias, neurodegenerativas e arterioescleróticas (Beckman et al., 1996). Embora a nitração de proteínas tenha sido usada como indicativo da produção de peroxinitrito, também pode ocorrer por outras vias independentes de peroxinitrito, por exemplo na formação de cloreto de nitrila (NOCl) pela ação da mieloperoxidase em processos inflamatórios (Eiserich et al., 1998). A nitração de proteínas pode alterar a conformação e estrutura das proteínas, sua atividade catalítica e/ou sua susceptibilidade para a catálise (Castro et al., 1994). Demonstrou-se também que a nitração dos anéis de tirosina das proteínas pode diminuir a efetividade das proteínas como substrato e tirosina cinases (Wink et al., 1997). Portanto, através da nitração de proteínas pode-se efetivar o efeito tóxico do NO, participando da interrupção nos processos de sinalização celular e apresentar uma ação aparentemente irreversível, embora já se tenha descrito recentemente atividade desnitrase em alguns tecidos (Kamisaki et al., 1998).

Com as ferramentas farmacológicas de hoje é possível atuar em diversos níveis do mecanismo celular da ação do NO. A administração de NO puro em tecidos biológicos é difícil, sendo por isso utilizado doadores de NO (SNAP, GSNO, DETA/NO, etc). Da mesma forma, a ação dos doadores de NO pode modificar-se ao serem aplicadas substâncias inibitórias da cascata de GMPc. Assim, foram sintetizadas moléculas que inibem de forma específica a sGC bloqueando a ação do NO, como por exemplo o ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-alquinoxalina-1-one), (Wu e Dun, 1996). No entanto, análogos de GMPc permeáveis à membrana como 8-Br-GMPc mimetizam as ações do NO (Pineda et al., 1996). Na retina de vertebrados, foram descritas células responsivas ao NO endógeno, sugerindo que o NO reforçaria os efeitos nos estímulos visuais (Koinstinaho e Sagar, 1995).

1.6. PAPEL DO NO NA RETINA

Na retina de coelho, foram identificados por imunohistoquímica a NOS nas populações de células amácrinas, na margem interna da INL, e seus prolongamentos dendríticos na subcamada mais externa da IPL (Koistinaho et al., 1993). Na retina de peixe, a NOS foi detectada no segmento externo do cone, células horizontais H1 e na camada de células gliais (Weiler e Kewitz, 1993). Na espécie *Columbia livia* (pomba) Sato (1990) relatou uma imunomarcção positiva para células amácrinas na camada INL, que mostrou-se densamente marcada para atividade de NADPH-d.

Evidências na literatura mostraram que a atividade de NADPH-d pode ser coexpressa com outros neurotransmissores em neurônios do SNC, como por exemplo, na retina de coelho, onde GABA e NADPH-d colocalizam em células amácrinas (Koistinaho e Sagar, 1995), e na retina de peixe onde GABA e NADPHd colocalizam nas células horizontais H1 (Weiler e Kewitz, 1993). Nos neurônios espinhais de rato, NADPHd coexpressa com GABA, Acetilcolina e Glicina (Spike et al., 1993).

A identificação de NOS em duas subpopulações distintas de células amácrinas na retina de rato sugeriu sua interação com sinapses gabaérgicas nas células ganglionares, pois essas células expressam canais iônicos regulados por GMP cíclico (Chun et al., 1998).

O NO está envolvido na eliminação de sinapses retinotectais no sistema visual de pinto, pois sua redução em um período crítico para o refinamento dessas sinapses resultou em uma persistência das sinapses ipsolaterais (Wu et al., 1994). Na retina, a enzima se localiza em vários tipos celulares incluindo células do epitélio pigmentar (Bredt et al., 1990; Goureau et al., 1993), células amácrinas, ganglionares (Dawson et al., 1991; Koistinaho et al., 1993) e fotorreceptores (Yamamoto et al., 1993).

A presença da NOS-neuronal e caracterização do sistema de NO foi previamente demonstrada na retina de pinto, tanto pela medida da NADPHd (De Faria, et al., 1996) quanto pela medida da conversão de ^3H -arginina em ^3H -citrulina (Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996). Vários análogos de L-arginina, ou substratos da NOS-neuronal, demonstraram diferentes graus de inibição da NADPHd em homogenados de retina de pinto (de Faria et al., 1996). Em trabalhos posteriores do nosso laboratório mostrou-se que a conversão de L-arginina em L-citrulina estimulada pelo glutamato era inibida por análogos de L-arginina e antagonistas do receptor NMDA (Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996).

Dados anteriores mostraram um fortalecimento do sistema de sinalização do NO através da disponibilização de L-arginina pela glia aos neurônios que contêm a NOS-neuronal, mostrando um sistema de transporte de L-arginina dependente de sódio e cálcio em células gliais em cultura (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000). Trabalhos mais recentes do nosso laboratório demonstraram o NO como modulador da proliferação celular de células gliais em cultura de retina envolvendo um mecanismo independente de GMPc (Magalhães et al., 2006).

Outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram a participação do NO na fisiologia da retina, modulando as subunidades do receptor NMDA (dados não publicados), e na regulação da morte neuronal por apoptose via o sistema GCs/GMPc/PKG e proteínas cinases como PI3K, CaMKII e MAP cinase (ERK $^{1/2}$) em cultura purificada de neurônios após a troca de meio (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Por outro lado, evidências recentes sugerem que a inibição da síntese protéica induzida pela cicloheximida (CHX 300 μM) ou glutamato, via receptores de tipo NMDA, disponibiliza mais L-arginina intracelular, conseqüentemente aumentando a produção de NO (Cossenza et al., 2006).

1.7. A VIA DA PI3K/AKT

A enzima fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K) é uma cinase de lipídios altamente conservada que fosforila o agrupamento 3'-hidroxila do anel inositol dos fosfoinositídeos. Esta reação leva à ativação de várias vias de sinalização intracelular que regulam funções celulares diversas como metabolismo, crescimento, sobrevivência e proliferação celular. Os membros da família PI3K são agrupados em três classes (I, II ou III), de acordo com sua estrutura e substratos específicos "in vitro" (Engelman et al., 2006).

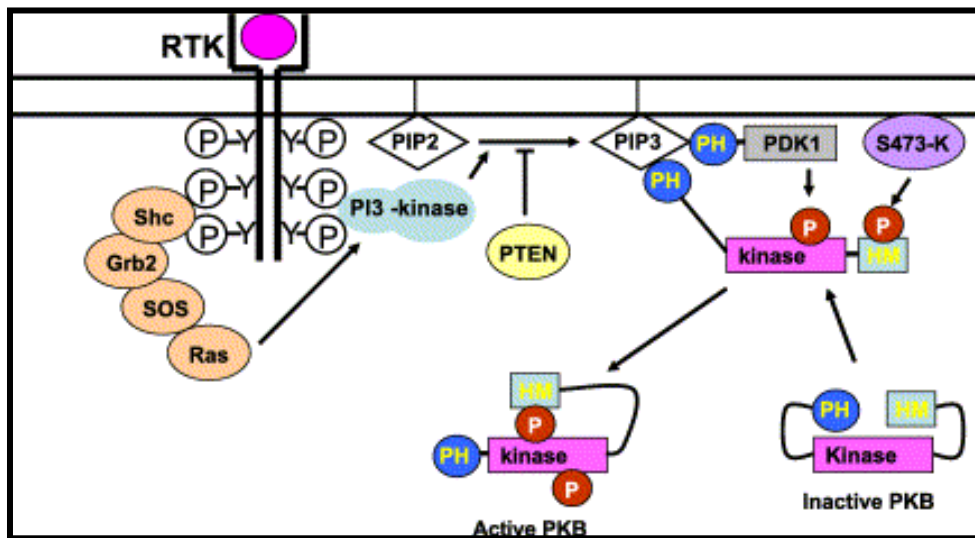
Os membros da classe I são os representantes mais bem estudados da família da PI3K por constituírem uma das principais vias de transdução de sinal ativadas por receptores de membrana. Frequentemente quando um efeito é atribuído à PI3K está sendo referida a atividade dos membros desta classe. Esta enzima cinase é um heterodímero, composto por uma subunidade regulatória (p85, p55, p84 ou p101) e uma subunidade catalítica (p110), tendo como principal substrato o fosfatidilinositol (PI) para gerar fosfatidilinositol (3)-fosfato (PIP), ou fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) para gerar fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃), moléculas que agem como segundo mensageiro intracelular (Hawkins et al., 2006 para revisão).

A classe I é dividida em duas subfamílias baseadas no tipo de ativação por receptores de membrana. A classe IA compreende as isoformas PI3K α , PI3K β , PI3K δ que são ativadas por receptores tirosina cinase, enquanto que a classe IB compreende a isoforma PI3K γ , que ativada por receptores acoplados a proteínas G. As isoformas da classe IA possuem em sua subunidade regulatória (p85 ou p55) dois domínios SH2 que têm alta afinidade por tirosinas fosforiladas, como aquelas presentes em receptores de fatores de crescimento, seus substratos e proteínas adaptadoras. A isoforma PI3K γ , único representante da classe IB, possui em sua subunidade regulatória (p84 ou p101)

dois sítios de interação com a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G, capazes de promover a translocação e a ativação alostérica da enzima. A subunidade catalítica de todos os membros da classe I de PI3K possui ainda um sítio de interação com a proteína Ras, cuja ligação induz a uma mudança conformacional e reorientação da membrana resultando em aumento na atividade da enzima (Engelman et al., 2006; Hawkins et al., 2006).

Estudos da cascata de sinalização mediada pelo EGF permitiram o estabelecimento de um modelo de via de transdução de sinal mediada por fatores de crescimento polipeptídios (Ullrich e Schlessinger, 1990). Quando EGF se liga ao seu receptor estimula a autofosforilação em resíduos de tirosina do domínio citoplasmático do receptor (Esquema 6). Esta ativação promove uma mudança conformacional e facilita a interação com a PI3K. Quando ativada a PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol na posição 3' do anel inositol para gerar os lipídeos fosfatidilinositol (3,4) bifosfato (PIP₂) e fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃). Os lipídios formados servem como sítio da ancoragem para proteínas intracelulares, permitindo sua interação em complexos sinalizadores que transmitem sinais de membrana plasmática para o citosol. A produção de fosfatidilinositol trifosfato (PIP₃/PIP₂) é regulada por fosfatases que dependem de PI (PTEN) e a fosfatase contendo domínios SH2 (SHIP) as quais possuem atividade fosfatase na posição 3' e 5' do anel inositol (Stambolic et al., 1998). Muitas proteínas se ligam aos fosfoinositídeos fosforilados na posição 3' através de um domínio homólogo da pleckstrina (PH) (Wymann et al., 2003). O alvo intracelular da PI3K é a proteína cinase B, uma serina-treonina cinase, também chamada AKT. Após a ativação da PI3K e produção de fosfatidilinositol bi e tri fosfato (PIP₂ e PIP₃) na membrana ocorre o recrutamento da proteína cinase AKT/PKB citoplasmática para a membrana celular e deste modo, ocorre a fosforilação dos resíduos treonina-308 e

serina-473 por cinases intermediárias: a proteína PDK1 e PDK2 dependentes de PIP₃ (Alessi et al., 1996). Esse processo de recrutamento e ativação da AKT/PKB pode ser mimetizado pela adição de uma seqüência sinal miristoilada de LcK/Src no domínio N-amino terminal da AKT/PKB (Lawlor et al., 2001).



Esquema 6: Via de sinalização da AKT/PKB induzida por ativação de receptores tirosina cinase. Uma vez ativada a PI3K converte o fosfoinositídeos bi-fosfato (PIP₂) em tri-fosfato (PIP₃). A ativação da AKT/PKB é iniciada por sua translocação para a membrana plasmática a través do domínio homólogo da plackstrina (PH). Em seguida a AKT/PKB é fosforilada nos resíduos treonina-308 e serina-473 pela proteína cinase dependente de fosfoinositídeos (PDK1) ou PDK2 respectivamente. Uma vez ativada AKT/PKB se dissocia da membrana e promove a fosforilação de proteínas alvo intracelulares. Proteínas adaptadoras (SOS, Ras, Shc e Grb2). Retirado de Hanada et al., 2004.

A AKT é uma proteína serina-treonina cinase envolvida na regulação e sinalização fisiológica da célula. Foram identificados três isoformas da AKT em camundongos e humanos (Datta et al., 1999). Essas três proteínas AKT α , AKT β , AKT γ , são codificados por genes distintos, localizados em diferentes cromossomos, apresentando 80 % de homologia da seqüência de aminoácidos e domínios estruturais (Scheid et al., 2003). A estrutura linear da AKT/PKB é conservada ao longo da evolução. Apresenta um domínio de homologia à pleckstrina (PH) N-terminal, uma região central cinase e um domínio C-terminal regulatório contendo grupos hidrofóbicos característicos às cinases AGC (PKA, PKG e PKC). O domínio PH tem maior afinidade pelos produtos lipídicos da membrana (PIP₂ e PIP₃) facilitando a translocação da AKT/PKB. No entanto, o domínio cinase central apresenta também uma alta similaridade com as proteínas cinases AGC, e outras como a p70S6K e p90RSK (Peterson et al., 1999).

Fosforilação na treonina-308 e serina-473 levam a uma ativação completa da AKT/PKB. Recentemente dois grupos têm mostrado a ativação da enzima por fosforilação de resíduos tirosina quando estimulados pelo EGF (Tyr-315 e Tyr-326). Esses sítios foram fosforilados pela tirosina cinase c-Src in vivo e in vitro mediado pela interação de domínios SH3 da s-Src com PXXP do domínio C-terminal hidrofóbico da AKT (Jiang et al., 2003). Outro grupo mostrou que a tirosina 474 do domínio hidrofóbico pode ser fosforilada em resposta ao estímulo do IGF-1 (Conus et al., 2002). O papel desses resíduos sobre a ativação da AKT/PKB parece ser dependente da fosforilação da treonina-308 induzida por PDK1. Essas observações sobre a fosforilação nos sítios da tirosina sugerem múltiplas estimulações em sítios específicos na ativação da AKT/PKB.

Também foi demonstrado a participação de várias proteínas “downstream” à cascata de sinalização da AKT/PKB, entre elas a eNOS responsável pela produção de NO no endotélio. A AKT/PKB fosforila a Serina 1177 da eNOS. Além disso, a AKT/PKB participa da regulação da apoptose e processos de sobrevivência tanto em células neuronais como não neuronais atuando por exemplo na translocação e fosforilação da Bad, uma proteína antiapoptótica. Por outro lado, a AKT/PKB promove a ativação da GSK3 β aumentando a captação e metabolização da glicose para síntese de ATP (Hanada et al., 2004). A regulação por AKT/PKB de fatores de transcrição como CREB e NF κ B induz positivamente a transcrição de genes antiapoptóticos além de outras proteínas necessárias para modular processos de sobrevivência, proliferação, migração, ciclo celular e metabolismo celular (Hanada et al., 2004).

1.8. A via da AKT e NO

A relação entre as diferentes cascatas de sinalização promovidas pelo NO ainda precisa ser definida. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram a participação da PI3K na sobrevivência celular promovida por NO (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Por outro lado Há et al., 2003 mostraram que o NO liberado pelo SNAP induz ativação da AKT/PKB em células PC12 através de uma via de sinalização constituída pelo par GCs/GMPc e ativação da PKG, protegendo as células de apoptose induzida pela 6-OHDA (6-hidroxidopamina). Por outro lado, em células pancreáticas secretoras de insulina foi mostrado que o doador de NO DETA/NO, induz também a fosforilação da AKT/PKB (Tejedo et al., 2004). Entretanto, processos de sinalização da PI3K/AKT ocorrem essencialmente pela ativação de receptores de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Algumas evidências experimentais sugerem que o NO endógeno

produzido pela ativação da NOS ou exógeno produzido a partir de doadores do NO desempenhem um papel fundamental nos mecanismos de ação desta cascata.

Um estudo recente demonstrou que a ativação da AKT/PKB induzida pelo NO poderia ocorrer de maneira GMPc-dependente envolvendo a via da c-Src (Tejedo et al., 2001), ou através da S-nitrosilação direta da AKT/PKB causando sua inibição (Yasukawa et al., 2005). Assim, foi observado que em células endoteliais a fosforilação da AKT/PKB e ativação da PI3K era dependente de GMPc para induzir migração e angiogênese celular (Kawasaki et al., 2003). Por outro lado, em células epiteliais foi demonstrado que YC-1 (ativador direto da GC-solúvel) estimula a expressão de ciclooxigenase-2 de modo dependente da ativação da AKT/PKB (Chang et al., 2004).

2. OBJETIVOS

Em nosso trabalho anterior (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007), destacamos a relevância do NO na sobrevivência celular mostrada em cultura purificada de neurônios obtidos de embriões de pinto com oito dias de desenvolvimento (E8). O NO regula a apoptose induzida pela troca de meio atuando através de vias de sinalização chave como a PI3K, CaMKII, PKA e MAP cinase (ERK^{1/2}). Este efeito do NO foi totalmente dependente do sistema clássico da GC-solúvel/GMPc e PKG. Tomando como base esses resultados, temos como objetivo principal estudar o papel regulatório de NO na fosforilação da cinase de sobrevivência AKT/PKB, em células neuronais de retina de embrião de galinha. Os seguintes objetivos específicos serão abordados:

- ▶ Caracterizar a cinética de ativação da AKT/PKB pelo NO exógeno (SNAP) e pelo NO endógeno (L-ARG) em células neuronais mistas de retina em cultura.
- ▶ Estudar as vias de sinalização envolvidas na ativação da AKT/PKB por NO e sua relação com a NOS.
- ▶ Avaliar o efeito do NO e L-ARG como reguladores importantes do influxo intracelular de cálcio e o comprometimento das proteínas cinases (Src e CaMKII) dependentes de cálcio na fosforilação da AKT/PKB.
- ▶ Estudar a regulação da fosforilação da AKT/PKB por receptores glutamatérgicos de tipo NMDA.
- ▶ Avaliar o papel na biosíntese de NO induzido por inibidores da síntese de proteínas (cicloheximida e anisomicina) na fosforilação da AKT/PKB.
- ▶ Estudar o papel fisiológico da fosforilação da AKT/PKB induzida pelo NO, em especial sua migração para o núcleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

O meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium), Soro Fetal Bovino (FBS), tripsina e Poli-L-ornitina foram obtidas da GIBCO (Nova York, USA). Placas de cultivo de 40 mm da TPP (Suíça). KT-5823, KN62, KN93, SNAP, DNQX, BSA, Sulfato de estreptomicina, Penicilina G, L-glutamina foram obtidas da Sigma/RBI (St. Louis. Mo. USA). MK-801 foi obtido da Calbiochem (Califórnia, USA). PP1 foi obtido da Biomol (Pensilvânia, USA). Kit ECL-plus e anticorpo secundário anti-coelho conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Inglaterra). Anticorpos monoclonais contra as formas fosforiladas Serina-473 e Threonina-308 da AKT, P-SRC na Tyrosina 416, P-CaMKII na Threonina 286, e anticorpo monoclonal anti-AKT total foram obtidos da Cell Signaling (Madison, USA). O anticorpo policlonal anti-ERK foi obtido da Promega (USA). Os meios e as soluções eram preparados com água da Milli-Q (Millipore) e esterilizados por filtração utilizando filtros de acetato de celulose de 0.2 µm de tamanho do poro. SNAP foi dissolvido em água, outros agonistas e antagonistas foram dissolvidos em água ou DMSO e protegidos da luz para evitar sua decomposição.

3.2. Cultura mista:

Ovos de galinha fertilizados da espécie White Leghorn foram obtidos em uma granja local e mantidos a 38 °C em uma incubadora com atmosfera umidificada. Culturas em monocamada de células de retina de pinto foram preparadas como previamente descrito (de Mello et al., 1978). As retinas de embrião de pinto de 8 dias (E8) foram dissecadas dos demais tecidos oculares, em solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF) (NaCl, 131mM; KCl, 4.0 mM; NaH₂PO₄.7H₂O, 0.92 mM; KH₂PO₄, 0.45mM; glucose.H₂O, 12.2 mM; NaHCO₃, 9.4 mM) e dissociadas quimicamente com tripsina 0,2% em uma solução CMF por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o sobrenadante

era descartado e as retinas eram dissociadas mecanicamente por pipetagem em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 3% de soro fetal bovino inativado termicamente a 56°C/1hora, penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 ng/mL) e glutamina (2mM). Essa suspensão de células era semeada em placas de cultura de 40 mm de diâmetro, em uma densidade aproximada de $1,6 \times 10^4$ células/mm². As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, em 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado com 1 dia de cultura (C1) e mantidas até C3. Em C3 era feita a nova troca de meio com salina Hank's e mantidas por mais 24 horas. As culturas foram visualizadas em um microscópio invertido Nikon Eclipse 2000.

3.3. Cultura purificada de neurônios:

Retinas de embrião de pinto em E8 foram preparadas como descrito anteriormente (Stenkamp et al., 1994). Resumidamente, as retinas eram dissecadas em solução salina de CMF a 37 °C, e incubadas por 10 minutos em tripsina 0.2%. A dissociação das células era feita em meio MEM (1mL) contendo 3% de Soro utilizando uma pipeta Pasteur previamente afilada por 20 vezes. À suspensão de células acrescentava-se 7.5 mL de MEM e procedia-se à contagem das células. A densidade celular foi de aproximadamente 8×10^5 células/ placa. As células foram semeadas em placas de cultivo de 40 mm de diâmetro ($6,4 \times 10^2$ células/mm²), as quais eram previamente tratadas com Poli-L-ornitina em tampão borato pH 8.4. Em seguida, as placas foram mantidas pelo período desejado dentro do dessecador a 37°C em uma atmosfera de 5 % de CO₂.

3.4. Culturas PC12 e SN56.

As culturas PC12 e SN56 foram realizadas no laboratório de neurofarmacologia da UFMG, como descrito anteriormente (Kiozumi et al., 2002). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 10 mL em meio DMEM com alta glicose suplementadas com 1% de penicilina/estreptomicina (P/S), 5% de soro fetal bovino e

5% de soro de cavalo (HS). A cada dois dias era trocado o meio de cultura DMEM e semanalmente transferidas a frascos novos (passagem 1). Na terceira passagem as células eram re-suspendidas com PBS contendo EDTA (1mM). Para os experimentos de imunofluorescência as células eram semeadas em lamínulas pré-tratadas com poliornitina em placas de cultivo de 35 mm de diâmetro (4,0 x10⁵ células/placa). Em seguida, após a diferenciação por 4 dias foram lavadas com PBS (dois vezes) e incubadas com PBS 1 mL para estímulos com SNAP por tempos indicados. Finalmente, as culturas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos e submetidas ao procedimento de imunodeteção das formas fosforiladas da proteína AKT/PKB por imunocitoquímica.

3.5. Tratamento

Após as culturas mistas serem mantidas com solução salina Hank's por 24 horas (E8C4) eram lavadas novamente com solução salina Hank's (1X) e incubadas com 1 mL de Hank's para estudos de fosforilação da AKT, ERK^{1/2}, Src e CaMKII. As drogas utilizadas com o intuito de inibir a via estimulada foram adicionadas a cultura 15 minutos antes da adição dos agonistas usados como estímulo. Para experimentos com NMDA o tratamento era realizado com 1 mL de Hank's sem Magnésio (Mg²⁺). Todos esses procedimentos foram realizados em banho a 37°C. Culturas purificadas com três dias de plaqueamento (C3) eram lavadas com solução salina de Hank's a 37°C e submetidas ao tratamento com o doador de NO (SNAP) ou L-ARG por diferentes períodos de tempos e submetidas a experimentos de imunocitoquímica ou imunofluorescência.

3.6. Ensaio de viabilidade celular (MTT):

A viabilidade celular foi estimada através do ensaio colorimétrico descrito por Mosmann (1983). Neste método, o reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide: tetrazol) é reduzido para formazan púrpura pelas mitocôndrias de células vivas, uma vez que acontece somente quando a enzima reductase mitocondrial está ativa. Deste modo, a conversão do reagente MTT a formazan é diretamente relacionada ao número de células vivas e a efetividade do agente em causar a morte das células pode ser inferida através de uma curva dose resposta. MTT na concentração de 1.5 mg/mL foi adicionado às culturas de células de retina de embrião de galinha em E8C4 com solução salina Hank's por 24 horas. Após 4 horas de incubação, as culturas foram lavadas com solução salina completa (Hank's) a 37°C e a camada de células da placa contendo o formazan insolúvel foi dissolvida numa mistura de HCl 12 N e álcool isopropílico absoluto (6:1). Após este procedimento, a absorvância do material foi determinada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 650 nm.

3.7. Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH):

A integridade da membrana celular de culturas de retina de embrião de galinha incubadas com diferentes drogas foi avaliada pela liberação de LDH no meio de cultura (Hank's). Alíquotas de 50 µl de Hank's foram removidas das culturas E8C4 nos tempos de estímulo estabelecidos. Para a estimativa do conteúdo de LDH intracelular, as células foram lisadas com 1% (v/v) de Triton X-100 ao final dos experimentos. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada em mistura de reagentes contendo lactato (substrato), NAD, metasulfato de fenazina (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, contidos todos no kit de dosagem da Doles para análises clínicas. Após o procedimento e ao final da incubação com os reagentes, a liberação de LDH foi estimada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 510 nm.

3.8. Fragmentação de DNA:

A fragmentação de DNA foi determinada pela técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5%. A extração de DNA foi realizada mediante o protocolo do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Depois que as culturas foram tratadas com as drogas, foi retirado o meio de cultura e a monocamada celular foi colocada em tubo eppendorf para ser centrifugado a 3000 rpm por 3 minutos e o pellet reservado. Em seguida, as células foram lisadas com Tampão de Digestão (600 µL) [NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%] e o lisado colocado no eppendorf contendo o precipitado obtido da centrifugação anterior. Em seguida, foi incubado overnight a 53 °C e colocado em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), em uma proporção de 1:1, centrifugado a 13 500 rpm por 10 minutos e precipitado com isopropanol (2.5 x). O DNA obtido foi secado e hidratado em tampão TAE (Tris-acetato 400 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) e submetido a eletroforese em gel de agarose. O gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/ml) e visualizado sob luz Ultra Violeta.

3.9. Western blot

3.9.1 Preparo das amostras:

Após os períodos de incubação e tratamento com os agonistas ou antagonistas, as culturas eram lavadas duas vezes com Hank's, o material celular recolhido em 50 µL de tampão de amostra de para electroforese e transferido para tubos eppendorf. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e em seguida congeladas a -20 °C.

3.9.2 Dosagem de proteína (Método de Bradford):

A quantidade de proteína total presente no homogeneizado era medida pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (Albumina de Soro Bovina) como padrão. Uma vez determinada a concentração de proteína de cada amostra, foi adicionado o corante azul de bromofenol em uma concentração de 0.1%. Quantidade

de amostras determinadas (40 µg/µL) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% contendo SDS (Laemmli, 1970).

3.9.3 Eletroforese:

As amostras eram submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE 9%. Após a separação das proteínas o gel era justaposto a uma membrana PVDF e as proteínas transferidas à 45 Volts durante 1 hora, em tampão de transferência contendo Tris 25 mM, glicina 192 Mm e metanol 10% (V/V). Depois da transferência, as membranas eram coradas com solução de Pouceau para visualização das proteínas. Em seguida, as membranas eram lavadas em solução tampão de Tris (TBS) pH 7,6 e submetidas ao procedimento de imunodeteção das formas fosforiladas das proteínas: AKT/PKB, ERK^{1/2}, Src e CaMKII.

3.9.4 Imunodeteção de proteínas com anticorpos específicos:

Para imunodeteção, as membranas eram submetidas a um bloqueio de sítios inespecíficos com solução TBS contendo Tween 0,1% e 5% de leite desnatado (Molico), por 1 hora (TBS-T). Em seguida, as membranas eram lavadas em TBS-T e incubadas com anticorpo monoclonal AKT na serina-473 ou treonina-308 (de coelho) na diluição de 1:1500 em solução TBT-T, por 24 horas a 4 °C. No dia seguinte, após 3 lavagens por 10 minutos com TBS-T, as membranas eram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG Horserdish conjugado à peroxidase na diluição de 1:2000 em TBT-T em 5% de leite por 1 hora à temperatura ambiente. A detecção do complexo antígeno/anticorpo nas membranas era visualizada através de ensaio de quimioluminescência (ECL-plus da Amersham) utilizando filme e raios X, revelador e fixador GBX da Kodak.

Para a realização do controle do carregamento, após a revelação, as membranas foram lavadas em TBS e, em seguida, incubadas em uma solução “Stripping”

(glicina 0,2 M a pH 2,2) por 1 hora para a remoção dos anticorpos ligados à membrana. Após este período, as membranas foram lavadas por 3 vezes em TBS e, em seguida, realizou-se o mesmo procedimento de bloqueio e incubação com os anticorpos descritos.

3.9.5 Análise dos resultados:

As imagens obtidas na revelação dos filmes eram digitalizadas e analisadas pelo programa Scion Image, a fim de quantificar a densidade óptica das bandas relativas a cada proteína. Os dados obtidos eram expressos em porcentagem do controle da relação P-AKT/AKT, e, finalmente processados pelo programa GraphPad Prism versão 4.03, para análise quantitativa do nível de fosforilação de AKT em cada amostra.

3.10. Ensaio da captação de Cálcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$):

Culturas purificadas de neurônios de retina eram mantidas por 3 dias (E8C3) quando era realizada lavagem das placas com Hank's (2 vezes). Em seguida, a cultura era incubada com [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] (1 $\mu\text{Ci/ml}$) por 3 minutos a 37 °C em presença ou ausência de SNAP (100 μM) ou L-ARG (1mM). As culturas eram pré-incubadas com os inibidores por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e lisadas com 0.05 N de NaOH. A radioatividade foi determinada por cintilação líquida. Os dados obtidos eram expressos em CPM e processados pelo programa GraphPad Prism versão 4.03, para a variação quantitativa.

3.11. Quantificação de nitrito (Reação de Griess):

Culturas de células de retina E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas foram lavadas duas vezes com Hank's (2x) e em seguida as células lisadas com NaOH (200 μL) mais ZnSO_4 (250 μL) por 15 minutos/placa de 40 mm, para desproteinizar o conteúdo celular. Em seguida foram centrifugadas e o sobrenadante pré-incubado por 1

hora com cádmio carregado (Cd^{2+} carregado: 50 mg de Cd^{2+} metálico em CuSO_4 por 1 hora) e aproveitado para a redução do nitrato (NO_3) para o nitrito (NO_2). Após este procedimento, foram realizadas as dosagem de NO_2 pela reação de Griess e a absorbância do material foi determinada em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 540 nm.

3.12. Imunocitoquímica:

As culturas purificadas de neurônios de retina de embrião de oito dias (E8C3) foram plaqueadas sobre lamínulas pré-tratadas por 24 horas com 50 $\mu\text{g/ml}$ de Poli-L-ornitina. Após incubação, com as drogas, as células foram lavadas duas vezes com Hank's e fixadas com paraformaldeído 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS), por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS e incubadas por 1 hora com solução de bloqueio (3% BSA, 3% SBF e 1% de triton X-100 em PBS). As membranas com anticorpos primários (1:100 anti-P-AKT, P-Src^{Tyr-416} e P-CaMKII^{Thr-286}) foram incubadas por 24 horas em câmara úmida. Após esta incubação as lamínulas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com PBS, e incubadas com anticorpo secundários conjugados fluorescentes (anti-coelho Alexa-488) por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes por 10 minutos com PBS, e incubadas por 30 segundos com solução DAPI (1:1000). As membranas com anticorpos lamínulas foram montadas sobre laminas com hidromount como meio e, então, visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Apotome.

3.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 4.03, no qual utilizamos os seguintes testes: análise de variância (ANOVA), teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Células de retina em culturas (E8C4), incubadas com Hank's por 24 horas diminuem o nível de fosforilação basal da AKT/PKB.

Dados anteriores de nosso laboratório demonstraram que o estresse celular induzido pela troca de meio promove extensa morte por apoptose em células neuronais em cultura (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001; Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Além disso, cascatas de sinalização intracelular envolvendo ERK $\frac{1}{2}$, PI3K e CaMKII são ativadas e participam da sobrevivência e diferenciação nas culturas purificadas de neurônios quando tratadas com doadores de NO (SNAP e GSNO) (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). No início deste trabalho, realizamos ensaios preliminares objetivando estabelecer um protocolo de estudo para investigar como o NO ativaria a via PI3K/AKT comprometida na neuroproteção celular.

Nesse contexto, sabe-se que em células neuronais e outros tipos celulares, ativação da AKT/PKB é dependente da presença de fatores tróficos no meio de cultura (Lim et al., 2007). Na Fig 1A, são mostradas as fotomicrografias de contraste de fase de culturas mistas em monocamada de embrião de galinha de E8C4, tratadas com 3% de soro fetal bovino [3% FBS (a)], culturas que em C3 tiveram seu meio trocado por meio fresco livre de soro e depois mantidas por 24 horas [Free-FBS (b)], ou culturas que foram incubadas em solução salina Hank's por 24 horas novamente de C3 a C4 [Hank's (c)]. Como se pode observar, células de retina em cultura com solução salina Hank's ou livre de soro (Free-FBS) não apresentaram sinal de morte celular aparente. Essa observação foi confirmada quando as culturas foram avaliadas pelo ensaio de viabilidade de MTT ou liberação de LDH intracelular (Fig. 1D). Esses dados de morte celular foram reavaliados pela técnica de fragmentação de DNA em gel de agarose, onde se pode observar que a incubação na ausência de soro ou incubadas em solução

salina Hank's não resultaram quebra do DNA quando comparadas com as culturas tratadas com H₂O₂ por 30 minutos como controle positivo (Fig. 1E). Por outro lado, a fosforilação da AKT foi dramaticamente reduzida em ambos os sítios da Thr308 e Ser473 somente na situação com solução salina Hank's por 24 horas (Fig. 1B). Surpreendentemente, não ocorreu nenhuma mudança do nível basal da fosforilação da AKT em cultura privada de soro por 24 horas (Free-FBS) quando comparadas com as culturas com 3% FBS (linhas 1 e 2 da Fig. B). O nível de fosforilação de outras proteínas cinases como ERK1/2 e Src também apresentou o mesmo perfil de diminuição após da incubação com Hank's por 24 horas (Fig. 1C). Esses resultados sugerem a ação de fatores de crescimento na manutenção do nível da fosforilação basal de proteínas serina treonina cinases. Por outro lado, estabelecemos um bom modelo de estudo para poder investigar o papel do NO na fosforilação da AKT/PKB, em situação de solução salina Hank's por 24 horas em nossas células de retina em cultura.

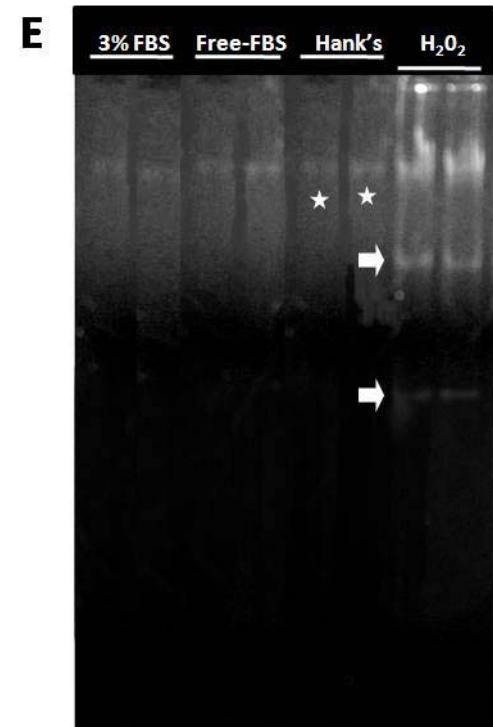
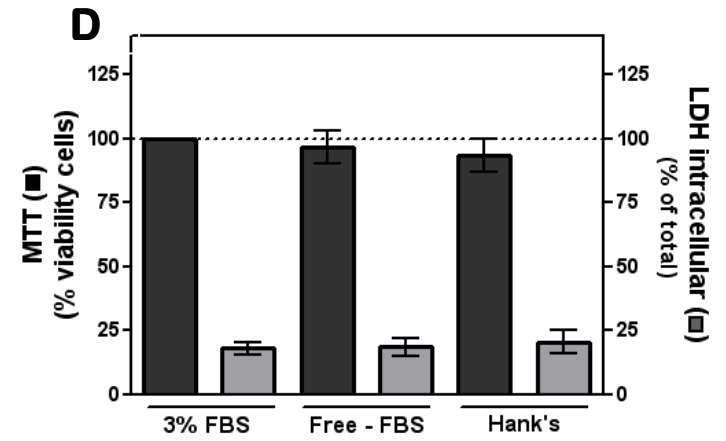
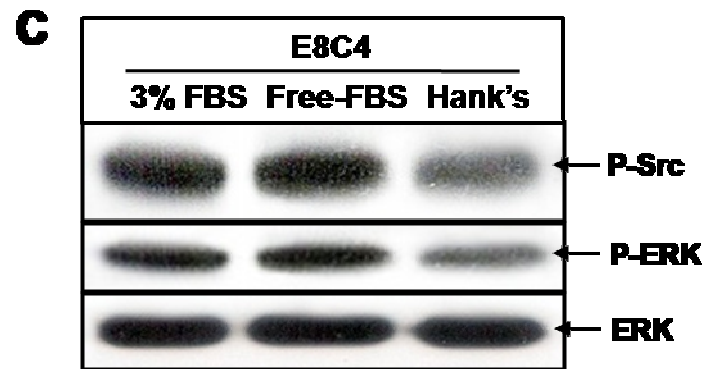
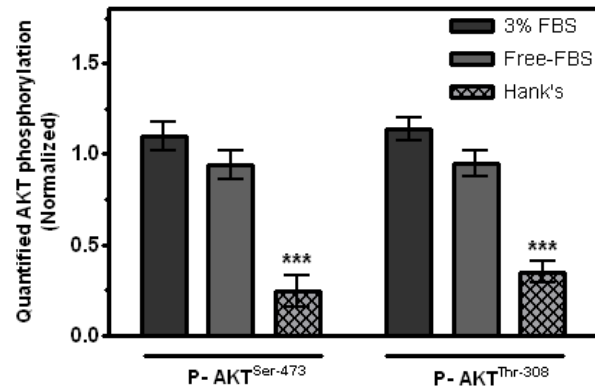
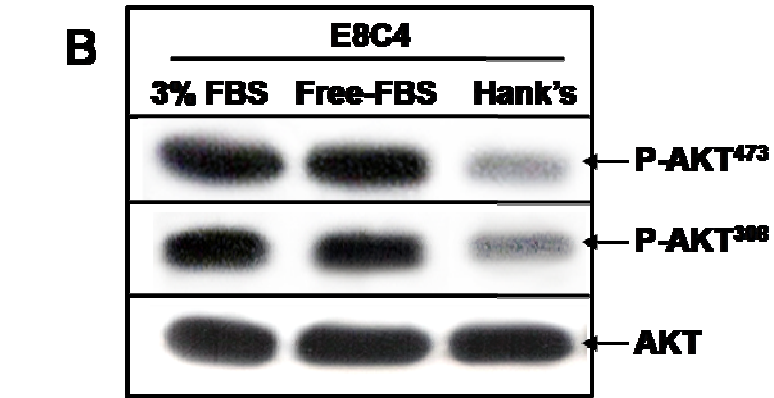
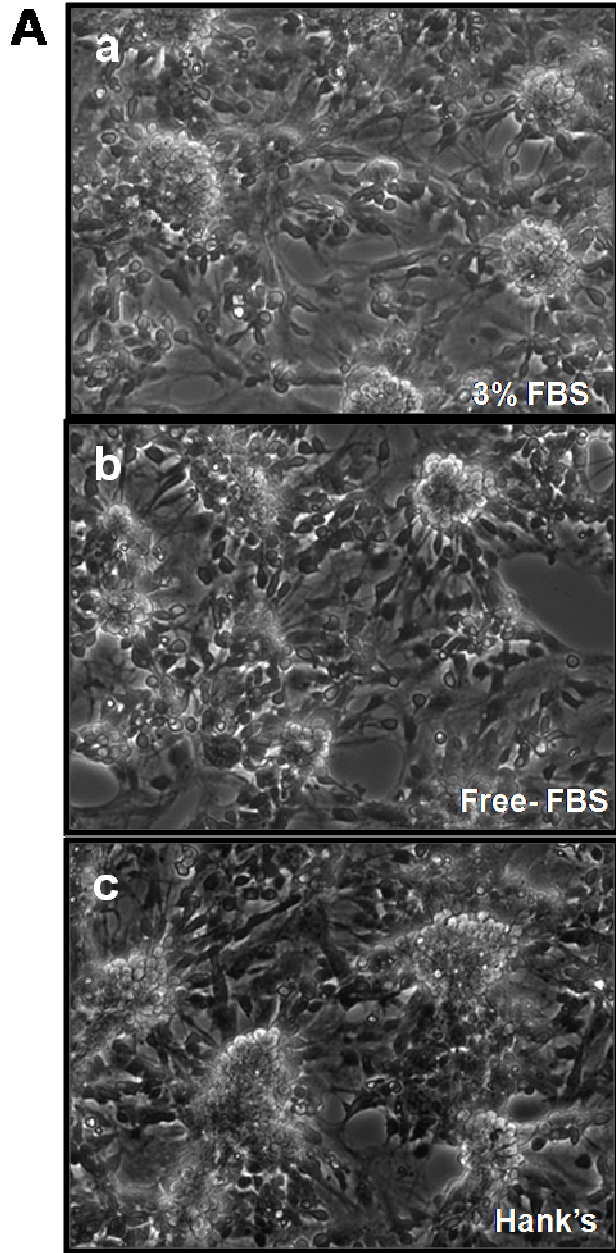


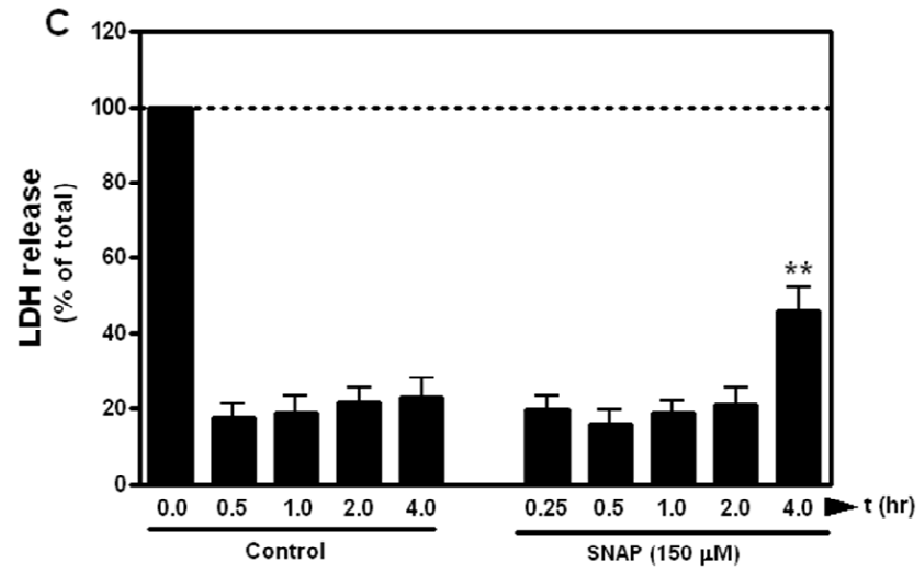
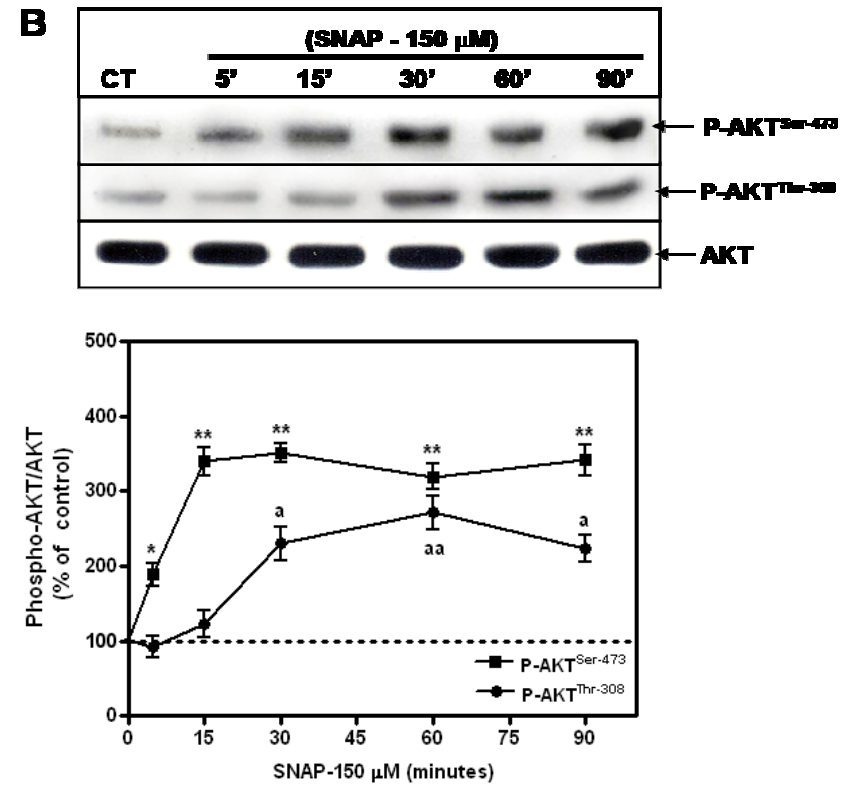
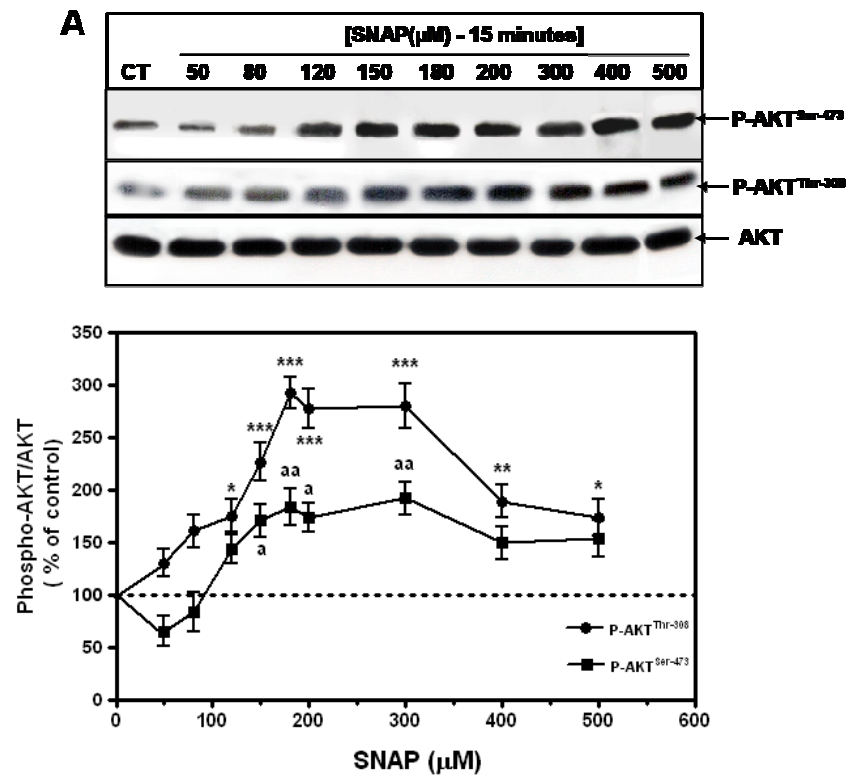
Figura 1. Culturas incubadas em solução salina Hank's por 24 horas promovem diminuição no nível de fosforilação basal de proteínas serina treonina cinases. A) Fotomicrografias de contraste de fase das culturas mistas de E8C4 tratadas com soro [3% FBS (a)], na ausência de soro por 24 horas de C3 a C4 [Free-FBS (b)] ou incubadas com Hank's por 24 horas (c). As culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% e visualizadas com um microscópio invertido de fluorescência. B e C), Imagens representativas de blots mostrando a diminuição da P-AKT tanto na Ser473 e Thr308 e outras proteínas cinases P-ERK e P-Src quando as culturas eram incubadas com Hank's por 24 horas. D) A viabilidade celular foi determinada pela redução de MTT (■) e a liberação intracelular de LDH (▣). E) Nenhum sinal de morte é observado quando as culturas eram avaliadas pela fragmentação de DNA em gel de agarose tanto nas culturas em que foram incubadas com Hank's (*) ou mantidas livre de soro quando comparadas com culturas tratadas com H₂O₂ (1 mM) por 30 minutos (▶) (n=4). Os dados representam a média ± SEM. Os asteriscos denotam ***p≤0,001 quando comparados com 3% FBS. (60 µg/µL de proteína por linha para as proteínas fosforiladas).

4.2. SNAP, doador de NO exógeno promove a fosforilação da AKT/PKB

Com o objetivo de verificar o papel do NO na fosforilação da AKT/PKB, realizamos experimentos de dose-resposta em nossas culturas de retina através da técnica de Western blot para registrar a marcação nos sítios ativos da Thr-308 e Ser-473 da AKT/PKB. Culturas mistas mantidas por três dias (E8C3) foram incubadas com solução salina de Hank's por 24 horas e mantidas até o quarto dia (C4). Em seguida mantidas com 1 mL de Hank's para tratamentos com diferentes concentrações de SNAP por 15 minutos (50, 80, 120, 150, 180, 200, 300, 400 e 500 μM), um doador espontâneo de óxido nítrico (NO). A análise densitométrica do nível da fosforilação da AKT/PKB da Fig. 2A demonstra que nas concentrações inferiores de 50 e 80 μM não promove ativação significativa de fosforilação desta proteína. Por sua vez, concentrações de 150, 180, 200 e 300 μM promoveram fosforilação da AKT/PKB na Ser-473 (170,69 \pm 15,38%; 183,12 \pm 17,45%; 173,52 \pm 13,5%; 192,15 \pm 15,40% do controle respectivamente) ou concentrações de 120, 150, 180, 200 e 300 μM na Thr-308 (175,0 \pm 15,67%; 226,84 \pm 17,56%; 292,76 \pm 14,73%; 277,89 \pm 18,49%; 279,52 \pm 21,30% do controle) dentro de um intervalo de 15 minutos (Fig. 2A). Entretanto, concentrações de SNAP superiores a 300 μM promoveram a fosforilação da AKT/PKB em Ser-473, do que a Thr-308, em níveis inferiores aqueles observados para menores concentrações da droga. A fosforilação da AKT/PKB alcançou o maior nível nas concentrações de 150 μM para Ser-473 ou 180 μM para Thr-308. Deste modo, os experimentos posteriores foram realizados com a concentração de 150 μM de SNAP.

A curva temporal de fosforilação da AKT em ambos os sítios também foi caracterizada em resposta ao SNAP. A Fig. 2B demonstra que dentro do período de 5 minutos já ocorreu uma resposta inicial significativa. O nível mais alto de fosforilação foi alcançado entre 15 e 30 minutos e a AKT/PKB manteve-se fosforilada em nível

mais fosforilado que o controle até pelo menos 90 minutos após o estímulo. Após esse período de tempo, o nível de fosforilação da AKT/PKB permaneceu constante por mais 30 minutos e diminuiu gradualmente até níveis do controle (dados não mostrados). Vale a pena ressaltar que nossos dados anteriores mostram que concentrações de 100 ou 120 μM de SNAP resultam em produção de NO extracelular de $0,620 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ enquanto o nível controle foi de $0,19 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$. Após 1 hora e 24 horas, os níveis foram de $0,920 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ e $0,804 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$, enquanto os níveis do controle foram de $0,19 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$ e $0,42 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$ respectivamente). Estes resultados estão de acordo com o nível estável de fosforilação da AKT/PKB obtido após os 90 minutos (Mejia-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Para descartar qualquer sinal de morte nesses determinados tempos de exposição das culturas à concentração de 150 μM de SNAP, foram realizados experimentos de viabilidade celular através da liberação de LDH. Como se mostra na Fig. 2C, nenhuma morte celular aparente ocorreu até pelo menos 1 hora de tratamento com SNAP. Um aumento da liberação de LDH ocorreu após 2 ou 4 horas de tratamento (Fig. 2C) ocorrendo também formação de núcleos picnóticos quando as culturas eram avaliadas pela marcação com brometo de etidium (dados não mostrados). Imagens representativas das culturas purificadas (E8C4) submetidas à técnica de imunocitoquímica para marcação com anticorpo P-AKT^{Ser-473} com ou sem tratamento de SNAP em diferentes tempos são mostrados na figura 2D. Repare a fosforilação gradual em 15, 30 e 45 minutos (setas) assim como sua ativação sustentada até os 60 minutos. Todos esses dados sugerem que o procedimento experimental através do tratamento com SNAP (150 μM) não alterou a morfologia celular por pelo menos 2 horas a mais após as culturas serem incubadas com Hank's por 24 horas.



D

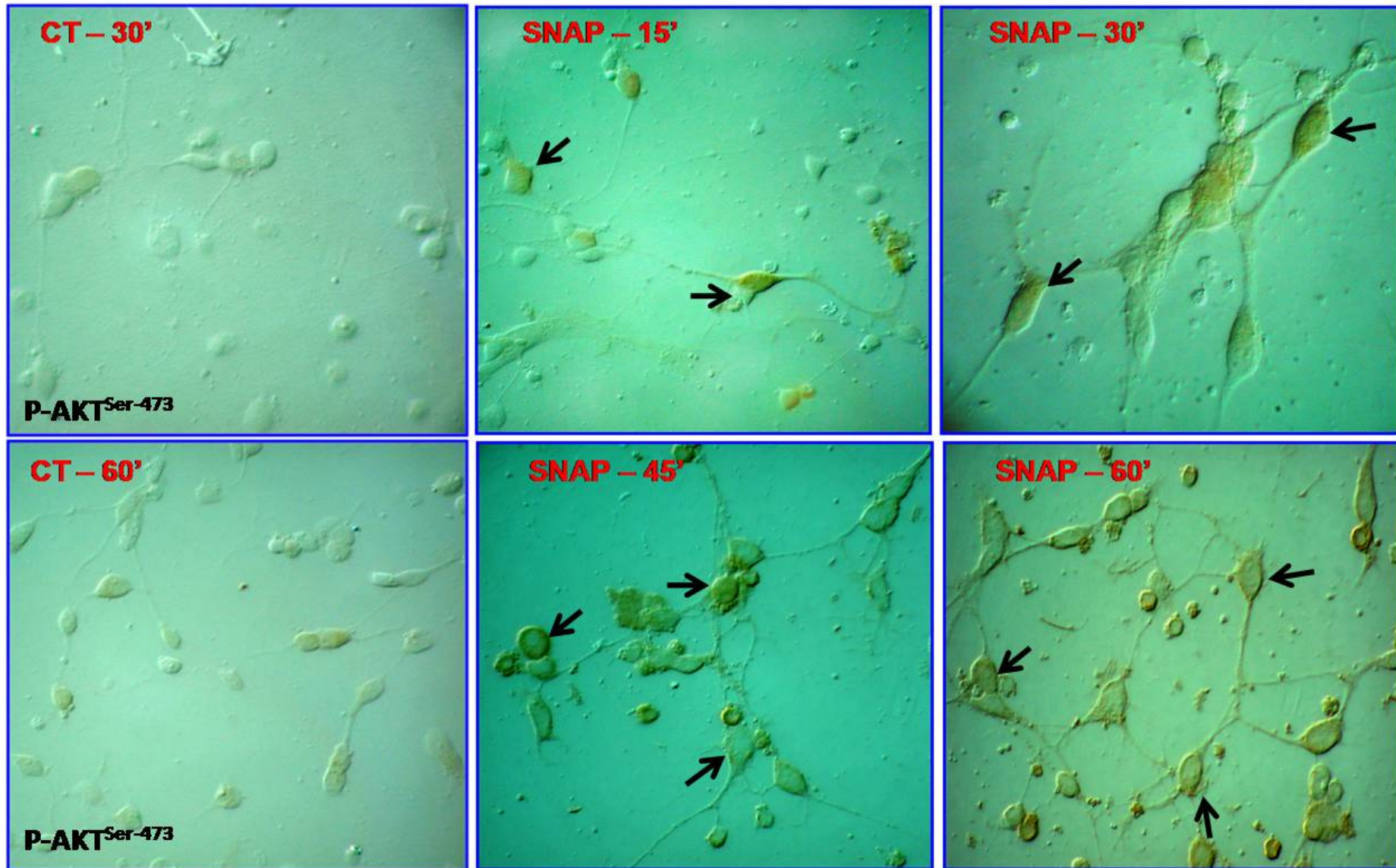


Figura 2. SNAP, doador de NO exógeno, estimula a fosforilação da AKT/PKB de maneira dependente de dose e tempo. Imagem representativa e análise densitométrica de blots de P-AKT para a Ser-743 (■) e Thr-308 (●), obtidas de amostras celulares de culturas mistas E8C4 com Hank's por 24 horas. As culturas foram submetidas a uma curva de concentração de SNAP por 15 minutos (A). Note o perfil de ativação máxima induzido por SNAP a 150 μ M e 180 μ M para Ser-473 e Thr-308, respectivamente. Em B, é mostrada a curva temporal de fosforilação da AKT/PKB com 150 μ M de SNAP. Observe um nível de ativação máxima em 15 minutos e prolongada até pelo menos 90 minutos. C, A viabilidade celular foi determinada pela liberação de LDH quando as culturas foram tratadas com 150 μ M de SNAP por até 4 horas. O asterisco denota $**P\leq 0,001$ quando comparado com o controle 4 horas (n=3). D, Imagem representativa das culturas purificadas (E8C4) sometidas à técnica de imunocitoquímica (n=1) para marcação com anticorpo P-AKT^{Ser-473} com ou sem tratamento com SNAP (D). Observe um aumento progressivo da fosforilação em 15, 30, 45 e 60 minutos (setas). Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos realizados em separado (n=3). Os asteriscos representam em: (A), $*P\leq 0,05$, $**P\leq 0,01$, $***P\leq 0,001$ e $aP\leq 0,05$, $aaP\leq 0,01$. (B), $*P\leq 0,01$, $**P\leq 0,001$ e $aP\leq 0,01$ $aaP\leq 0,001\%$ do controle respectivamente. (60 μ g/ μ L de proteína por linha).

4.3. Efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB está associado com a produção de GMP cíclico.

A fim de que pudéssemos estudar as vias bioquímicas mediadoras do efeito do NO na fosforilação da AKT/PKB decidimos caracterizar primeiramente o papel do sistema clássico do NO/GMP cíclico, em nossas culturas utilizando concentrações diferentes de zaprinast (Zaprin), um inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5), por um período de 15 minutos. Nas Fig. 3A e B, estão mostradas a curva de concentração e a cinética temporal de fosforilação de serina-473 da P-AKT induzida pelo Zaprin. Note que as concentrações de 40 μM ($251,6 \pm 15,38\%$), 100 μM ($261,29 \pm 13,87\%$) ou 150 μM ($293,55 \pm 15,84\%$) de Zaprin promoveram uma fosforilação máxima semelhante à obtida com SNAP ($303,23 \pm 16,27\%$) ou a L-ARG ($267,74 \pm 13,45\%$) (Fig. 3A). Entretanto a curva temporal com 60 μM de Zaprin mostrou um pequeno aumento da fosforilação a partir dos 5 minutos e aos 15 minutos a fosforilação atinge uma magnitude significativamente mais elevada, permanecendo constante até os 60 minutos (Fig. 3B). Na situação controle, tanto em 15, 30 ou 60 minutos, os níveis da P-AKT não mudam significativamente (Fig 3A, B, C e E). Para verificar a possibilidade dos efeitos do NO serem desencadeados pela ativação da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) e produção de GMP cíclico (GMPc), as culturas foram tratadas por diferentes tempos com um ativador direto da enzima GCs (YC-1), que é capaz de produzir GMP cíclico (Fig. 3C). A análise cinética da fosforilação demonstrou que em 5 minutos o YC-1 promoveu um aumento pequeno do nível de fosforilação, atingindo um máximo em 15 minutos e retornando aos níveis basais aos 60 minutos ($81,91 \pm 16,45\%$ do controle). O aumento dos níveis de GMP cíclico podem também ser mimetizados com o tratamento das culturas com 8Br-GMPc, que é um análogo estável e não metabolizável pela enzima PDE. Foi observado que a fosforilação induzida pelo 8Br-GMPc (40 μM) é também rápida sendo observado em 5 minutos de estímulo

(193,88±17,58%) (Fig. 3D), um efeito parecido ao observado com Zaprin (Fig. 3B) ou YC-1 (Fig. 3C). O nível de fosforilação nesse caso permaneceu constante mesmo após 45 ou 60 minutos de estímulo.

A fim de que pudéssemos comprovar melhor o envolvimento da via clássica do NO, resolvemos pré-incubar as culturas por 15 minutos com ODQ ou LY83583, dois inibidores da GCs. A Fig. 3E mostra claramente que o efeito do SNAP na fosforilação da ATK/PKB é inibido até o nível do controle quando as culturas foram pré-tratadas com 5 µM de ODQ (75,74±13,56%) ou 2 µM de LY83583 (86,81±15,78%). Um potente inibidor da PKG (KT5823), na concentração de 2 µM, também promoveu uma inibição completa do estímulo com SNAP (74,40±17,54%), sem porém alterar os níveis basais de fosforilação da AKT/PKB (dado não mostrado). Todas essas observações em conjunto sugerem que o NO exógeno promove a fosforilação da AKT/PKB via ativação da GCs, com aumento subsequente de GMP cíclico e da atividade da PKG.

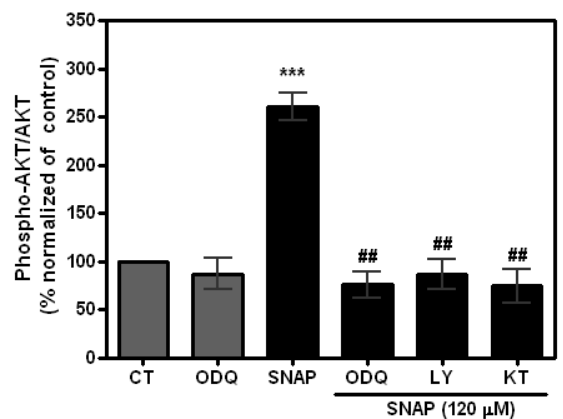
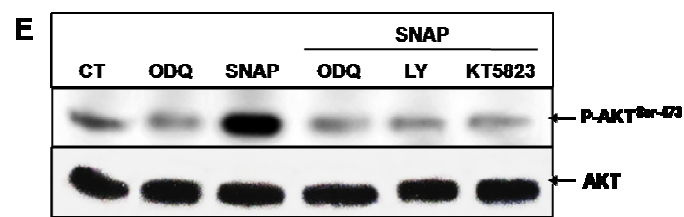
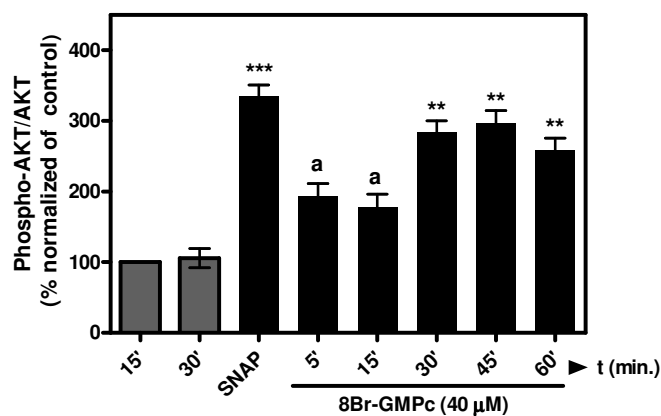
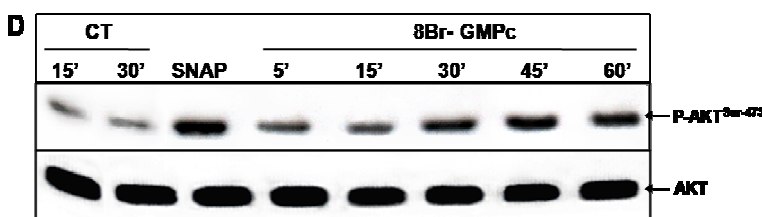
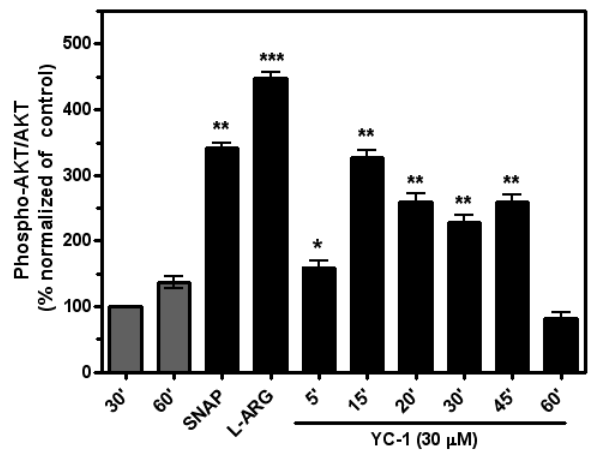
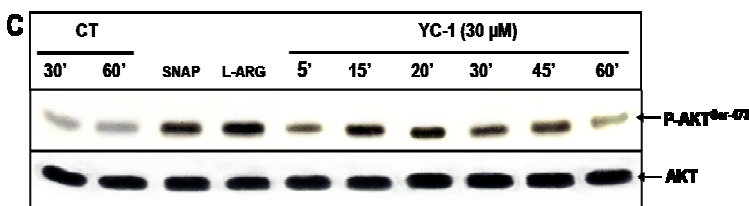
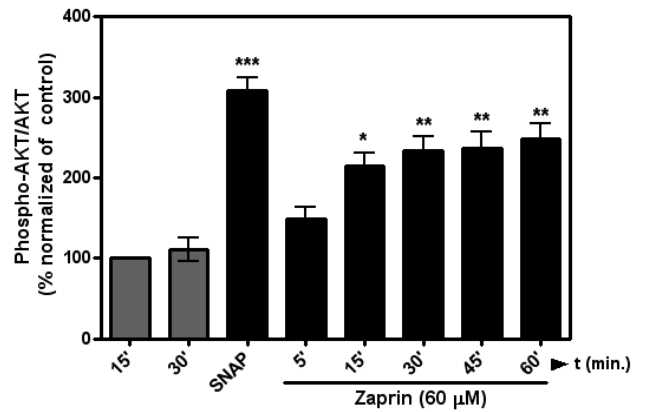
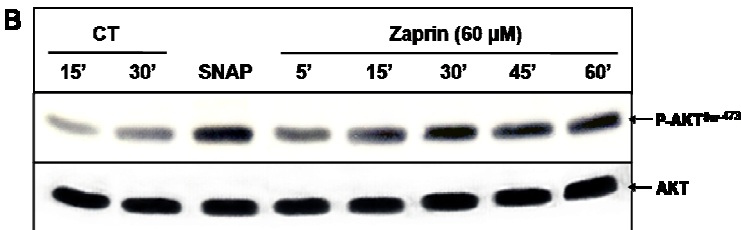
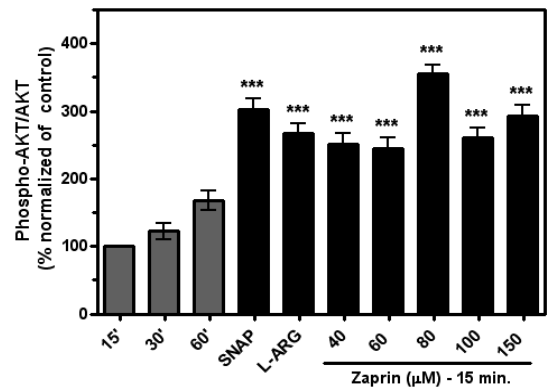
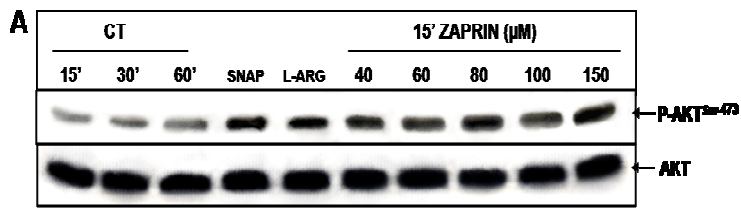


Figura 3. Produção de GMP cíclico e ativação da PKG participam na fosforilação da AKT/PKB induzido por NO. Imagem representativa dos blots da P-AKT realizadas nas culturas mistas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações de Zaprin por 15 minutos (A) ou por tempos diferentes com 60 μ M de Zaprin (B), com 30 μ M de YC-1 (C) ou com 40 μ M de 8Br-GMPc (D). Os inibidores da GCs, ODQ (5 μ M) e LY83583 (2 μ M) ou inibidor da PKG (KT5823), aboliram completamente o efeito do SNAP (E). Os resultados quantitativos são mostrados ao lado (em A,B e C) ou abaixo (D e E) e representam a média \pm SEM de três experimentos distintos. Os asteriscos representam significância estatística *** $P\leq 0,0001$; ** $P\leq 0,001$; * $P\leq 0,01$; a $P\leq 0,05$, em relação ao controle, ## $P\leq 0,001$ em relação ao SNAP. (60 μ g/ μ L de proteína por linha).

4.4. Tratamento com L-ARG mimetiza o efeito de NO exógeno na fosforilação da AKT/PKB.

A produção de NO pelas células neuronais de embrião de galinha foi bem caracterizada quando as culturas purificadas foram tratadas com L-ARG, um substrato da enzima Óxido Nítrico Sintase de tipo neuronal (nNOS) (Cossenza et al., 2000 e 2006). Culturas em solução salina e tratadas com diferentes concentrações de L-ARG por 15 minutos de modo que as células produzissem NO intracelular mostraram aumento da fosforilação da AKT/PKB na Ser-473 induzidas pela L-ARG a partir da concentração de 0,5mM ($239,93 \pm 24,65\%$ do controle) (Fig. 4A). Esta fosforilação se manteve no mesmo nível constante com 1 e 1,5 mM de L-ARG ($229,28 \pm 12,54\%$ e $199,09 \pm 20,76\%$ respectivamente), ocorrendo uma diminuição ao nível do controle nas concentrações de 2 ou 3 mM, talvez por ocorrer uma excitotoxicidade induzida pelo exagerado aumento da concentração intracelular de NO produzida (ver discussão). Por outro lado, L-ARG ou SNAP quando adicionado em separado promoveram a mesma porcentagem de fosforilação da AKT/PKB em relação ao controle ($229,28 \pm 20,76\%$ e $197,43 \pm 14,77\%$ respectivamente) (Fig. 4A).

Experimentos de curva temporal e a análise densitométrica das bandas observadas a partir das culturas tratadas com L-ARG (1 mM) são mostradas na Fig. 4B. A L-ARG promoveu a fosforilação da AKT/PKB a partir de 5 minutos e chegou a atingir sua máxima ativação em 15 e 30 minutos. Após esse período ocorreu uma diminuição, mas permanecendo alta em relação ao controle até pelo menos às 2 horas (Fig. 4B). Estudos sobre a viabilidade celular pela técnica de MTT, não mostraram nenhum sinal de morte quando as culturas eram incubadas por 1, 2, 3 ou 4 horas com 1 mM de L-ARG (Fig. 4C). Esses dados sugerem que a L-ARG (1 mM) induz a produção de NO endógeno e conseqüente fosforilação da AKT/PKB em nossas cultura.

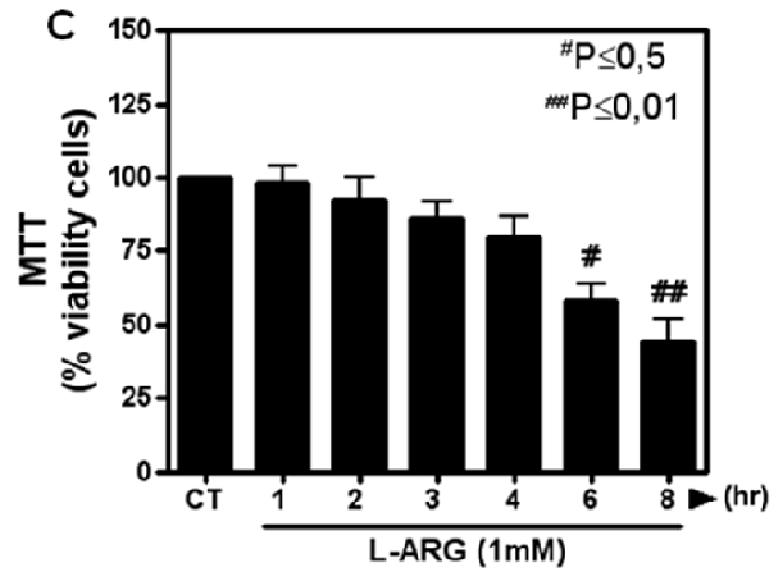
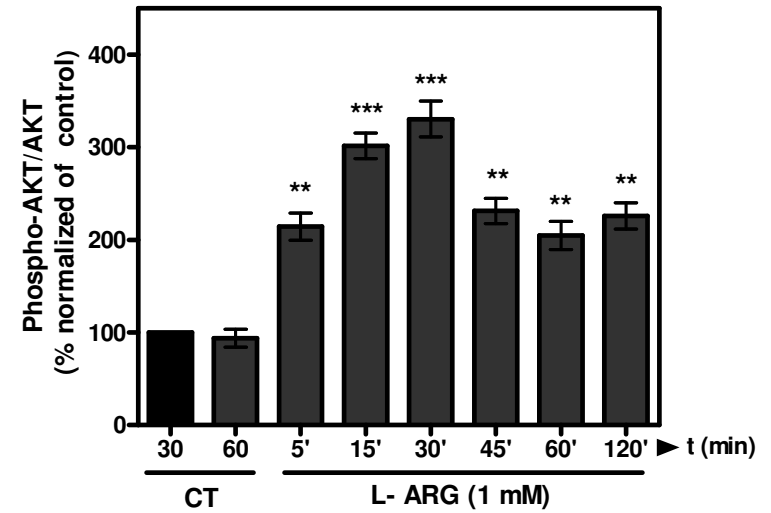
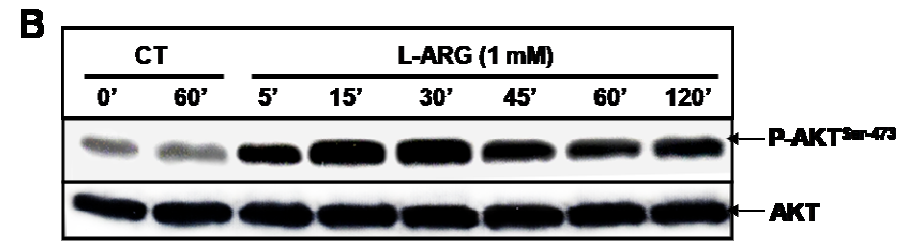
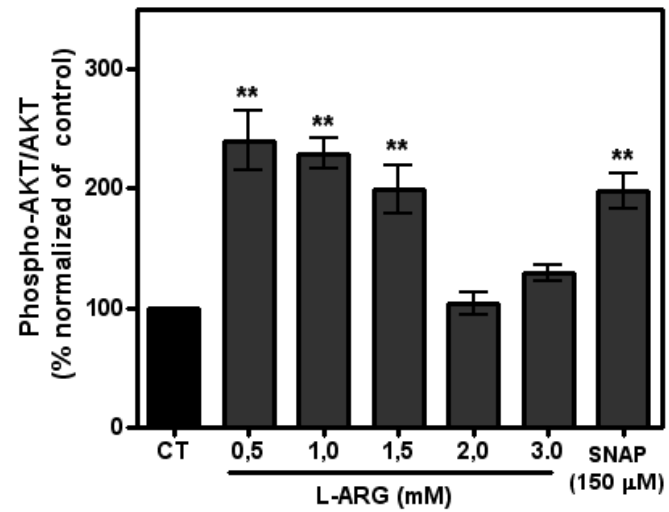
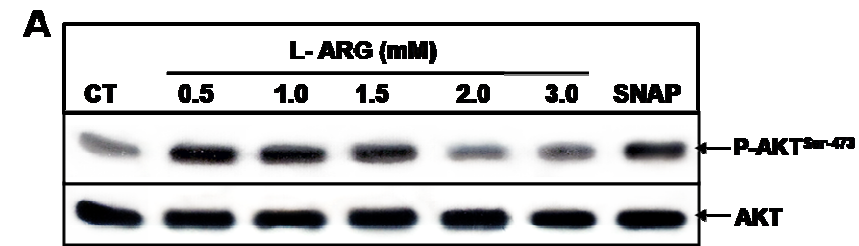


Figura 4. Efeito da produção de NO intracelular induzida pela L-ARG na fosforilação da AKT/PKB. Culturas incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas com L-ARG em concentrações diferentes por 15 minutos e avaliadas pela técnica de Western blot para imunoreatividade no sítio da Ser-473 da AKT/PKB. (A) A análise das bandas obtidas com diferentes concentrações de L-ARG mostra uma fosforilação constante entre 0,5; 1 e 1,5 mM de L-ARG. Em B, é mostrada a cinética temporal quando as culturas foram tratadas com 1 mM de L-ARG. Em 5 minutos da incubação já ocorreu uma ativação característica que chega ao máximo aos 15 e 30 minutos. A viabilidade celular foi determinada pela redução de MTT (C). Os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos realizados por separado (n=3). Os asteriscos denotam $**P \leq 0.001$, $\#P \leq 0,05$, $\#\#P \leq 0,01$ quando comparados com o controle. (60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína por linha).

4.5. Formação do NO endógeno via ativação da nNOS contribui na fosforilação da AKT/PKB

Para confirmar a possibilidade do NO ser fornecido pela atividade intracelular da enzima (nNOS) as culturas foram pretratadas por 15 minutos com diferentes inibidores da NOS. Na Fig. 5A se mostra que o inibidor geral e de amplo espectro da NOS (L-NAME), nas concentrações de 100, 200 e 300 μ M, aboliram totalmente a estimulação da AKT/PKB induzida pela L-ARG (1 mM) em ambos os sítios. Outro inibidor (NARG) em diferentes concentrações (200, 400 e 600 μ M) demonstrou o mesmo efeito inibitório (Fig. 5B). Esses dados foram confirmados quando as culturas foram também pré-tratadas com dois inibidores específicos da nNOS (L-NIO e 7-NI) por 15 minutos. Na Fig. 5C, é mostrado que nas concentrações de 30, 50 e 80 μ M de L-NIO, ocorre inibição total do estímulo induzido pela L-ARG, tanto na Ser-473 (128,04 \pm 14,64%, 115,852 \pm 18,32%, 127,940 \pm 13,405% do controle) quanto na Thr-308 (137,090 \pm 17,38%, 131,060 \pm 13,05%, 127,857 \pm 21,49%). As concentrações 5 e 10 μ M de 7-NI, também provocaram inibição na Ser-473 (54,230 \pm 17,94%, 59,570 \pm 17,77%) e na Thr-308 (100,850 \pm 15,47%, 84,990 \pm 14,69%), porém sem nenhuma mudança nos níveis de fosforilação basal nas culturas tratadas com esses inibidores isoladamente.

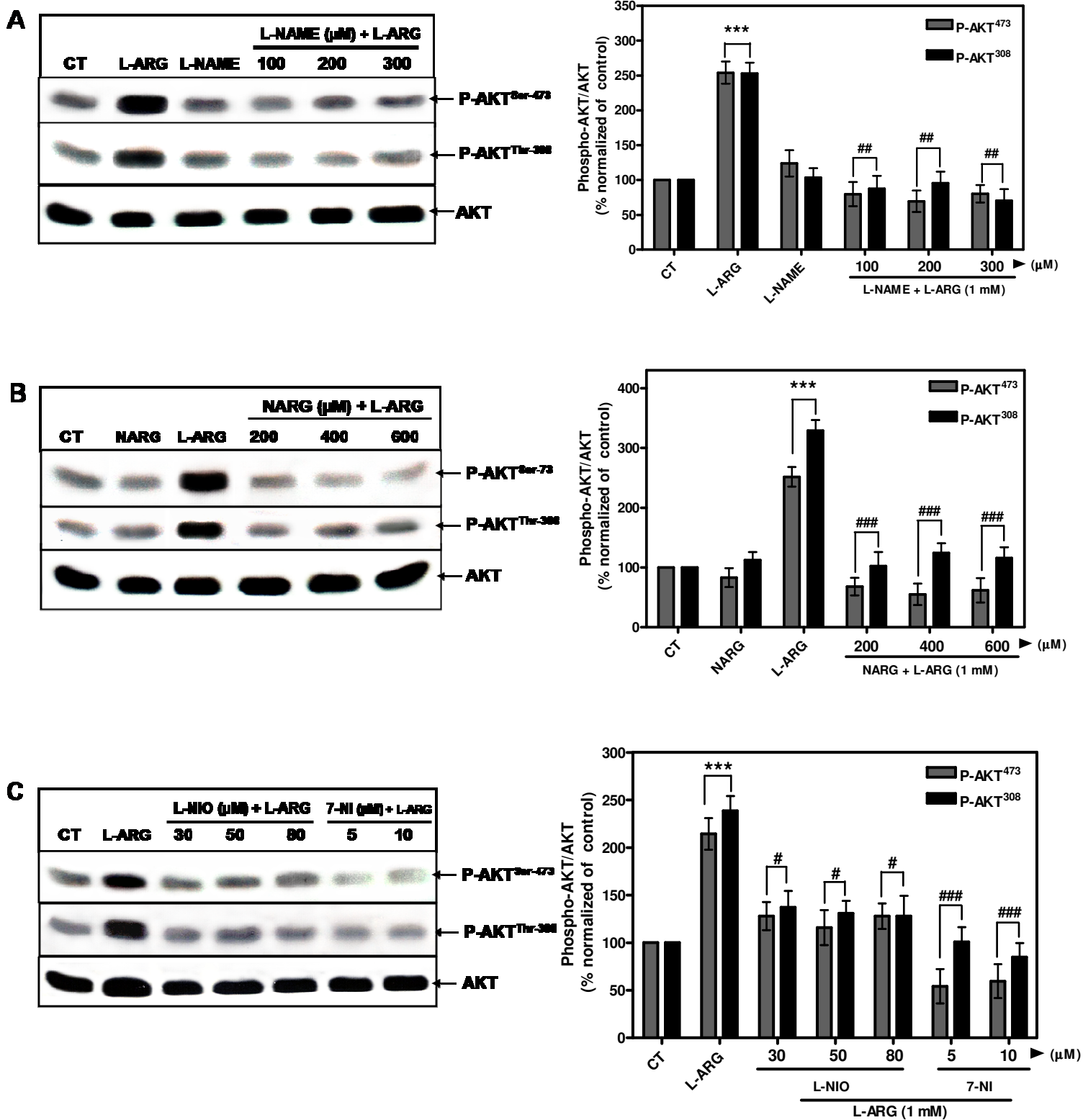


Figura 5. Formação do NO endógeno via ativação da nNOS contribui na fosforilação da AKT/PKB. Culturas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas por 15 minutos com vários inibidores da NOS. (A), Análises das bandas em culturas tratadas com L-NAME (100, 200 e 300 μ M) onde se nota o bloqueio na fosforilação da ATK/PKB. A inibição também acontece na presença de NARG (200, 400 e 600 μ M) (B). O inibidor específico da nNOS (L-NIO, 7-NI) também aboliu o estímulo gerado pelo tratamento com L-ARG na fosforilação da AKT/PKB. Os asteriscos representam *** $P < 0,001$ em relação ao controle, ### $P < 0,001$, # $P < 0,01$ relativo à L-ARG (n=2).

4.6. A fosforilação da AKT/PKB induzida por Glutamato.

Vários estudos demonstraram que a expressão de receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico (iGluRs) ocorre em diferentes populações neuronais da retina “in vivo” e em cultura ao longo do desenvolvimento (Cristóvão et al., 2002a,b). Nesse contexto, sabe-se que a sinalização nitrérgica (NO/GMPc e PKG) no SNC é regulada através da ativação de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996). Partindo dessa premissa, decidimos investigar primeiramente o papel regulatório do glutamato na fosforilação da AKT/PKB. A figura 6A mostra que o tratamento com glutamato (500 μ M), induz a fosforilação da AKT/PKB, no sítio da Ser-473, podendo ser observado um aumento já em 5 minutos e que torna-se significativo em 15 minutos (157,66 \pm 16,49% do controle) (Fig. 6A). O glutamato nessa concentração promove uma fosforilação elevada e de maneira sustentada em 30 e 60 minutos (224,56 \pm 15,48%, 233,73 \pm 17,19% respectivamente), de modo semelhante ao observado com SNAP ou L-ARG (ver Fig. 2 e 4). A viabilidade celular na concentração de glutamato (500 μ M), não apresentou nenhum indicativo de morte celular nos tempos investigados (Fig. 6E). Classicamente tem sido mostrado na literatura que o sistema glutamatérgico induz efeitos de sobrevivência e diferenciação de vários tipos celulares através da ativação de receptores ionotrópicos e via produção de NO (Montague et al., 1994, Monti et al., 2002, Brenman e Bredt, 1997). Com base nesses achados, decidimos investigar a participação do receptor ionotrópico de tipo NMDA no aumento da fosforilação provocado pelo glutamato. O tratamento com NMDA (100 μ M), mostrado na figura 6B, induziu o mesmo perfil de estimulação que o glutamato na fosforilação da AKT/PKB, com aumento a partir dos 5 e 10 minutos e permanecendo ativa até os 40 e 60 minutos (294,64 \pm 18,47%, 291,10 \pm 13,56%, 280,96 \pm 17,46% do controle).

Por outro lado, em culturas pré-tratadas por 15 minutos com MK-801 (10 μ M), inibidor do receptor NMDA, houve uma inibição acentuada quando comparada com o efeito do NMDA que era de $283,1 \pm 18,63\%$ para $181,65 \pm 17,04\%$. Embora o glutamato possa também, por outro lado, ativar outros receptores de tipo ionotrópico como AMPA e Kainato, dados preliminares não mostraram inibição da fosforilação quando tratadas com o inibidor DNQX (dados não mostrados). A via clássica do NO foi testada farmacologicamente quando as culturas foram tratadas com o inibidor da NOS de amplo espectro (L-NAME) por 15 minutos na presença de glutamato. Como se mostra na figura D, pré-tratamento com L-NAME (200 μ M) bloqueou o efeito tanto do glutamato ($169,76 \pm 17,89\%$), quanto do NMDA ($134,51 \pm 17,03\%$). Esses dados em conjunto sugerem que o sistema glutamatérgico através da ativação do receptor de tipo NMDA upstream ao sistema do NO promoveu a fosforilação da AKT/PKB via NO, até pelos menos 60 minutos de incubação.

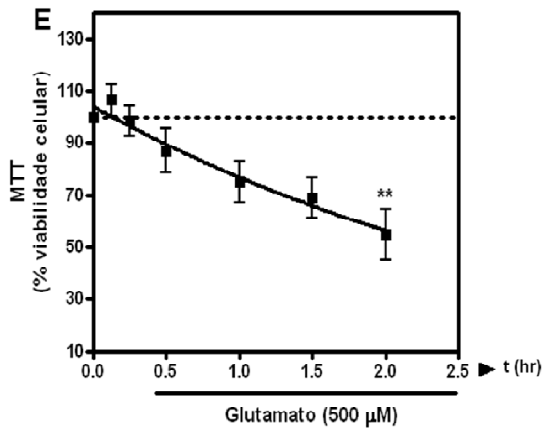
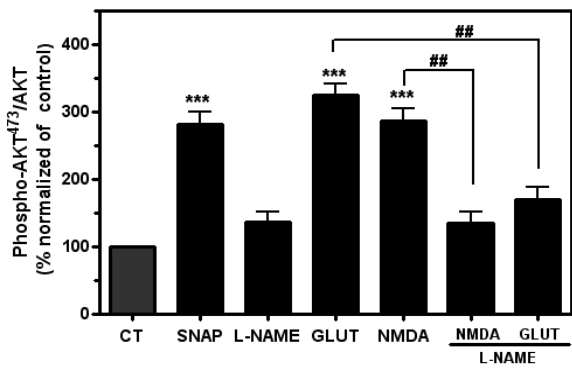
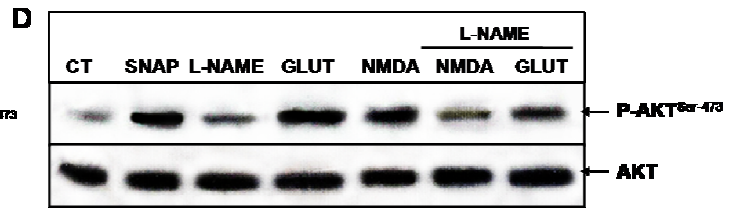
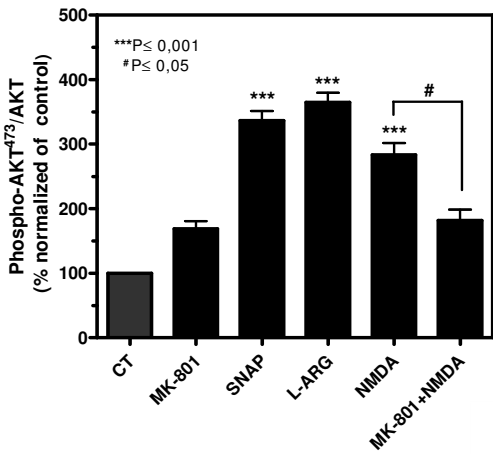
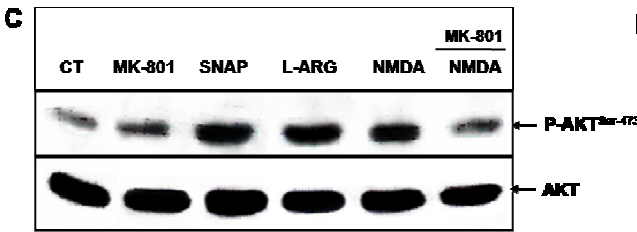
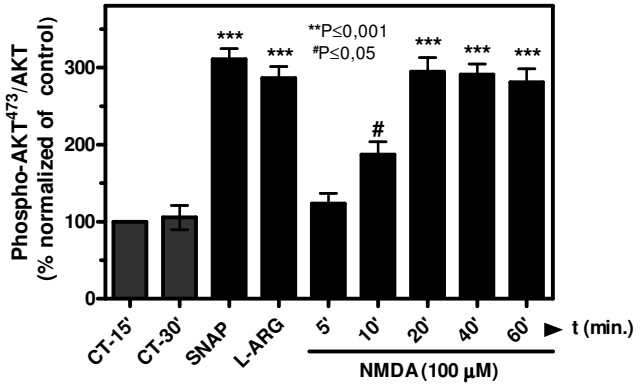
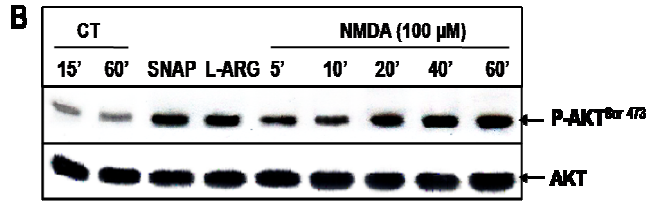
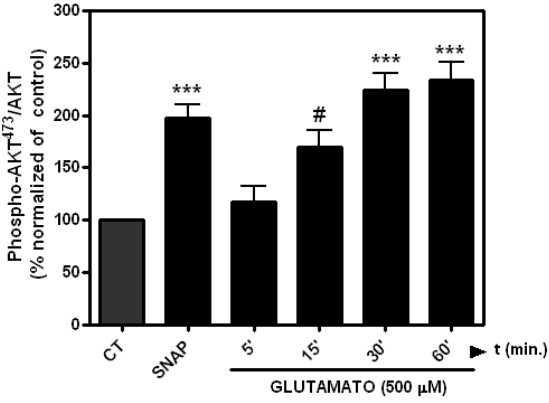
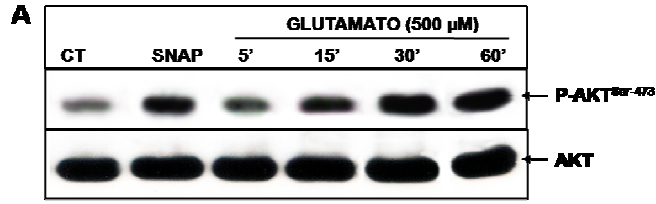


Figura 6. Sinalização glutamatérgica promove a fosforilação da AKT/PKB via NO. Células de retina em cultura incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas com glutamato (A), NMDA (B), na presença ou na ausência de MK-801(C) ou com o inibidor da NOS (L-NAME) (D). A fosforilação mostrou-se dependente do tempo tanto para o glutamato como para o NMDA. Esses efeitos foram bloqueados pelo MK-801 (10 μ M), inibidor do receptor NMDA, e os efeitos do glutamato e NMDA foram bloqueados quando tratados com L-NAME (200 μ M). (E) A viabilidade celular foi quantificada através da redução do MTT para culturas tratadas com glutamato (500 μ M). Os dados são representativos de ao menos 3 experimentos independentes \pm SEM (n=3).***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05 em relação ao controle. ##P<0,01, #P<0,05 relativo ao tratamento com o glutamato ou o NMDA.

4.7. Fosforilação da proteína cinase AKT/PKB promovida por NO requer a participação do cálcio extracelular.

A mudança de potencial elétrico da célula nervosa induzido pela despolarização com KCl pode apresentar efeitos na sobrevivência de neurônios simpáticos (Ikegami e Koike, 2000). A alteração na permeabilidade da membrana promovida por KCl ou glutamato provoca a entrada do segundo mensageiro cálcio através de canais ativado por voltagem ou através da via dos iGluRs ou mGluRs, respectivamente. Com o intuito avaliar a participação do cálcio extracelular na fosforilação da AKT/PKB, as culturas foram tratadas com KCl (30 mM) por diferentes períodos de tempo. A Fig. 7A mostra que o tratamento com KCl promoveu a fosforilação da AKT/PKB de maneira tempo-dependente, atingindo máxima fosforilação em 40 minutos ($266,92 \pm 16,48\%$) e conseguindo manter-se ainda elevada em 60 minutos ($295,10 \pm 14,03\%$). O glutamato é um neurotransmissor também responsável pela alteração do potencial de membrana como dito acima, o que nos levaria a sugerir secundariamente que a entrada de cálcio externo através do receptor de tipo NMDA também poderia estar envolvida na fosforilação da AKT/PKB. Para validar a hipótese acima nos perguntamos se o influxo de cálcio após a ativação do receptor de tipo NMDA poderia ser bloqueado pelo EGTA (quelante extracelular de cálcio). Desse modo, nossas culturas foram pré-tratadas por 30 minutos com EGTA (1 mM) na presença de NMDA. A análise densitométrica das bandas nos mostrou uma inibição parcial na fosforilação desta enzima em 15 minutos de tratamento com o EGTA ($217,45 \pm 20,42\%$) e total no tempo de 30 minutos ($129,36 \pm 17,59\%$) quanto comparado com o próprio NMDA ($319,29 \pm 14,69\%$) (Fig. 7B). Em decorrência desses dados nos perguntamos se o efeito do glutamato também poderia ser regulado pelo EGTA. Dados preliminares e não mostrados neste trabalho apontam claramente essa possibilidade. No entanto, tratamento com o doador de NO exógeno (SNAP) conjuntamente com EGTA, como mostrado na Fig. 7C, promoveu à mesma

inibição bastante acentuada quando comparado com o efeito do SNAP. Observe nos primeiros 5 minutos de estímulo com SNAP, o quelante extracelular de cálcio promoveu um bloqueio total de $192,52 \pm 12,04\%$ para $69,09 \pm 15,93\%$. Esse efeito na inibição da fosforilação foi constante com o decorrer do tempo, atingindo sua máxima inibição em 30 minutos de estímulo com o SNAP ($54,13 \pm 18,94\%$). A produção de NO endógeno nas culturas que foram tratadas com o substrato da nNOS (L-ARG), foi também avaliada na presença de EGTA (figura 7D). A análise densitométrica das bandas mostrou o mesmo efeito no bloqueio da fosforilação da AKT/PKB quando as culturas foram pré-tratadas com EGTA por 30 minutos de $256,1 \pm 16,96\%$ com a L-ARG para $107,21 \pm 17,43\%$; $60,47 \pm 16,34$; $62,29 \pm 15,38$ e $61,43 \pm 14,03\%$ respectivamente para 5, 15, 30 e 60 minutos com EGTA+L-ARG. Esses dados nos levaram a sugerir a participação do aumento intracelular de cálcio proveniente do meio extracelular na fosforilação da AKT/PKB promovida através desses três tipos de estimulação no sistema glutamatérgico (GLUTAMATO, NMDA-L-ARG e SNAP).

Assim, com o intuito de verificar a possibilidade dos íons cálcio serem provenientes do meio extracelular, experimentos complementares aos dados anteriores foram realizados através da medida da captação de Ca^{2+} radioativo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) em culturas purificadas de neurônios (E8C4). Na Fig. 7E, mostra-se que o tratamento com SNAP por 3 minutos induziu significativamente um aumento do cálcio intracelular ($602,320 \pm 95,450$ CPM/ml com respeito ao controle de $159,840 \pm 42,610$ CPM/ml). O estímulo do SNAP não mostrou nenhuma diferença significativa quando comparado com ATP, usado como um controle positivo ($717,240 \pm 132,70$ CPM/ml) (Sugiota e Yamashita, 2003). O tratamento com a L-ARG, produtor de NO endógeno, também mostrou o mesmo perfil de aumento na concentração intracelular de cálcio ($290,70 \pm 35,90$ CPM/ml do controle). O provável mecanismo pelo qual o NO induz esse

aumento intracelular de cálcio foi mostrado na figura 7F, onde a nifedipina, um inibidor do canal de cálcio tipo-L, bloqueou completamente tanto o efeito de SNAP ou da L-ARG ($87,90 \pm 23,20$ CPM/ml; $100,050 \pm 33,20$ CPM/ml respectivamente) em culturas pré-tratadas por 15 minutos. Vale à pena salientar que dados anteriores do nosso laboratório mostraram que o NMDA ($100 \mu\text{M}$) é capaz de promover também esse influxo de cálcio rapidamente, em 3 minutos, e é bloqueado pelo MK-801 (Tese de mestrado 2008, Octavia Malta). Desse modo, o conjunto de dados nos permite sugerir que o sistema glutamatérgico, através da ativação do receptor de tipo NMDA, ou do NO exógeno, proveniente do SNAP ou através da ativação da nNOS promove a fosforilação da AKT/PKB, através da entrada do cálcio externo por canais de cálcio tipo-L e do receptor de tipo NMDA.

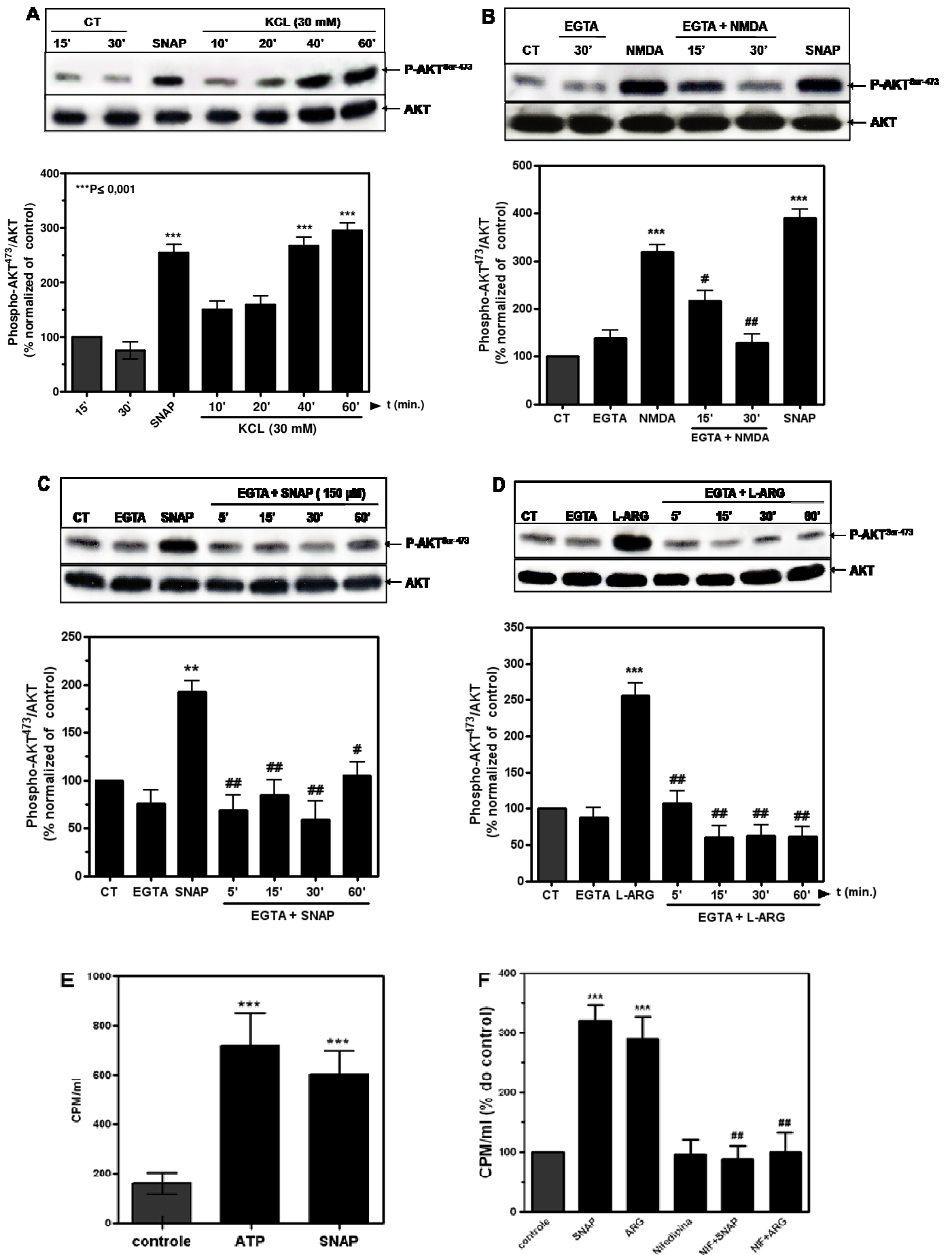


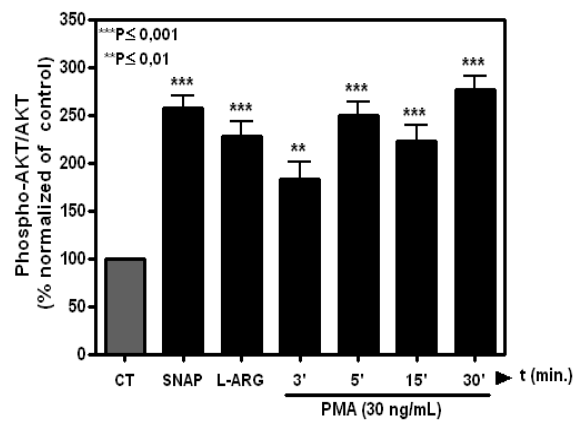
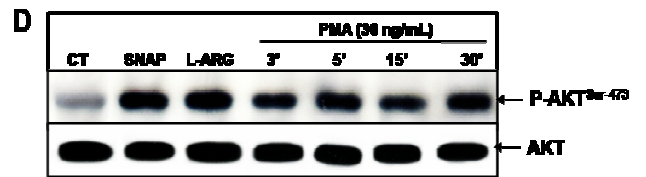
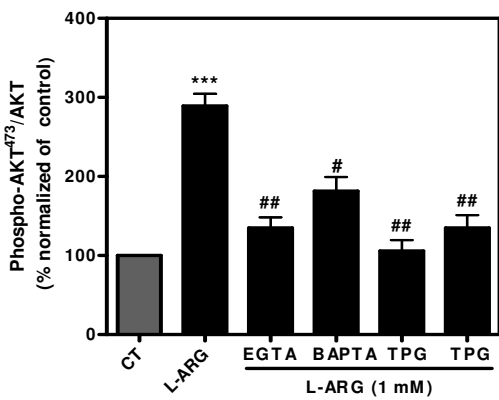
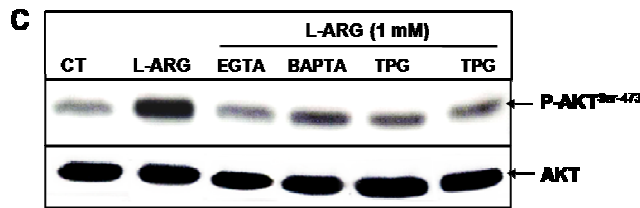
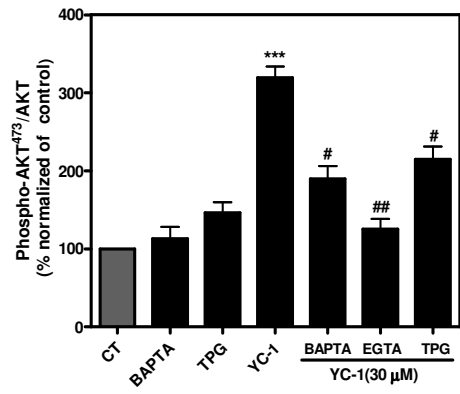
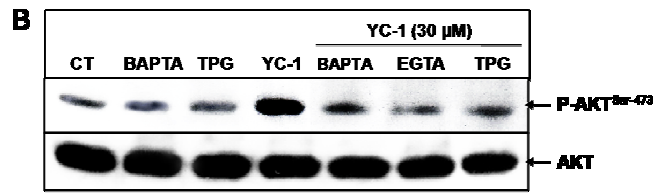
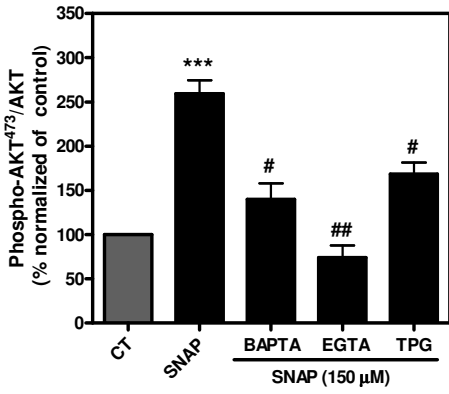
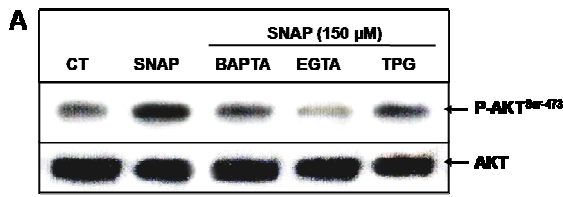
Figura 7. Participação do cálcio externo na fosforilação AKT/PKB induzida por NO. Culturas E8C4 incubadas 24 horas com Hank's foram tratadas com KCL por tempos diferentes (A), Blots representativos de P-AKT e suas respectivas quantificações densitométrica são mostradas quando as culturas eram estimuladas com 100 μ M de NMDA (B), 150 μ M de SNAP (C) ou 1 mM de L-ARG (D), na presença ou ausência de EGTA 1 mM por 30 minutos. Observe o bloqueio total e sustentado até pelo menos 30 minutos na presença de todos os agonistas (NMDA, SNAP e L-ARG). A quantificação do acúmulo de cálcio intracelular foi determinada pela captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ radioativo. Esses dados são representativos de 3 experimentos realizados em triplicata (n=3) (E, F). Observe o bloqueio da captação quando as culturas eram tratadas previamente com nifedipina (5 μ M). A análise dos blots foi feita a partir de dados obtidos em pelo menos três experimentos independentes \pm SEM (n=3). ***P< 0,001; **P< 0,01em relação ao controle. #P<0,05; ##P< 0,01em relação ao tratamento com os respectivos agonistas.

4.8. Modulação da fosforilação da AKT/PKB por quelantes intracelulares de cálcio.

Após a obtenção dos resultados apresentados acima, nos perguntamos se quelando o cálcio intracelular poderíamos modular a fosforilação da AKT/PKB por NO. Para isto, as culturas foram submetidas a um pré-tratamento por 15 minutos com BAPTA-AM (30 μ M), um quelante intracelular de cálcio, na presença de SNAP, YC-1 ou da L-ARG. Na figura 8A, 8B e 8C observamos que para todas as situações o BAPTA-AM, reduziu o aumento da fosforilação promovida pelo SNAP (269,10 \pm 15,46%), pelo YC-1(319,41 \pm 14,18%) e pela L-ARG (288,97 \pm 15,49%), respectivamente para 139,95 \pm 18,04%, 189,52 \pm 16,85% e 181,57 \pm 17,37%. Surpreendentemente, 5 μ M de tapsigardina (TPG), um bloqueador da liberação dos estoques intracelulares de cálcio, teve o mesmo efeito inibitório para essas situações [Fig. 8A (linha 5), B (linha 7) e C (linha 5 e 6)] em 168,45 \pm 13,19% para a TPG+SNAP, 194,86 \pm 16,29% para a TPG+YC-1 e de 105,71 \pm 13,65% ou 134,65 \pm 16,25% para a TPG+L-ARG.

Por outro lado, para confirmar o envolvimento da mobilização do cálcio interno se utilizou o PMA, um estimulador da PKC, e carbacol (CHAR), um agonista colinérgico, dois agonistas capazes de aumentar o cálcio dos estoques intracelulares (Cui et al., 2006). A fig. 8D e 8E mostram claramente que os tratamentos com PMA ou CHAR promoveram o aumento da fosforilação da AKT/PKB dependente do tempo (250,24 \pm 14,35% e 205,77 \pm 14,24% do controle respectivamente). Esse aumento da fosforilação foi bloqueado quando as culturas foram pré-tratadas com 30 μ M de BAPTA-AM ou 15 μ M de dantrole (DANT), um inibidor da liberação de cálcio dos estoques intracelulares, por 15 minutos (Fig. 8F). Finalmente, o tratamento com esses inibidores separadamente não promoveu nenhuma mudança em relação ao controle

(dados não mostrados) e também não promoveram nenhum sinal de morte aparente dentro desses primeiros 30 minutos quando foram avaliadas pela liberação de LDH (Fig. 8G). NO entanto, os inibidores mostraram uma liberação característica de LDH após 60 minutos. Todos esses dados em conjunto nos sugerem que a mobilização dos estoques intracelulares de cálcio também participam na fosforilação da AKT/PKB induzida por NO em nossas culturas.



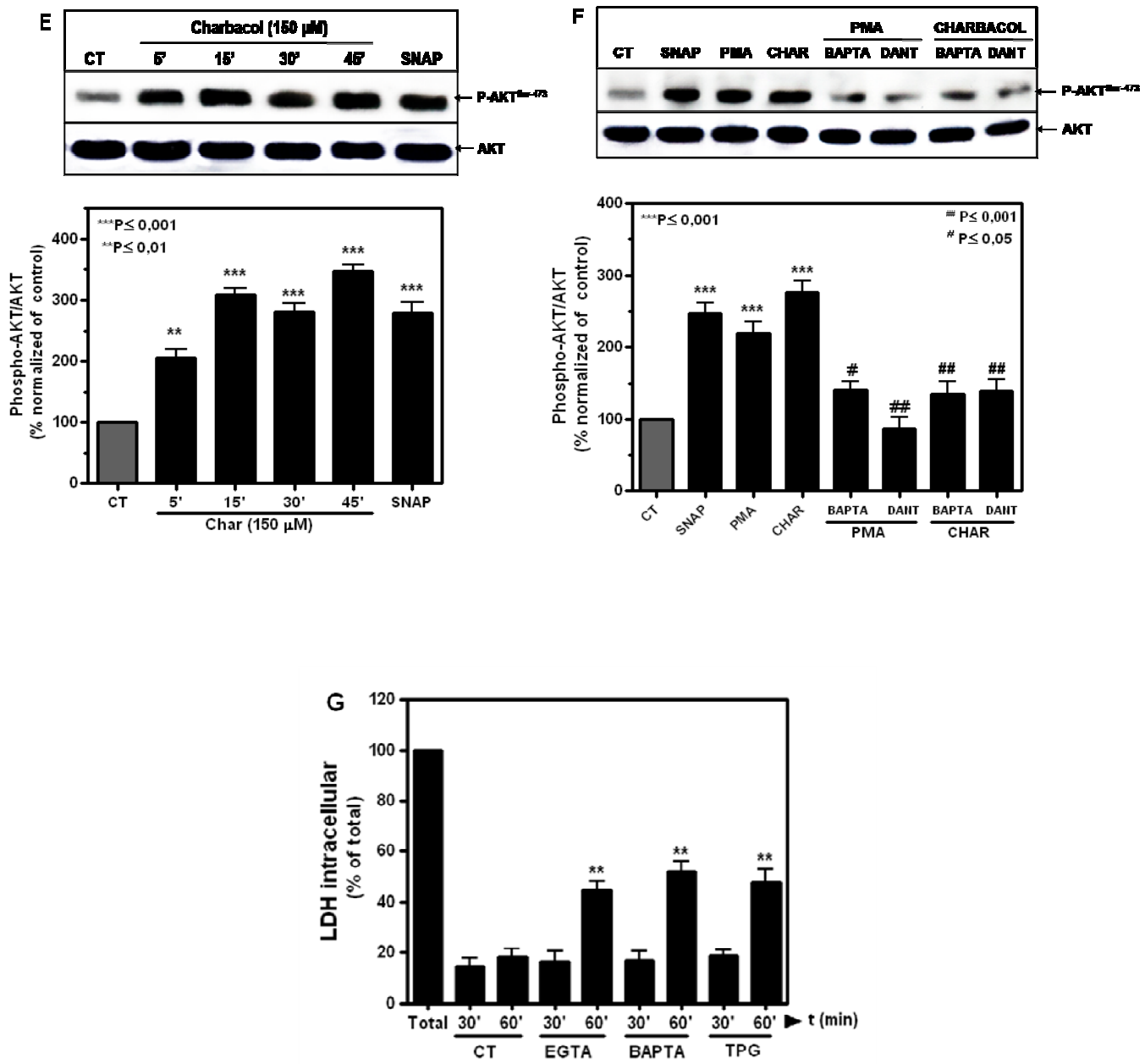


Figura 8. Bloqueio da fosforilação da ATK/PKB por quelantes intracelulares de cálcio. Culturas mistas E8C4 incubadas com Hank's 24 horas foram tratadas previamente por 15 minutos com 30 μ M de BAPTA-AM (em A, linha 3; em B, linha 5; em C, linha 4), ou com 5 μ M de TPG (em A, linha 5; em B, linha 7; em C, linhas 5 e 6) ou 30 minutos com EGTA (1 mM), tanto na presença ou ausência de SNAP (A), YC-1 (B) e L-ARG (C). A análise densitométrica dos experimentos representam a média de pelo menos 3 experimentos separado (n=3). Observe o bloqueio tanto do estímulo com SNAP quanto da L-ARG na presença de quelantes intracelulares de cálcio (A,B,C). O tratamento com PMA (30 ng/mL) ou CHAR (150 μ M) induz a fosforilação da AKT/PKB (D, E) e é bloqueado nas culturas que foram pré-tratadas por 15 minutos com BAPTA-AM ou DANT (F). A viabilidade celular foi determinada pela liberação da enzima LDH intracelular. Observe nos primeiros 30 minutos nenhuma morte celular aparente (G). Igual quantidade de proteína por linha foi colocada (60 μ g/ μ L). ***P<0,001, **P<0,01 relativo ao controle. #P<0,05; ##P<0,01; quando comparados com o efeito do SNAP, YC-1 ou da L-ARG respectivamente.

4.9. Inibidores de calmodulina (CaM) regulam a fosforilação da AKT/PKB induzido por NO.

O aumento da concentração de cálcio intracelular proveniente do meio extracelular ou através da mobilização dos estoques intracelulares facilita a formação do complexo Ca^{2+} -CaM e esse complexo desencadeia várias cascatas de sinalização como modulando a ativação da nNOS (Bredt e Snyder, 1990), da CaMKII, CaMKK (Schmitt et al., 2004), ou de EGF e AKT (Pérez-García et al., 2004). Decidimos avaliar então se os inibidores de CaM poderiam modular a fosforilação da PKB/AKT induzida por NO. Na Fig. 9A, podemos observar a análise do nível de fosforilação desta proteína em culturas pré-tratadas por 15 minutos com vários inibidores da CaM, a saber Calmidazolium (CALM), W-7 e Trifluoroperazine (TRIF). Observe o bloqueio na presença dos inibidores de CaM para $94,62 \pm 15,03\%$, $95,99 \pm 13,19\%$ e $112,14 \pm 15,37\%$ respectivamente tanto para CALM, W-7 e TRIF na presença de SNAP, ou quanto para a L-ARG ($111,64 \pm 16,61\%$, $118,54 \pm 13,95\%$ e $121,45 \pm 16,15\%$ na presença de CALM, W-7 e TRIF respectivamente) (Fig. 9A). O tratamento com esses inibidores não promoveu nenhuma mudança com respeito ao controle e nem promoveu sinal de morte aparente quando as culturas eram observadas através de um microscópio de contraste de fase (dados não mostrados) ou pela liberação intracelular de LDH (Fig. 9B). Observe que nos primeiros 15 ou 30 minutos nenhuma morte celular aparente foi observada nem para o controle e nem para os inibidores respectivos. Estes resultados sugerem que a formação do complexo Ca^{2+} -CaM, resultante do aumento intracelular de cálcio, participa da via de sinalização responsável pela fosforilação da AKT/PKB induzida por NO em células de retina em cultura.

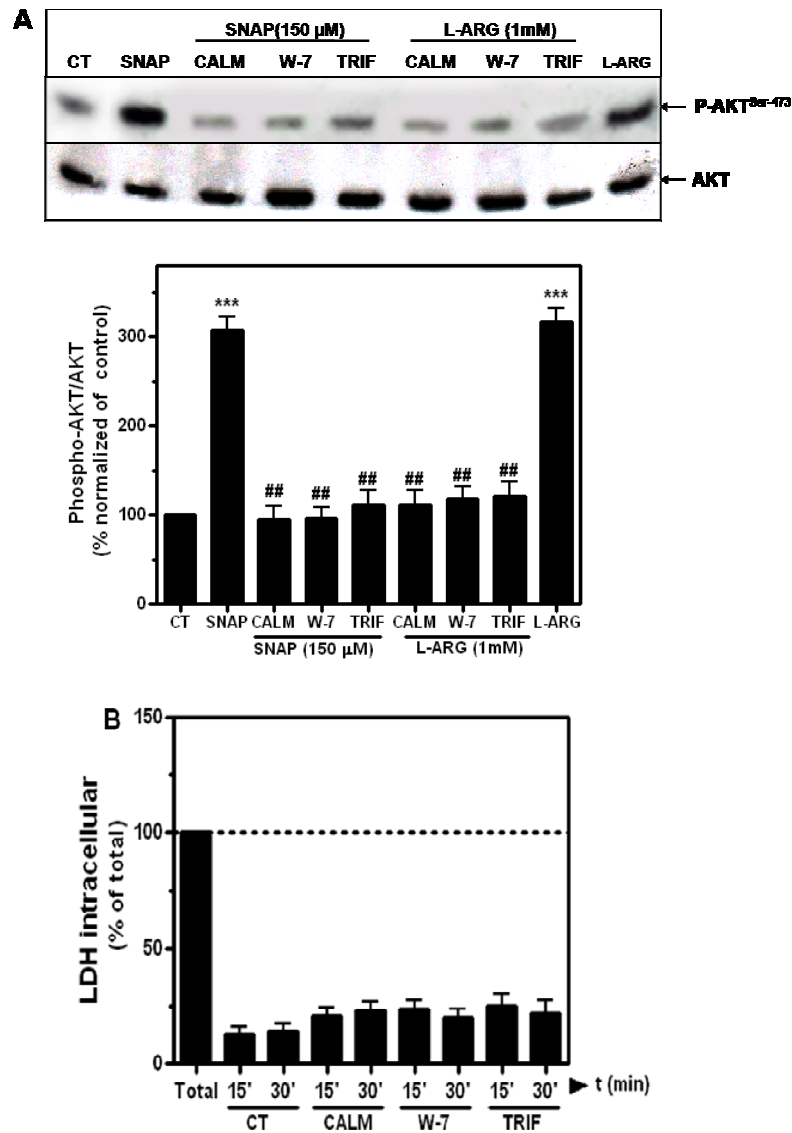
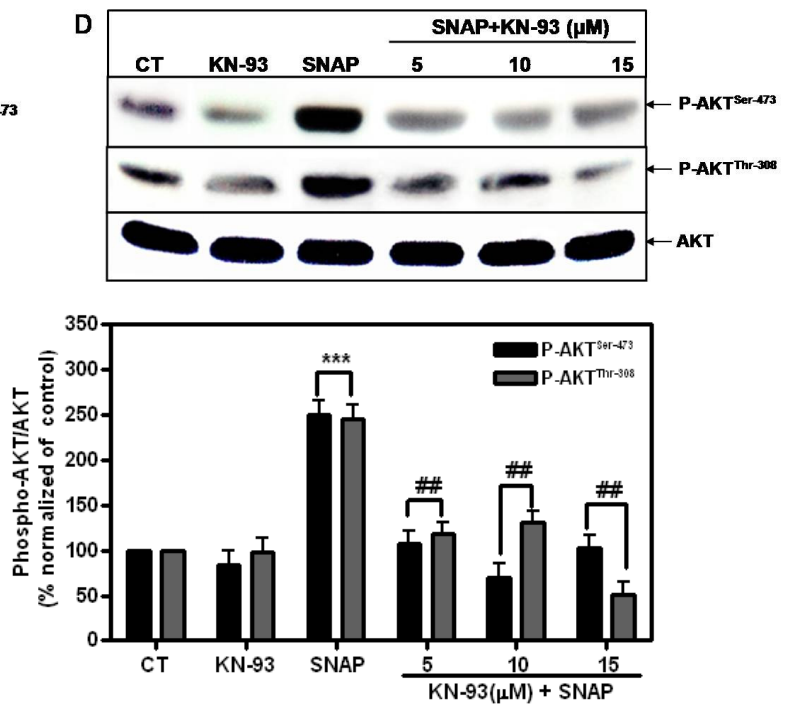
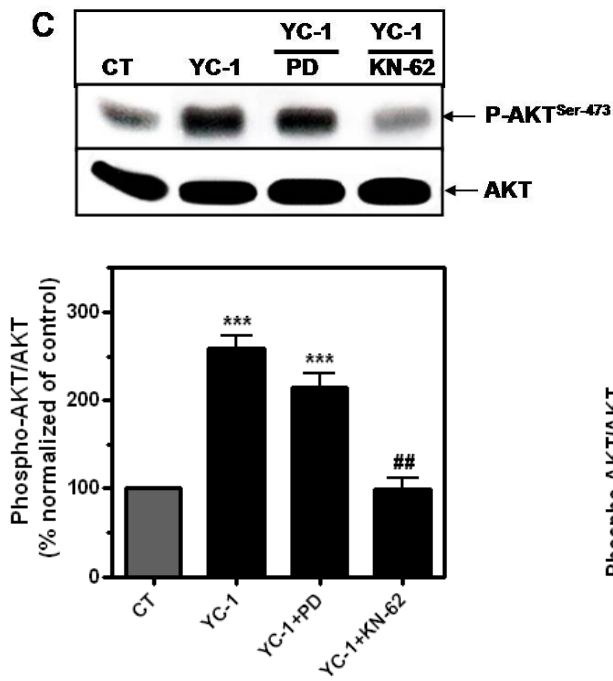
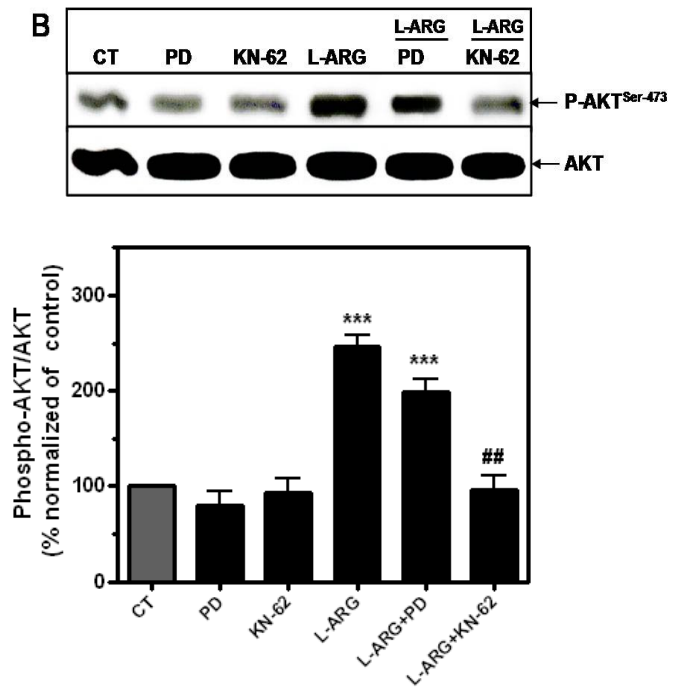
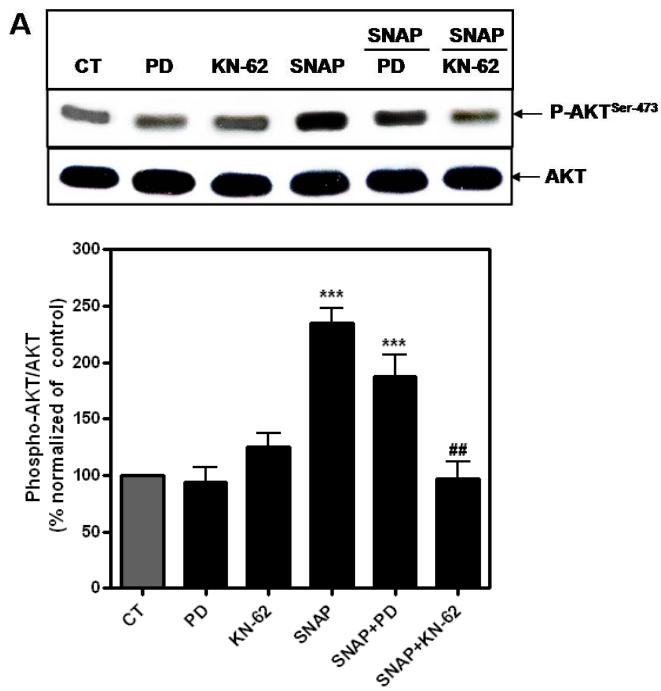


Figura 9. Inibidores de CaM previnem a fosforilação da AKT/PKB induzida por NO.

Culturas mistas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas previamente por 15 minutos com diferentes inibidores de calmodulina: CALM (40 μ M), W-7 (50 μ M), TRIF (30 μ M), tanto na presença ou na ausência de SNAP ou L-ARG (A). Observe o bloqueio do estímulo tanto do SNAP quanto da L-ARG na presença dos inibidores de CaM. A análise densitométrica dos experimentos representam a media de pelo menos 3 experimentos separados (n=3). (B) A viabilidade celular com os inibidores foi determinada pela liberação de LDH de dois experimentos feitos por duplicata (n=2).

4.10. Serina-treonina cinases dependentes de Ca^{2+} -CaM regulam a fosforilação da AKT/PKB por NO.

A via da CaMK-II têm sido freqüentemente associada ao controle da fosforilação da AKT/PKB. Trabalhos na literatura mostram que o aumento da concentração de cálcio induz inúmeras vias de sinalização incluindo a ativação da via das ERKs e CaMKs (Schmitt et al. 2004). Para verificar a possível participação da ERK e da CaMKII na ativação da AKT/PKB por NO em culturas mistas de retina, decidimos investigar a influência de inibidores destas duas proteínas cinases. Culturas E8C4, foram pré-tratadas por 15 minutos com dois inibidores específicos da enzima CaMKII (KN-62 e KN-93) ou inibidor da MEK (PD98059). Como mostrado nas figuras 10A, B e C, o pré-tratamento por 15 minutos com PD98059 não foi capaz de bloquear significativamente a fosforilação da AKT/PKB induzida tanto por SNAP ou L-ARG quanto por YC-1. No entanto, a inibição da CaMKII com KN-62 promoveu bloqueio dos efeitos do SNAP (linha 6 Fig. 10A), da L-ARG (linha 6 Fig. 10B) e do YC-1 (linha 4 Fig. 10C). Similarmente, outro inibidor seletivo da CaMKII e estruturalmente diferente (KN-93) foi também capaz de bloquear a fosforilação induzida por NO exógeno tanto na Ser-473 quanto na Thre-308 (Fig. 10D). Os inibidores em separado não mostraram nenhum efeito em relação ao controle para P-AKT. Em contraste, dados preliminares e de extrema importância confirmam a possibilidade do NO estar induzindo a fosforilação da CaMKII em culturas mistas de retina (Fig. 10E e F). Além disso, a especificidade dos inibidores às concentrações usadas no bloqueio desta enzima foi confirmada. (Fig. 10 E). Estes resultados sugerem que além da fosforilação da AKT/PKB depender totalmente da via da CaMKII, o SNAP se mostra capaz de estimular a enzima CaMKII em culturas de embrião de galinha de maneira específica e provavelmente através de um aumento de cálcio intracelular e conseqüente formação do complexo Ca^{2+} -CaM.



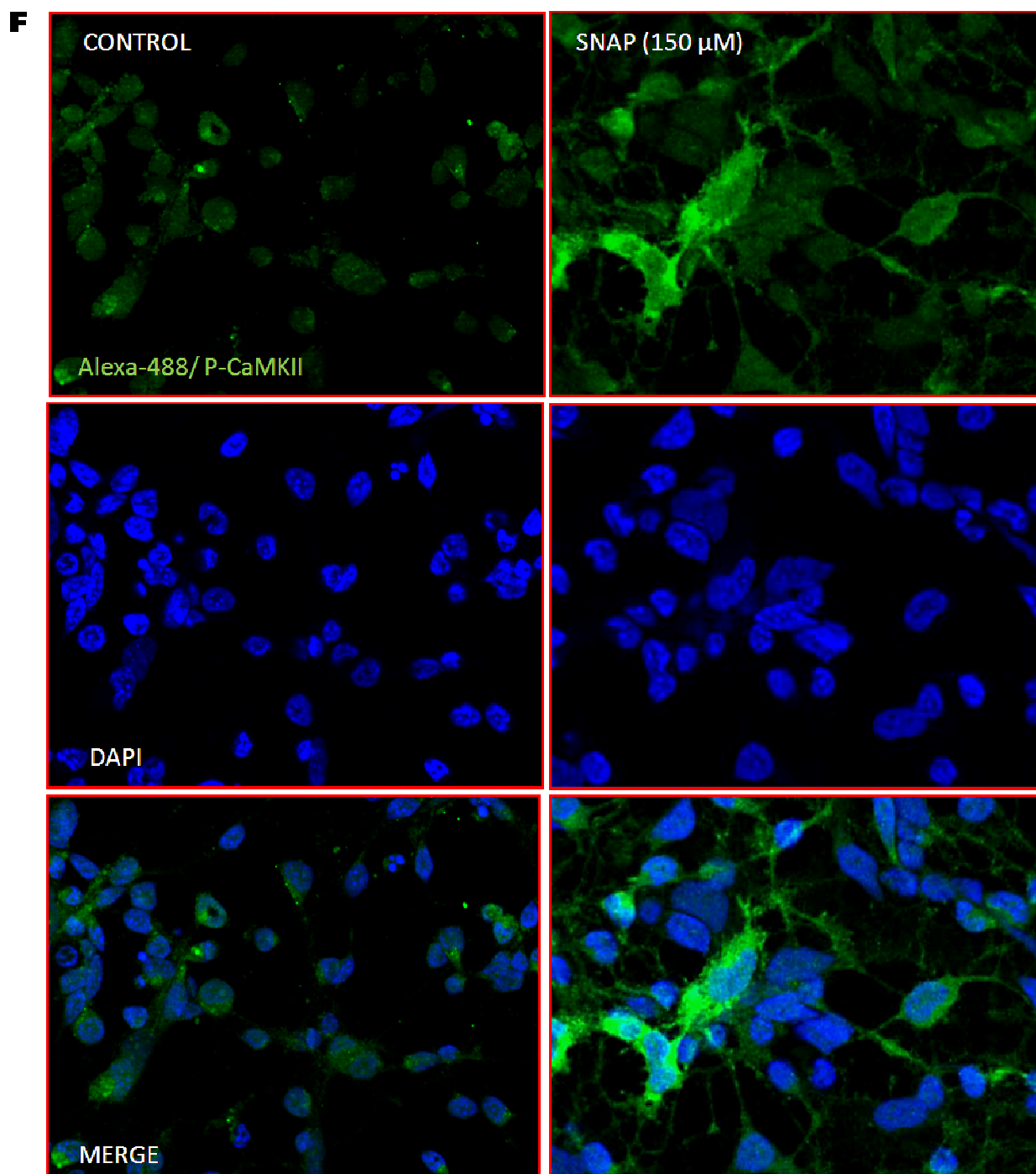
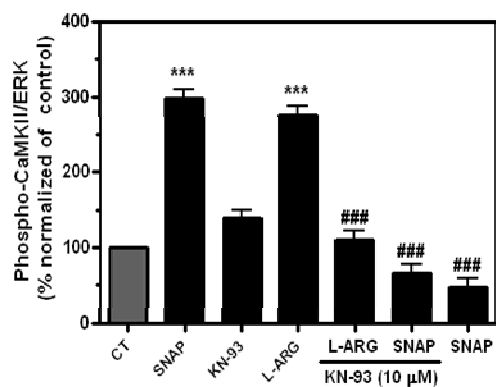
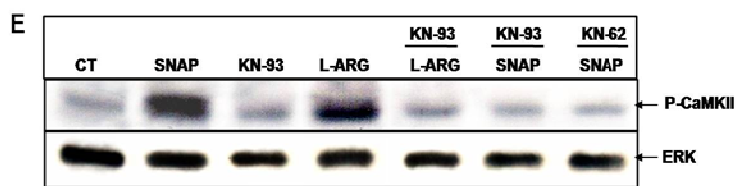


Figura 10. NO promove a fosforilação da AKT/PKB de modo dependente da ativação da via da CaMKII e independente da ERK. Culturas mistas E8C4 incubadas com Hank's 24 horas foram tratadas previamente por 15 minutos com dois inibidores da enzima CaMKII, o KN-62 (10 μ M), e KN-93 (5, 10 e 15 μ M) na presença ou ausência de SNAP (A e D), de L-ARG (B, D) e de YC-1 (C). A análise densitométrica dos blots mostra o bloqueio da fosforilação de AKT/PKB tanto por SNAP, quanto por L-ARG ou YC-1, na presença dos inibidores. PD98059 (25 μ M), inibidor da MEK, não foi capaz de inibir a fosforilação induzida por SNAP, L-ARG ou YC-1 (A,B e C). A análise densitométrica dos experimentos representam a média de pelo menos 3 experimentos separados \pm SEM (n=3), em A,B, C ***P \leq 0,001, quando comparado com o controle. Em D, de n=2 e em E, Fosforilação da enzima CaMKII por SNAP ou L-ARG é bloqueada pelos inibidores seletivos da CaMKII (n=1). ##P \leq 0,01 quando comparado com o efeito dos respectivos agonistas.

4.11. Envolvimento da tirosina cinase Src na fosforilação da AKT/PKB por NO.

Tem sido descrito na literatura que a ação anti-apoptótica do NO envolve preferencialmente a ativação da proteína tirosina cinase Src em células do rim (RINm5F) e que a ativação da AKT por PI3K parece depender da fosforilação da Src (Tejedo et. al.,2001). Para tal efeito, ativação da Src mostra-se dependente do aumento intracelular de cálcio, principalmente mediados por NMDA e glutamato, em vários sistemas celulares (para revisão Salter e Kalia 2004; Crossthwaite et al., 2004). Para verificar a possível participação da via da Src no efeito ativador do NO em culturas de retina, utilizamos um inibidor da enzima Src, o PP1. O resultado destes experimentos está ilustrado na figura 11, onde podemos observar que o efeito do SNAP, foi bloqueado pelo pré-tratamento por 15 minutos com três concentrações diferentes de PP1 (5, 10, 15 μ M). PP1 também inibiu o efeito do YC-1, um ativador direto da enzima GCs (Fig. 11B). Finalmente, o efeito da L-ARG que leva a produção de NO pela enzima nNOS, também foi bloqueado pelo tratamento com PP1 (Fig. 11C). Estes resultados sugerem fortemente que, o efeito do NO na fosforilação da AKT/PKB seja também dependente da ativação da enzima Src em células de retina em cultura.

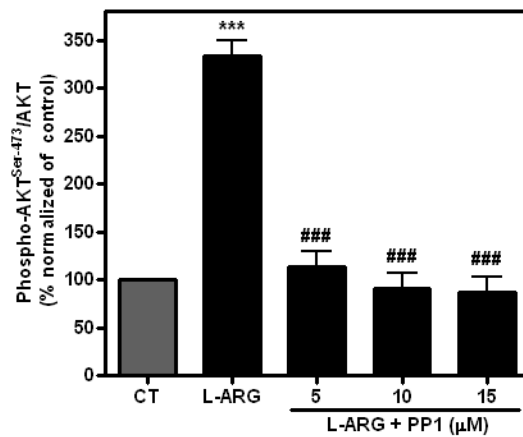
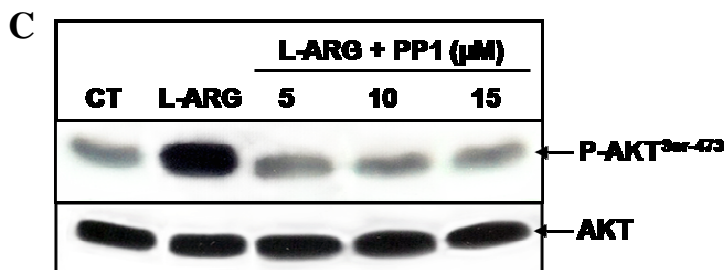
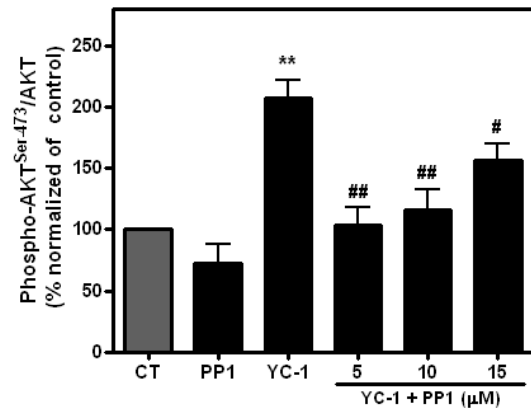
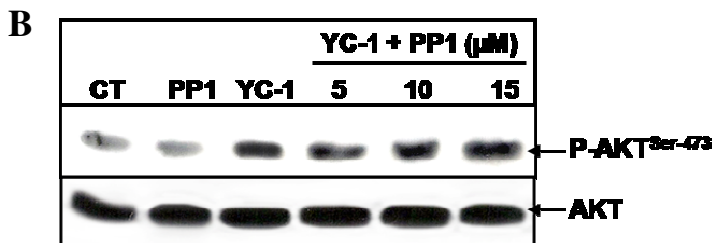
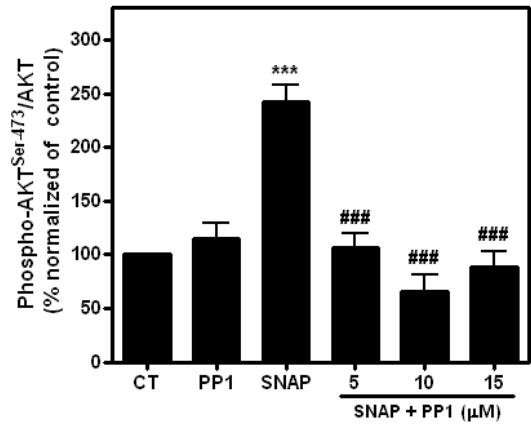
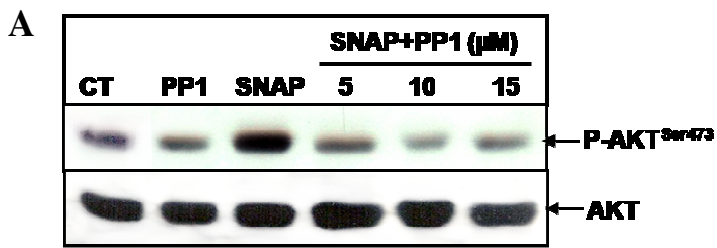
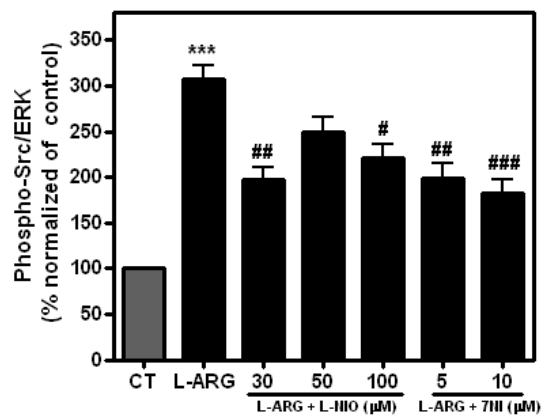
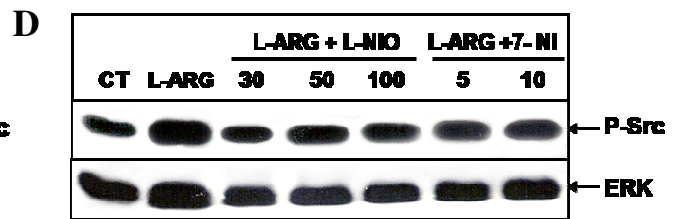
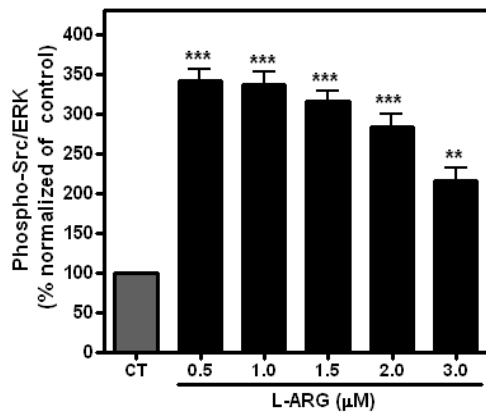
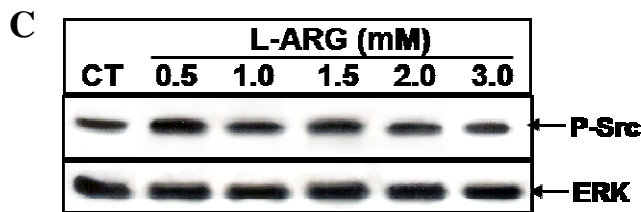
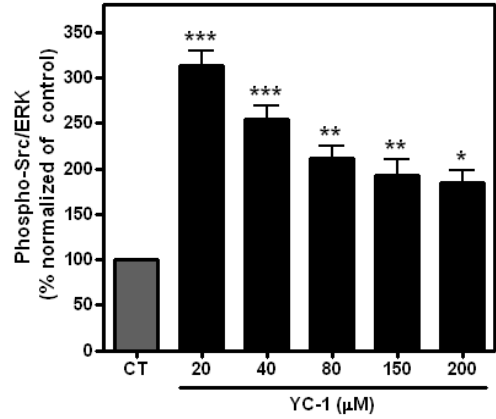
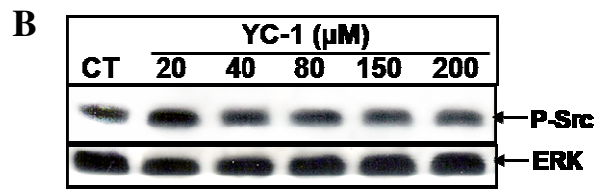
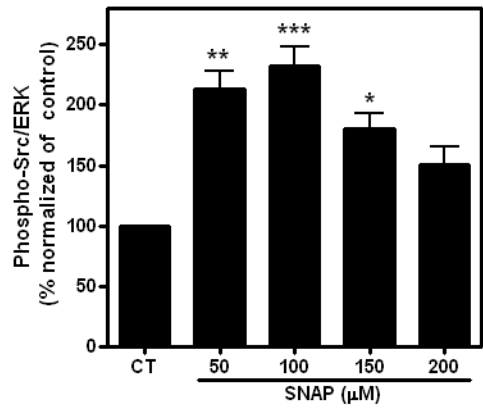
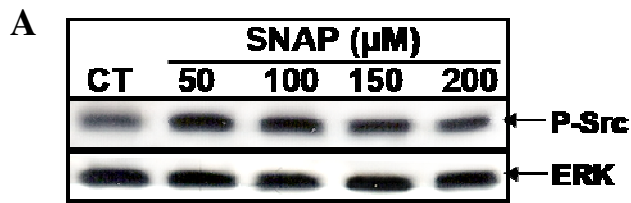


Figura 11. Envolvimento da Src na fosforilação da AKT/PKB induzida por NO.

Culturas E8C4 incubadas 24 horas com Hank's foram tratadas com várias concentrações do inibidor da enzima Src (PP1). Na figura são mostrados blots representativos de P-AKT, bem como a quantificação da análise densitométrica dos experimentos quando as culturas eram estimuladas com 150 μ M de SNAP (A), 40 μ M de YC-1 (B) ou 1 mM de L-ARG (C) por 30 minutos na presença ou ausência de 5, 10 e 15 μ M de PP1 pré-incubadas por 15 minutos. Observe o bloqueio total e de maneira sustentada para esses três agonistas. A análise dos blots corresponde a experimentos obtidos de pelo menos três experimentos independentes \pm SEM (n=3). ***P< 0,001; **P< 0,01 em relação ao controle. #P<0,05; ##P< 0,01; ###P< 0,001 em relação ao tratamento com os SNAP, YC-1 e L-ARG.

4.12. NO promove a fosforilação da proteína cinase intermediária Src (Tyr-416) como pré-requisito para fosforilação da PI3K/AKT.

Em seguida, decidimos avaliar a possibilidade do NO induzir diretamente a ativação da Src. Isso foi avaliado pela fosforilação no resíduo catalítico da Tyr-416 (P-Src^{Tyr-416}) por imunoblot. A figura 12A mostra, como esperado, que o tratamento com diferentes concentrações de SNAP por 15 minutos (50, 100, 150 e 200 μ M), apresentaram um aumento característico na fosforilação da Src^{Tyr-416} (ver também imunocitoquímica na Fig. 12 E). O efeito da ativação da via clássica do NO, por estimulação da GCs com YC-1 por 15 minutos, mostrou o mesmo efeito rápido em 20 μ M e diminuiu parcialmente com o aumento da concentração (Fig. 12B). A figura 12C mostra que a estimulação com L-ARG por 15 minutos, induziu a fosforilação da enzima de maneira constante com a concentração. Repare uma redução da fosforilação da P-Src na concentração de 3,0 mM de L-ARG. Por outro lado, esse efeito do NO endógeno é parcialmente regulado pela inibição da nNOS com L-NIO ou 7-NI, como demonstrado na figura 12D. Esses dados sugerem fortemente que o NO, tanto exógeno como endógeno, induz a fosforilação da proteína cinase intermediária Src^{Tyr-416} através da via clássica do NO-GMPc e que, em consequência promove a fosforilação da AKT/PKB.



D

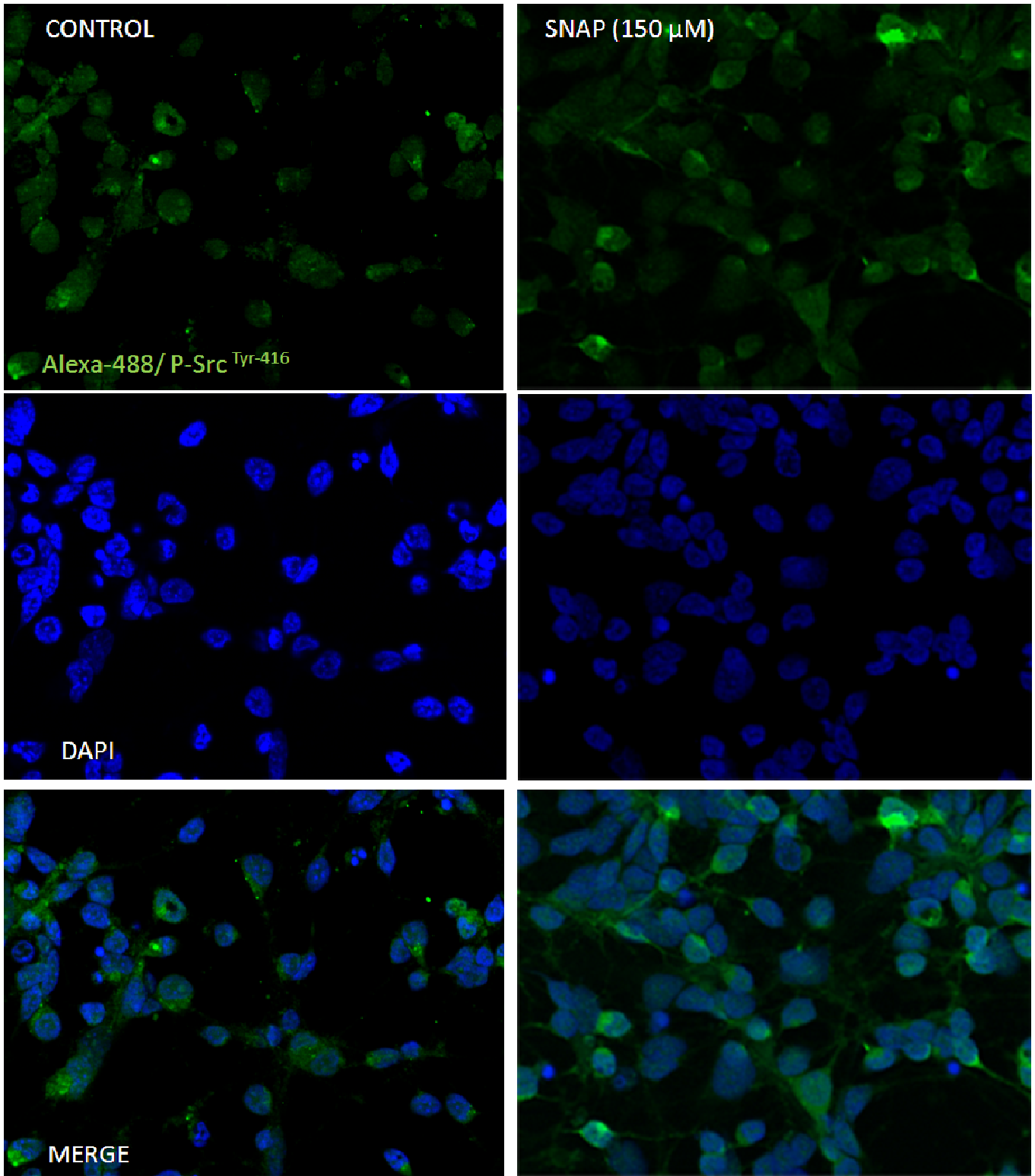


Figura 12. NO induz a fosforilação da proteína cinase Src^{Tyr-416}. Imagem representativa e análise densitométrica dos blots de P-Src^{Tyr-416}, obtidas de culturas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas que foram submetidas a uma curva de concentração de SNAP por 15 minutos (A). Note o perfil de ativação máxima induzido por SNAP a 50 e 100 μ M ($213,06 \pm 15,07\%$ e $232,23 \pm 15,74\%$ do controle respectivamente). Em B, se mostra a fosforilação da Src^{Tyr-416} em culturas mistas tratadas com várias concentrações de YC-1. Observe um nível de ativação máxima na concentração de 20 μ M ($313,70 \pm 16,06\%$) e 40 μ M ($253,73 \pm 13,26\%$ do controle) em 15 minutos de tratamento. C, tratamento com L-ARG (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mM) mostrou o mesmo efeito na fosforilação da enzima. Em D, inibidores da nNOS bloqueiam a fosforilação da Src^{Tyr-416}. Finalmente em E, Imagem representativa por imunofluorescência da Src^{Tyr-416} (n=1). Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos realizados em separado (n=2) (A,B e C). Os asteriscos representam *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 quando comparados com o controle ou #P<0,05; ##P< 0,01, ###P< 0,001, quando comparados com o efeito da L-ARG.

4.13. A via da PI3K participa na fosforilação da AKT/PKB por NO.

Classicamente, a proteína cinase AKT/PKB é descrita como sendo ativada pela via da PI3K. No entanto, apesar de ser um tema bastante controverso, existem evidências de que agonistas que aumentam a concentração de cálcio intracelular poderiam ativar a AKT/PKB de maneira independente de PI3K, através da ativação da proteína cinase dependente de Ca^{2+} -Calmodulina (CaMK) (Yano et al., 1998). Para verificar se a fosforilação da AKT induzida por NO era dependente da ativação da PI3K, as culturas foram pré-tratadas por 15 minutos com dois inibidores estruturalmente diferentes da PI3K (LY294002 e Wortmannin) e posteriormente incubadas por mais 15 minutos com os respectivos agonistas. As figuras 13A e B mostram claramente que os dois inibidores bloquearam o estímulo do SNAP tanto na Ser-473 quanto na Thr-308. Observe o bloqueio mais acentuado quando as culturas foram tratadas com o inibidor específico da PI3K Wortmannin (Fig. 13 B). A estimulação pelo ativador direto da enzima GCs (YC-1) foi também inibido por LY294002 (Fig 13C). De modo similar, quando as culturas de retina foram tratadas com L-ARG, produtor de NO endógeno, a fosforilação da AKT/PKB foi inibida dramaticamente na presença de LY294002 (Fig. 13 D). Esses dados nos mostram claramente que o NO e o sistema clássico NO-GMPc promovem a fosforilação da AKT/PKB de modo dependente da PI3K.

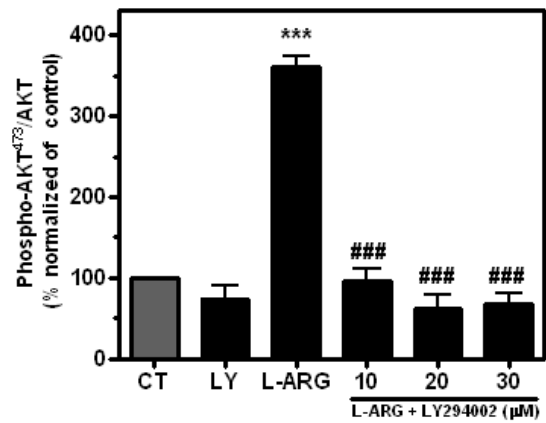
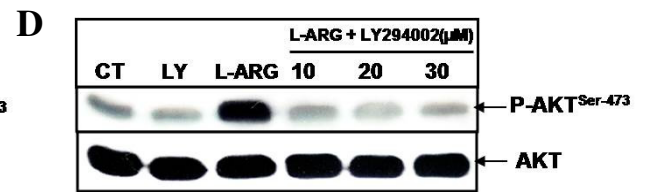
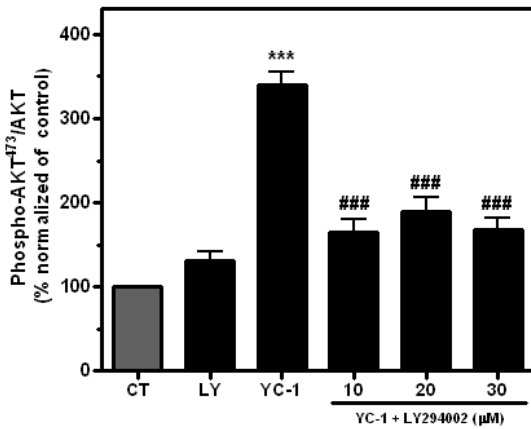
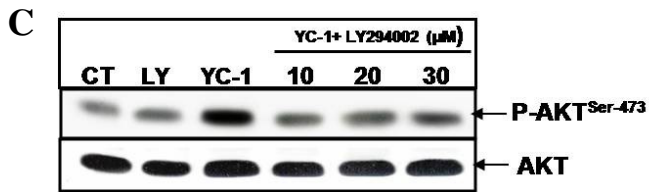
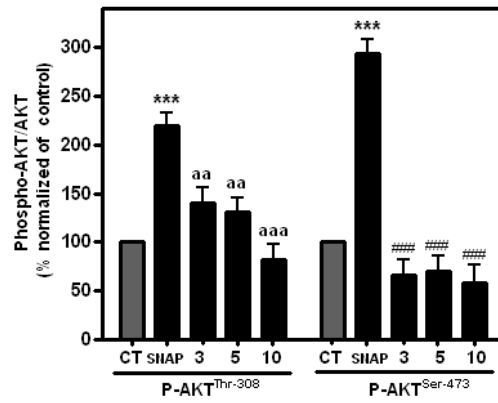
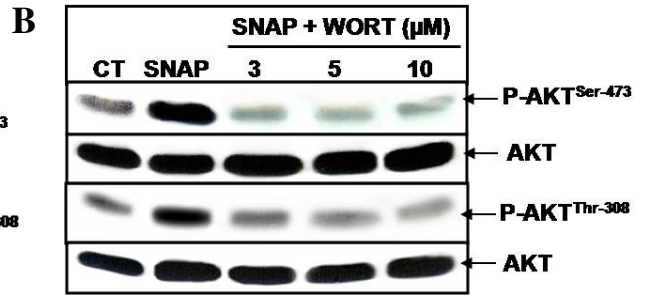
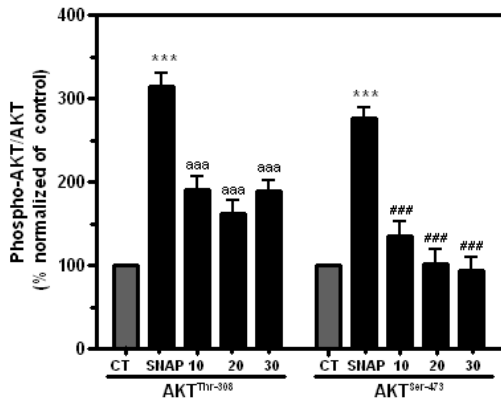
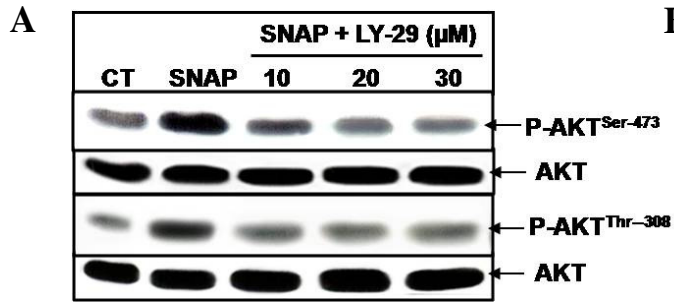


Figura 13. Fosforilação da AKT/PKB induzida por NO é dependente da PI3K.

Culturas mistas (E8C4) incubadas por 24 horas com solução salina Hank's, foram estimuladas por 15 minutos com SNAP (A, B), YC-1 (C) ou L-ARG (D) na presença ou ausência de dois inibidores seletivos da PI3K (LY294002 e Wortmannin). Blots representativos da inibição do efeito do SNAP (A e B), YC-1 © ou L-ARG (D) tanto para a Ser-473 quanto para a Thr-308 da P-AKT. Observe o bloqueio o bloqueio em todas as situações em que as culturas foram pré-tratadas com 10, 20 e 30 μ M de LY294002 ou (3, 5, 10 μ M) de wortmanin (Wort). Os resultados foram normalizados para porcentagem do controle e representam as médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA, seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni. Os asteriscos representam *** $P \leq 0,001$ quando comparado com o controle; aaa $P < 0,001$; ### $P < 0,001$, quando comparados com o efeito do SNAP, YC-1 ou da L-ARG.

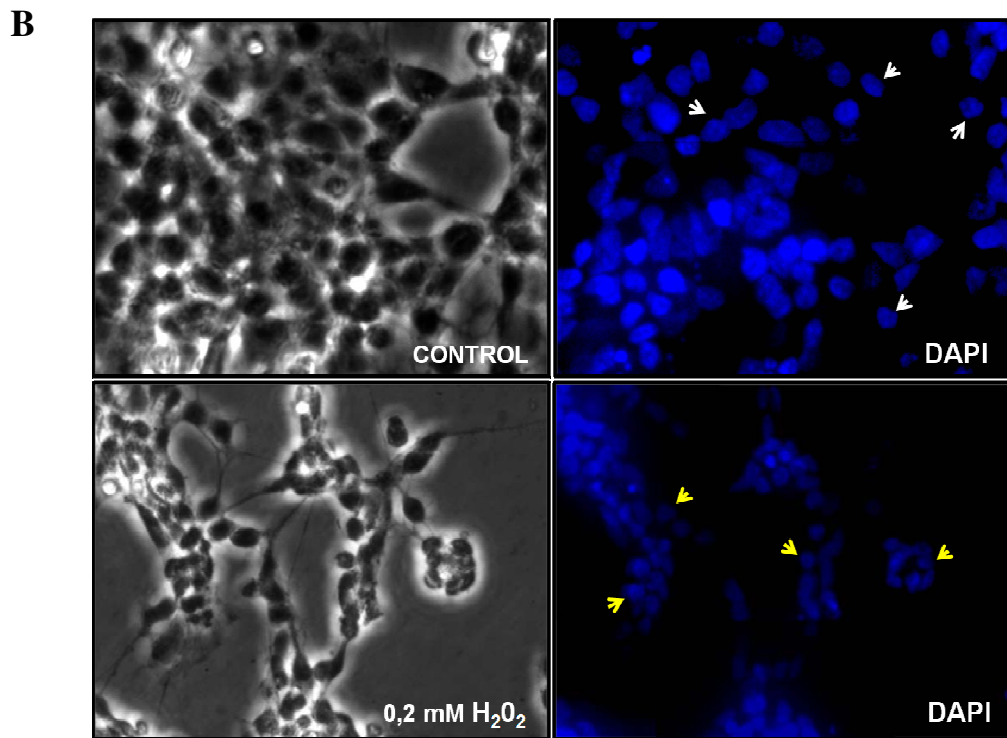
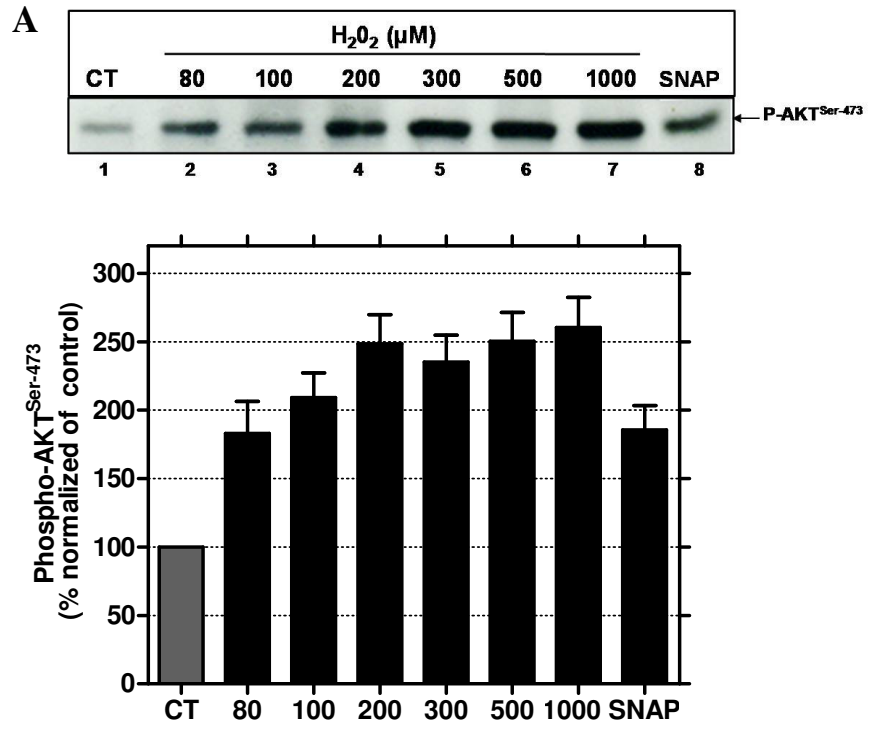
4.14. Tratamento com H₂O₂ mimetiza o efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB em células de retina em cultura.

O estresse oxidativo induzido por isquemia induz formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) [H₂O₂, O₂^{•-} e radical hidroxila (•OH)] e, deste modo, contribui na ativação de várias cascatas de sinalização incluindo a via da PI3K/AKT (Li e Jackson 2002, Qin et al., 2000, Mahadev et al., 2001). Dados na literatura apontam que H₂O₂ induz ativação direta da PI3K através da formação de um complexo com a subunidade catalítica p110 (Qin e Chock, 2003). Desse modo, com o intuito de demonstrar a participação da via da PI3K na fosforilação da AKT/PKB e reforçar os nossos dados anteriores, as nossas culturas foram tratadas com concentrações diferentes de H₂O₂. A figura 14 A, mostra que o tratamento com H₂O₂ por 15 minutos mimetizou a fosforilação da AKT/PKB de maneira dependente da concentração. Esta fosforilação já pode ser detectada com 80 μM de H₂O₂, de modo semelhante ao SNAP (linhas 2 e 8). A máxima ativação da AKT/PKB se produziu na concentração de 200 μM (113.12±). No entanto, o nível da fosforilação não se alterou em concentrações superiores de 300 μM (107,05± 19,75%; 113,95±21.05% e 118,43±22.16%, respectivamente).

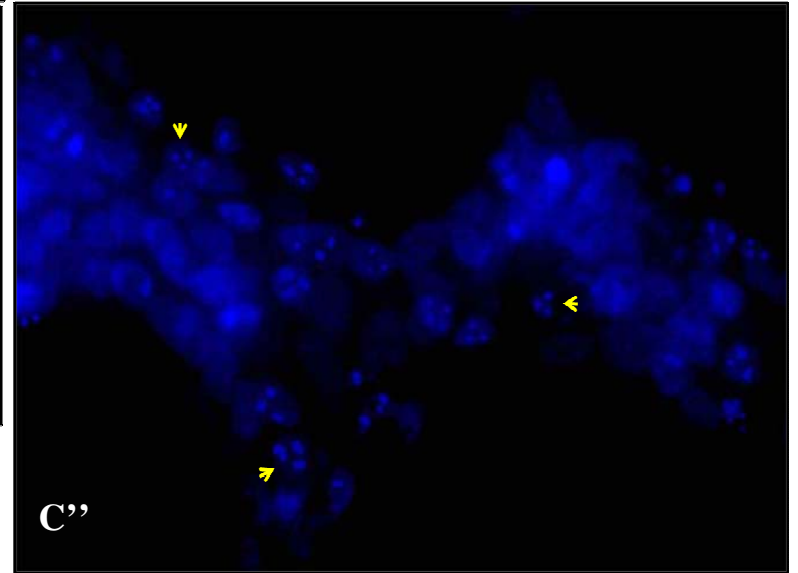
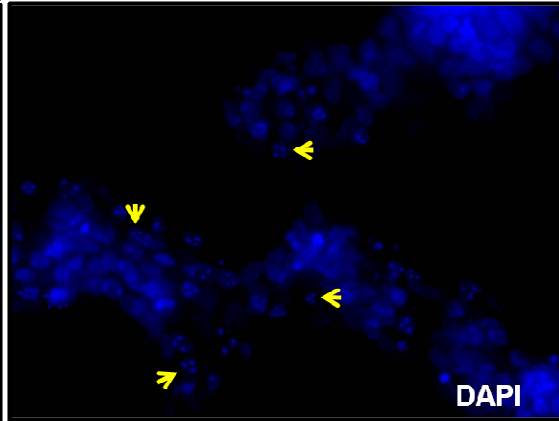
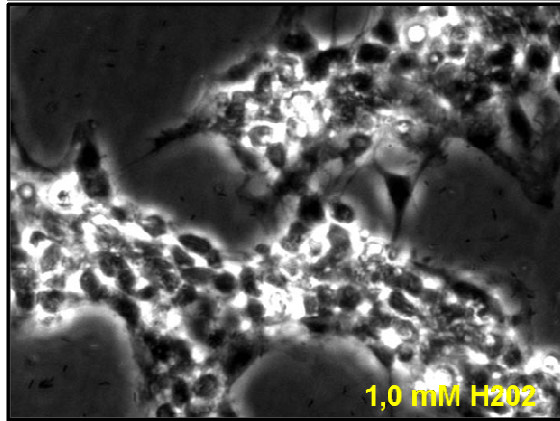
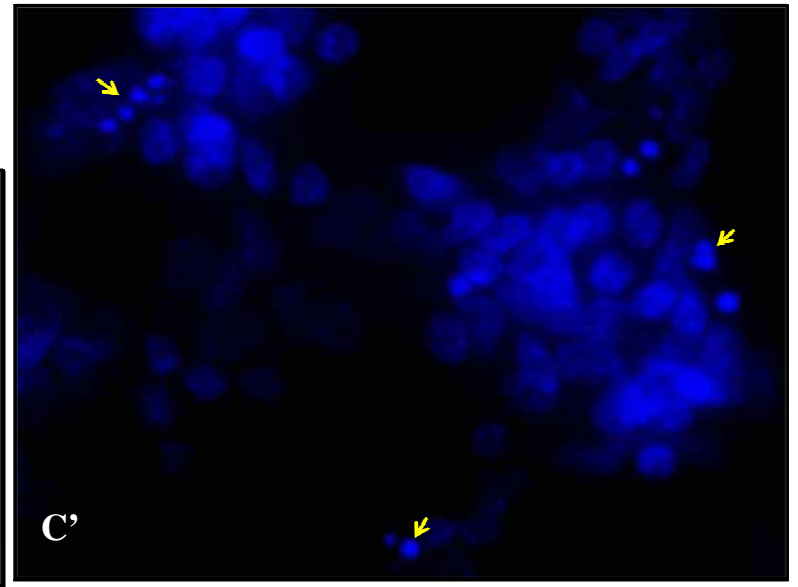
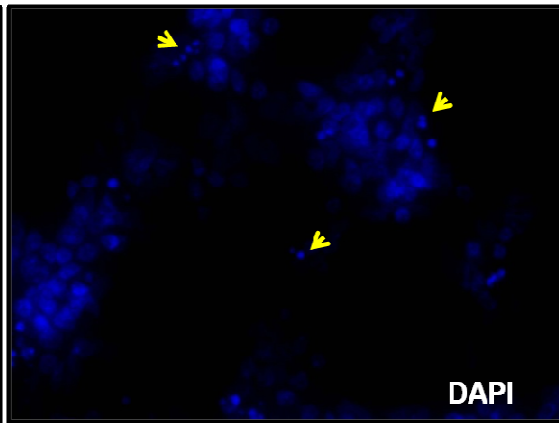
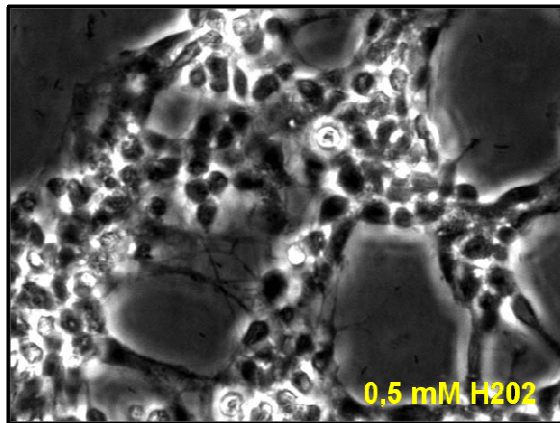
Para avaliarr a possibilidade de morte celular pelo tratamento com H₂O₂, foi feita uma análise morfológica com microscopia de contraste de fase e utilizando o DAPI (marcador nuclear) em culturas mistas tratadas com 0,2 mM de H₂O₂ por 15 minutos. Na figura 14 B, repare a integridade dos núcleos tanto no controle (setas brancas) quanto no tratamento H₂O₂ por 15 minutos (setas amarelas). Uma intensa fragmentação dos núcleos (formação de núcleos picnóticos) foi observada em culturas tratadas com 0,5 e 1,0 mM de H₂O₂ por 30 minutos. Repare na área seleccionada em aumento, um detalhe na formação de núcleos picnóticos (Fig. 14Cc', c"). Estes resultados sugerem fortemente que a via da PI3K participa da fosforilação induzida por H₂O₂.

Embora, Wang et al. (2000) tenham mostrado que H_2O_2 promove a fosforilação da AKT/PKB de maneira dependente do receptor EGF via PI3K, outros estudos apontam que H_2O_2 medeia a inibição da fosfatase PTEN com acúmulo de PIP3 via insulina, EGF e PDGF (Kwon et al., 2004). Assim, para investigar indiretamente se o efeito de H_2O_2 na fosforilação da AKT/PKB foi de caráter oxidativo na própria PTEN, e sabendo que sua inibição produz altos níveis de PIP3 e, em consequência, aumento da AKT, verificamos se a fosforilação da AKT/PKB promovida por H_2O_2 era inibida pelo DTT, um antioxidante que bloqueia reações nitrosilantes em proteínas. Como pode ser observado na figura 14D o DTT bloqueou o efeito do H_2O_2 . Outro antioxidante (NAC), que possui também propriedades diferentes de “scavenger” de radicais livres, não bloqueou a fosforilação da AKT/PKB induzida por H_2O_2 , um sinal de que a fosforilação pode ser produto de regulação redox por S-nitrosilação na enzima fosfatase PTEN (ver discussão).

Investigamos também se a fosforilação da AKT/PKB promovida por NO exógeno (SNAP) ou por NO endógeno (L-ARG) envolveria também processos de nitrosilação da própria proteína AKT/PKB. Como mostrado na Fig. 14D e E essa possibilidade pode ser descartada pelo fato que DTT não bloqueou a fosforilação da AKT/PKB tanto do SNAP quanto por L-ARG. Surpreendentemente, o NAC mostrou bloqueio em ambos os casos.



C



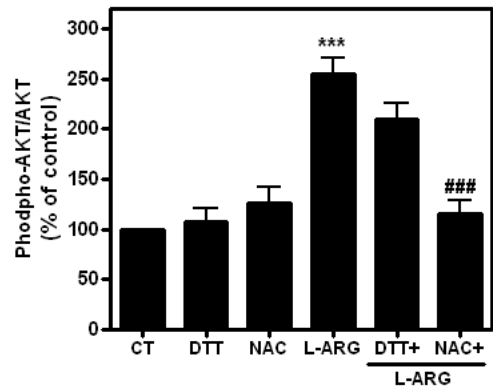
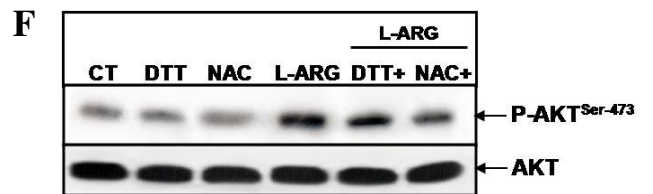
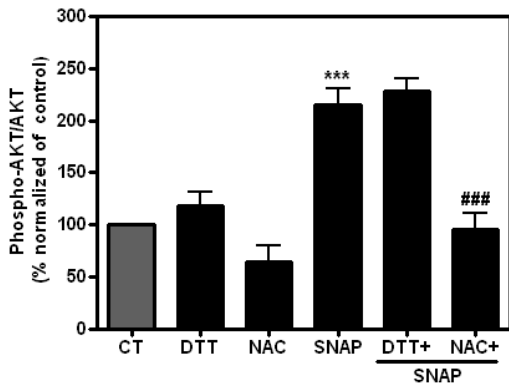
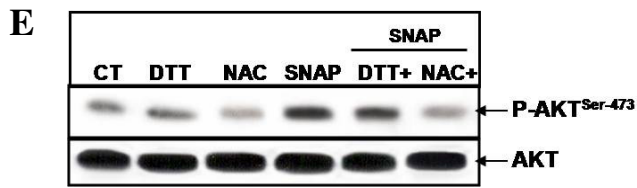
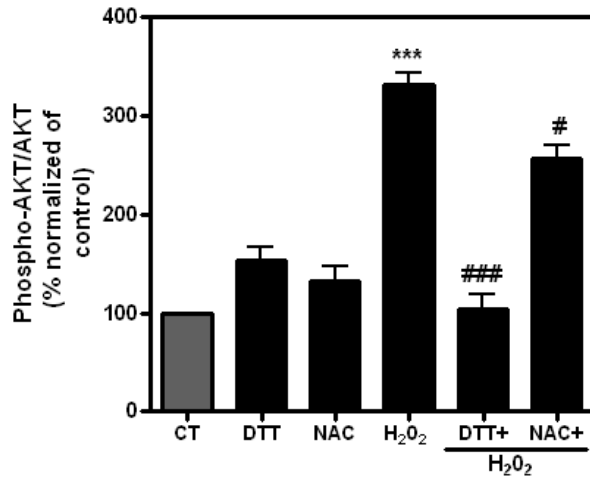
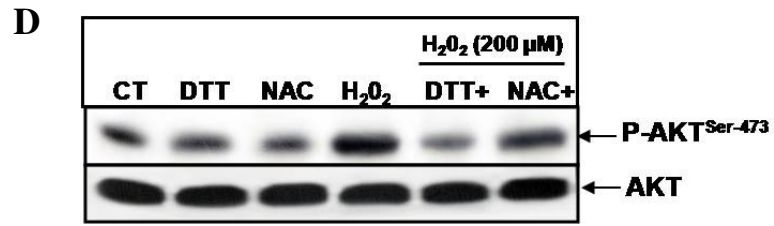


Figura 14. H₂O₂ mimetiza a fosforilação da AKT/PKB induzida por NO. Culturas mistas (E8C4) incubadas por 24 horas com Hank's foram estimuladas por 15 minutos com diferentes concentrações de H₂O₂. (A) Blot representativo e análise das bandas da P-AKT (n=2). Observe o aumento gradual e sustentado da fosforilação por 80, 200, 300, 500 e 1000 µM de H₂O₂. (B) Fotomicrografias das culturas controle e tratadas com 200 µM de H₂O₂ por 15 minutos (n=3). Note a conservação dos núcleos intactos e sem fragmentação tanto no controle (setas brancas) quanto nas culturas tratadas com H₂O₂ (setas amarelas). (C) Formação de núcleos picnóticos nas culturas tratadas por 30 minutos com 0,5 e 1,0 mM de H₂O₂. Observe em maior aumento a formação de núcleos picnóticos (C', para 0,5 mM de H₂O₂) (C'' para 1,0 mM de H₂O₂). (D) Tratamento com DTT bloqueou a fosforilação da AKT por H₂O₂. (E,F) O efeito do NO endógeno ou exógeno na fosforilação da AKT/PKB não foi bloqueado por DTT mas foi bloqueado por NAC. Os resultados foram normalizados em porcentagem do controle e são as média ± SEM de 3 experimentos independentes (n=3) (D, E e F). As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo teste ANOVA, seguido da análise de comparação múltipla de Bonferroni. Os asteriscos representam ***P≤0,001 quando comparado com o controle; #P< 0,01; ###P<0,001, quando comparados com o efeito do H₂O₂, SNAP ou da L-ARG.

4.15. Tratamento com inibidores da síntese de proteínas (CHX e ANIS) mimetizam os efeitos de NO na fosforilação da AKT/PKB e ERK $\frac{1}{2}$.

Dados do nosso grupo de trabalho demonstram que a cicloheximida (CHX), juntamente com a ativação de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, aumentam a quantidade de L-ARG livre intracelular para a produção de L-citrulina (forma indireta de quantificação de NO), através do aumento da atividade da nNOS em culturas mistas de retina de embrião de galinha (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2006). Por outro lado, a CHX também foi mostrada como regulador antiapoptótico em cultura de neurônios simpáticos induzidos pela retirada de NGF do meio de cultura (Martin et al., 1988), pela excitotoxicidade com glutamato ou deprivação de fatores tróficos na cultura de células PC12 (Serghini et al., 1994; Pittman et al., 1993). Todos estes efeitos parecem ser mediados por um mecanismo de inibição da síntese de proteínas produzidos por CHX. Neste sentido, decidimos caracterizar o efeito da disponibilidade de NO produzida pelo aumento da L-ARG intracelular na fosforilação da AKT/PKB. Para isto, utilizamos o tratamento com dois inibidores da síntese de proteínas CHX e anisomicina (ANIS). Nas figuras 15 A e B observamos a análise das bandas em que as culturas de retina (E8C3) incubadas 24 horas com Hank's foram tratadas com dois inibidores da síntese de proteínas. Observe a cinética temporal rápida na fosforilação da AKT/PKB induzida pelo CHX (350 μ M) (Fig. 15A). Repare o aumento gradual em 15 e 30 minutos e em seguida um decréscimo após estes tempos. O tratamento com CHX ou ANIS não promoveu nenhuma alteração na quantidade total da proteína AKT/PKB, indicando que os inibidores não alteram a síntese ou a modificação pós-traducional destas proteínas. Posteriormente, para descartar qualquer efeito irrestrito na fosforilação da AKT/PKB, fomos verificar se ambos os inibidores também apresentavam o mesmo mecanismo em induzir a fosforilação de outra proteína cinase da via das MAPKs (ERK $\frac{1}{2}$). As figuras 15C e D mostram dados em que ambos os inibidores promoveram a fosforilação da

ERK $\frac{1}{2}$ dependente do tempo de exposição à CHX (rápida e sustentada por 45 e 60 minutos) e da concentração de ANIS (máximo em 50 μ M). Finalmente, para descartar qualquer mecanismo de morte celular que poderia ser desencadeado pelo tratamento com os inibidores, fomos determinar a viabilidade celular pela quantificação de LDH intracelular liberado. Ambos os inibidores não mostraram nenhum sinal de morte aparente quando as culturas eram tratadas por 1 hora com 350 μ M de CHX ou 100 μ M de ANIS (Fig. 15E). Portanto, estes dados sugerem fortemente que a inibição da síntese de proteínas com CHX ou ANIS, através do aumento intracelular de L-ARG e em consequência a produção de NO endógeno, promove a fosforilação tanto AKT/PKB como da via das ERK $\frac{1}{2}$.

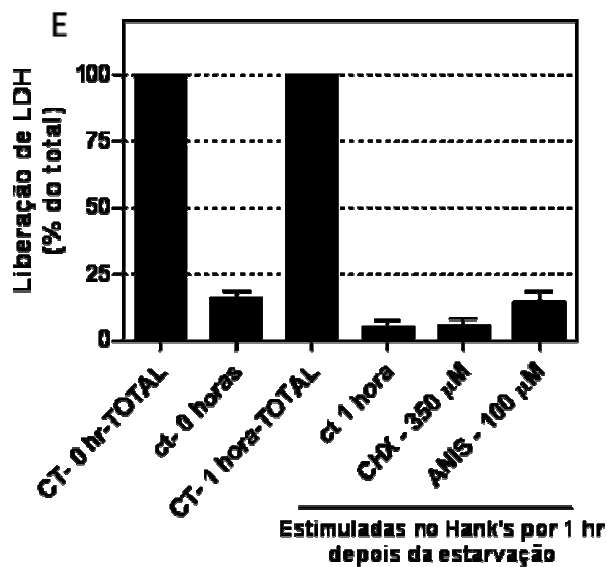
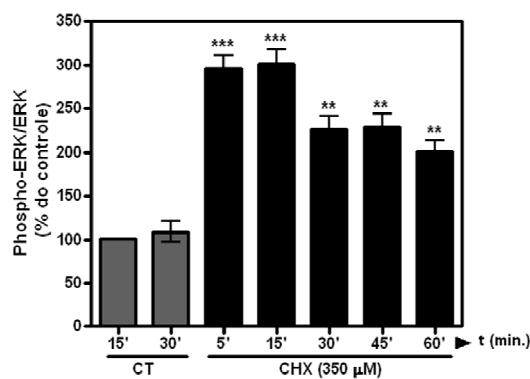
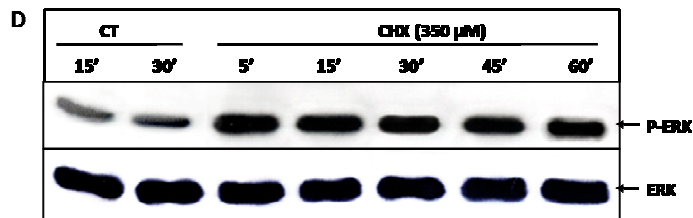
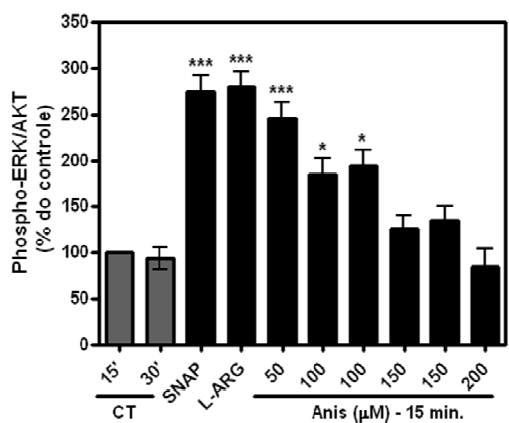
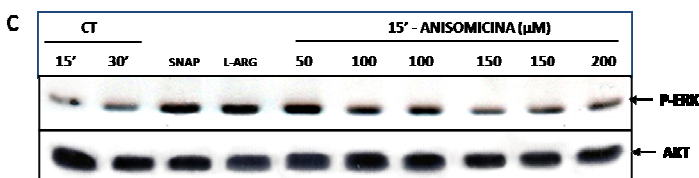
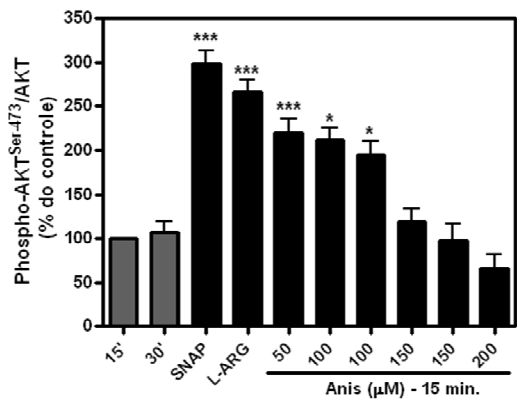
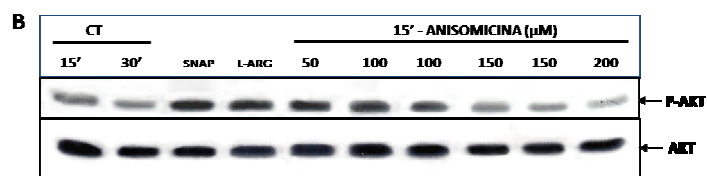
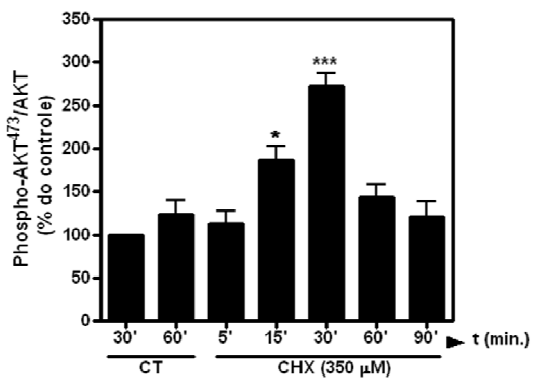
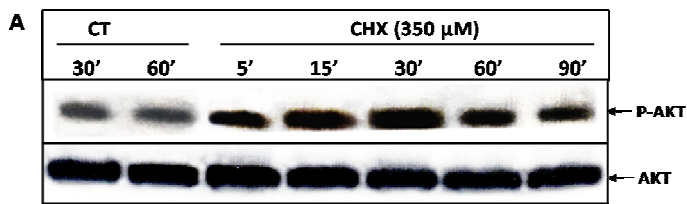


Figura 15. CHX e ANIS mimetizam os efeitos de NO na fosforilação da AKT/PKB e ERK $\frac{1}{2}$.

Imagem representativa e análise densitométrica de blots para Ser-473 da P-AKT (A,B) e para ERK $\frac{1}{2}$ (C,D), obtidas de amostras celulares de culturas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas que foram submetidas a concentrações distintas de ANIS por 15 minutos (B,C) ou CHX (350 μ M) por diferentes tempos (A,D). Note o perfil de ativação máxima induzido por ANIS em 50 μ M para o sítio da Ser-473 da AKT/PKB e ERK1/2 respectivamente. A cinética temporal de fosforilação da AKT/PKB foi transitória mas no entanto a ERK $\frac{1}{2}$ foi sustentada. A viabilidade celular foi determinada pela liberação de LDH após as culturas serem tratadas com 350 e 400 μ M de CHX ou 100 μ M de ANIS por 1 hora. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos realizados em separado (n=3). Os asteriscos representam *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001 quando comparados com o controle. (60 μ g/ μ L de proteína por linha).

4.16. Inibição da NOS com L-NAME inibe o efeito de CHX e ANIS na fosforilação da AKT/PKB.

Em seguida, para confirmar a possibilidade do NO ser produzido pela atividade da enzima (nNOS) através do aumento da L-ARG intracelular após tratamento com CHX e ANIS as culturas foram pré-tratadas por 15 minutos com L-NAME, inibidor da NOS, na presença ou na ausência de CHX ou ANIS. Na Fig. 16A observamos que o inibidor geral e de amplo espectro da NOS (L-NAME), na concentração de 200 μ M, inibiu totalmente a estimulação da AKT/PKB induzida por CHX em 30 minutos ou ANIS em 5, 10, 15 e 30 minutos, de modo semelhante ao observado para L-ARG (ver Fig. 5A). Esses dados foram também repetidos para a fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ em que o pré-tratamento com L-NAME (100, 200 e 300 μ M) bloqueou totalmente a fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ tanto por CHX como por ANIS (Fig. 16B e C). Estes dados sugerem que a produção de NO endógeno induzida pela atividade da nNOS através do tratamento com CHX e ANIS promove a fosforilação das duas proteínas cinases AKT/PKB e ERK $\frac{1}{2}$ em células neuronais da retina em cultura.

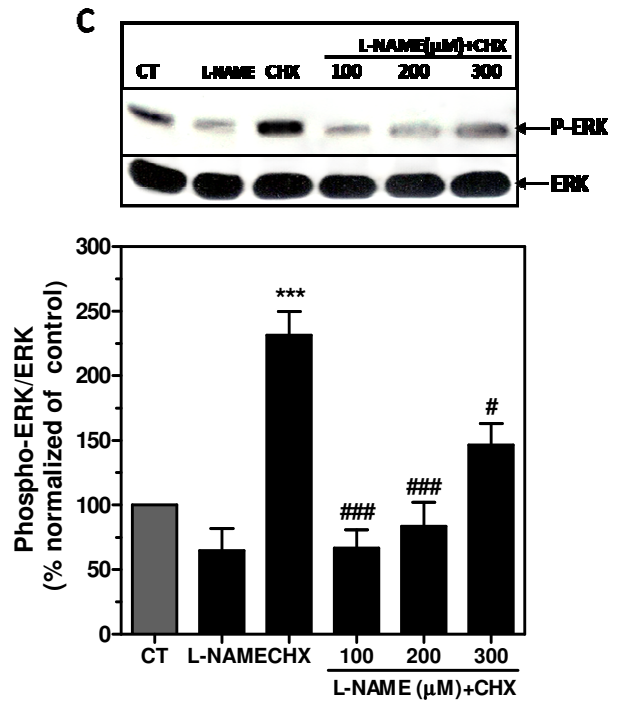
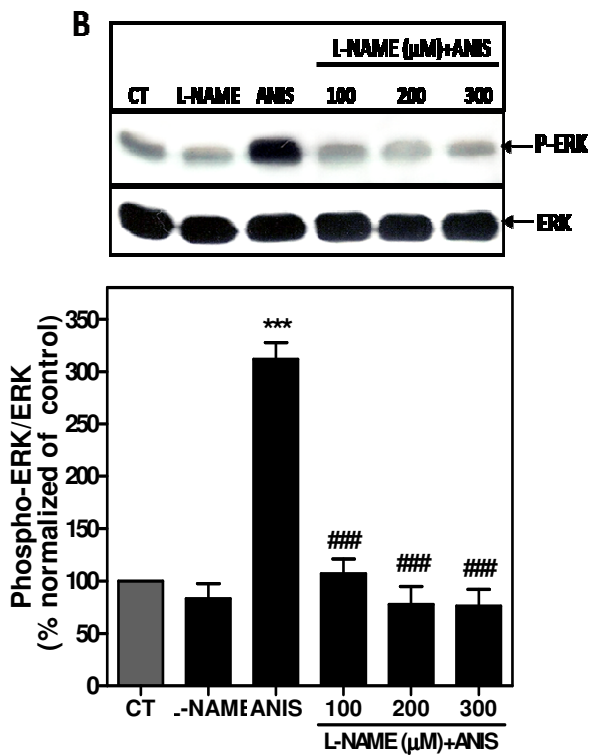
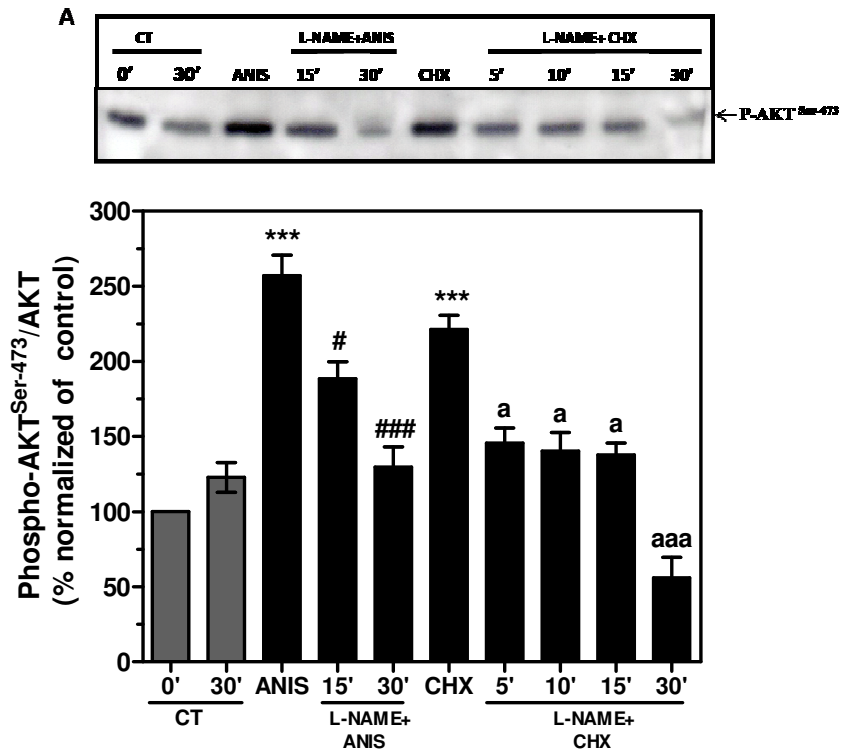


Figura 16. Fosforilação da AKT/PKB por tratamento com CHX e ANIS é bloqueada pelo inibidor da nNOS. Culturas E8C4 incubadas com Hank's por 24 horas foram tratadas previamente com o inibidor geral da NOS (L-NAME) por 15 minutos. (A), A análise das bandas quando culturas eram tratadas com L-NAME (200 μ M) na presença ou na ausência de CHX ou ANIS por diferentes tempos. Note o bloqueio da fosforilação na ATK/PKB. A inibição da ERK $\frac{1}{2}$ também acontece na presença de L-NAME (100, 200 e 300 μ M) tanto na presença ou na ausência de CHX (B) ou da ANIS (C). Os asteriscos denotam ***P<0,001 em relação ao controle, ### P<0,001, #P<0,01 relativo à ANIS ou ^{aaa}P<0,001, ^aP<0,05 relativo a CHX em (A). Em B e C, ### P<0,001 ou # P<0,05 relativo à CHX ou ANIS respectivamente. (60 μ g/ μ L de proteína por linha para imunoblot da P-AKT e 40 μ g/ μ L de proteína por linha para a ERK $\frac{1}{2}$).

4.17. Participação da via de sinalização de NO na fosforilação da AKT/PKB e ERK 1/2 induzida por CHX e ANIS.

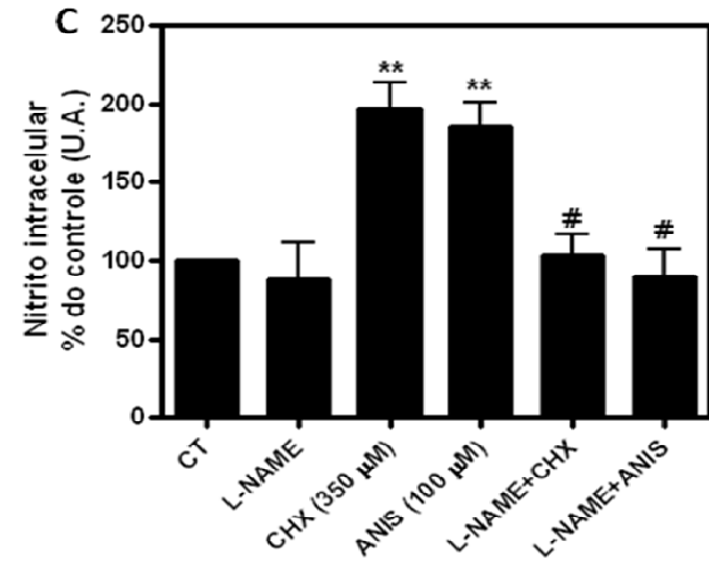
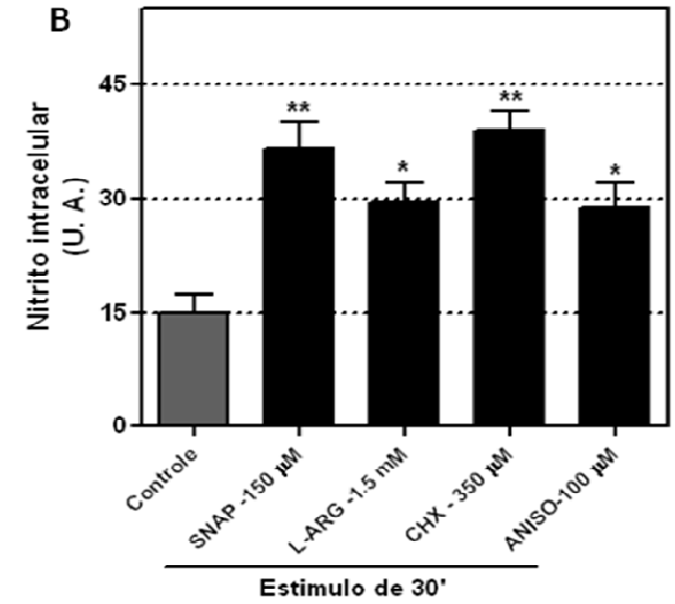
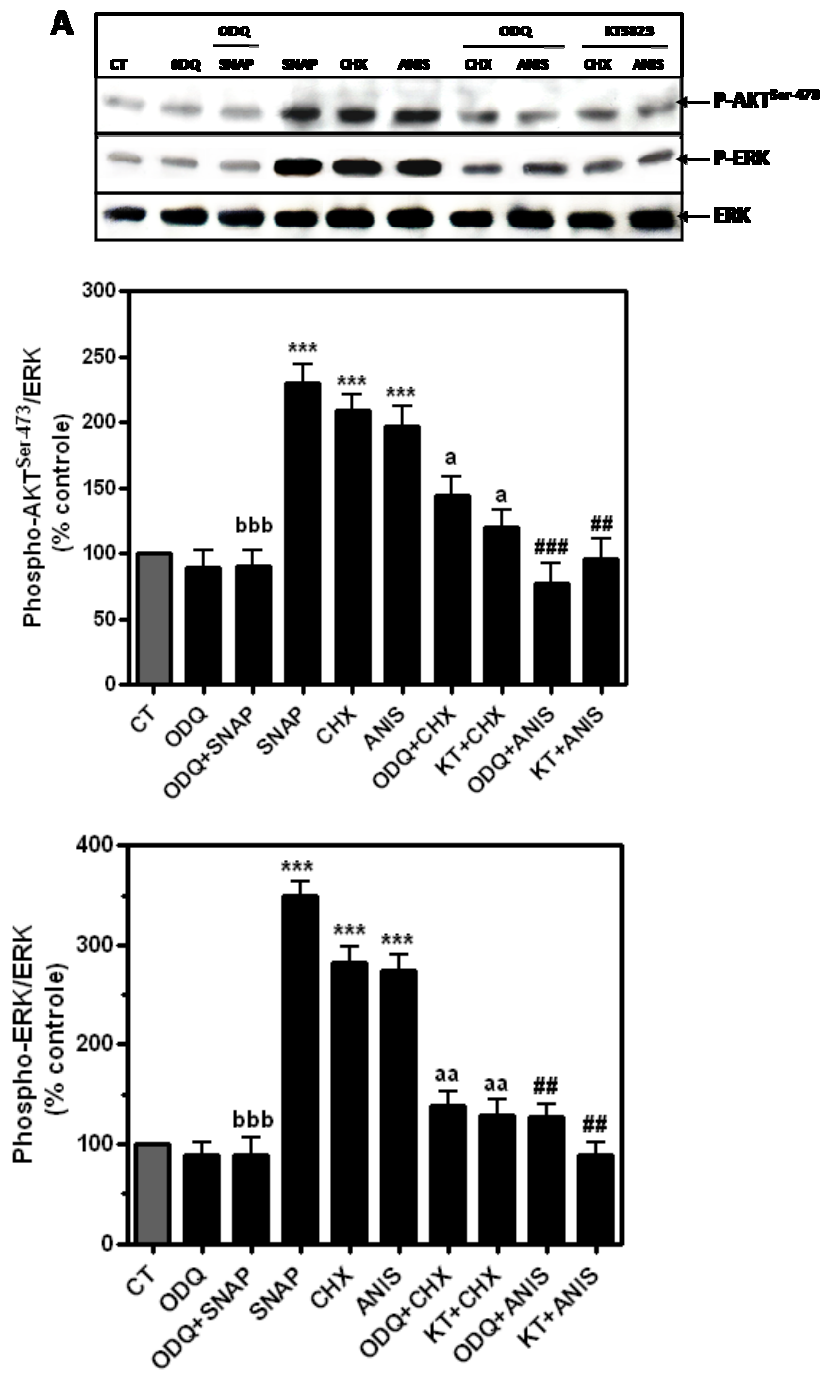
Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que ativação de receptores NMDA (1 mM) e tratamento com CHX (350 μ M) induzem a produção de NO intracelular (Cossenza and Paes-de-Carvalho, 2006) e tratamento com glutamato (250 μ M) promove também a fosforilação da ERK1/2 e CREB via NO (Magalhães Rosa C. Tese de doutorado, 2008). Estabelecendo desta forma uma ligação direta entre ativação de receptores de glutamato, produção de NO e ativação das cascatas de sinalização da ERK1/2, CREB e AKT/PKB (neste trabalho) através da via clássica de NO. Deste modo, com o intuito de avaliar se os efeitos de CHX ou ANIS na ativação da AKT/PKB ou ERK1/2 envolveria a via de ativação clássica pelo NO, as nossas culturas foram pré-tratadas por 15 minutos com o inibidor da GCs, ODQ ou o inibidor da PKG, KT2853. Na figura 17A, observamos claramente que na presença dos inibidores os efeitos tanto de CHX ou ANIS foram bloqueados de forma similar tanto para P-AKT quanto para ERK1/2. Este efeito foi semelhante ao observado com SNAP+ODQ usado como controle positivo (Fig. 17A). Deste modo, sugerimos que a via clássica do NO está participando na ativação da AKT/PKB e ERK1/2 em culturas de retina por tratamento com CHX e ANIS.

Em função dos resultados descritos acima, quantificamos o NO através da medida do nitrito (NO_2), um produto estável do NO, através da reação de Griess, em culturas de retina tratadas com CHX ou ANIS. A figura 17B, mostra que o tratamento com CHX ou ANIS por 30 minutos promoveu aumento significativo de NO de modo semelhante ao observado com SNAP ou L-ARG quando comparados como controle positivo. Por outro lado, a produção de NO foi bloqueada por tratamento prévio com L-NAME (Fig. 17C), indicando em forma conjunta, que o aumento do “pool” de L-ARG

intracelular induzido por CHX e ANIS segue para a produção de NO e em consequência promoveria a ativação de várias cascatas de sinalização via ativação da GCs, produção de GMP cíclico, ativação da PKG, PI3K/AKT, ERK $\frac{1}{2}$, em células de retina em cultura.

Figura 17. A cascata de sinalização do NO está envolvida na fosforilação da AKT/PKB e ERK $\frac{1}{2}$ induzida por CHX e ANIS.

A) Imagem representativa dos blots para P-AKT e P-ERK $\frac{1}{2}$ obtidas a partir de culturas mistas E8C4 incubadas com Hank's 24 horas e tratadas com CHX ou ANIS por 15 minutos na presença ou na ausência do inibidor da GCs, ODQ ou inibidor da PKG, KT5823 previamente incubados por 15 minutos. Observe o bloqueio induzido pelos dois inibidores para cada uma destas enzimas em presença de CHX ou ANIS de modo semelhante ao efeito de SNAP+ODQ usado como controle positivo. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experimentos realizados por separado (n=3). B) Quantificação de nitrito (NO $_2$). Repare o aumento significativo na presença de CHX ou ANIS. C) L-NAME bloqueia totalmente a produção de NO induzida com CHX ou ANIS. Os asteriscos representam em: (A), ***P<0,001 quando comparados com o controle e ^aP<0,05 e ^{aa}P<0,01; ^{###}P<0,001 e ^{##}P<0,01; ^{ccc}P<0,001 quando comparado com CHX, ANIS ou SNAP respectivamente. Em (B), *P<0,01, **P<0,001 em relação ao controle. Em (C), **P<0,001 quando comparado com o controle e #P<0,01 em relação a CHX ou ANIS respectivamente (n=2).



4.18. Efeito do NO na translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo em cultura de células neuronais.

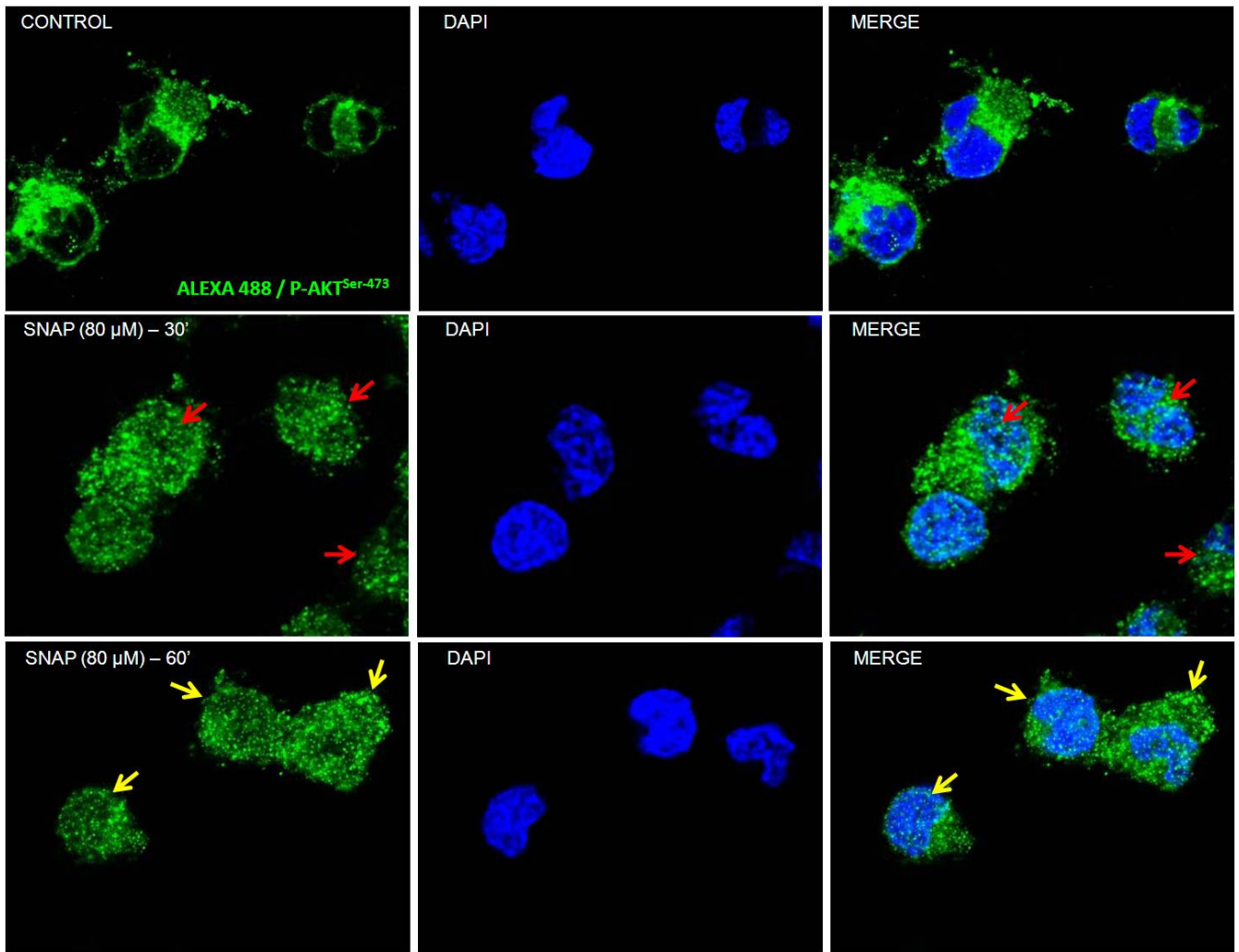
A ativação de receptores tirosina cinase pode induzir sobrevida, proliferação ou crescimento de células neuronais através da ativação da AKT/PKB e de várias proteínas alvo citoplasmáticas ou nucleares (Meier et al., 1997; Borgatti et al., 2003). Por outro lado, o mecanismo pela qual a AKT/PKB é estimulada envolve o recrutamento desta proteína do citoplasma para a membrana através da PI3K com a formação de PIP2 e PIP3 (Lawlor e Alessi, 2001). A subsequente liberação da AKT/PKB fosforilada em ambos os sítios (AKT^{Ser-473} ou AKT^{Thre-308}) da membrana promove a migração desta proteína para vários alvos citoplasmáticos como a mitocôndria (Bijur e Jope., 2003) ou o núcleo (Borgatti et al., 2003). Dados recentes do nosso laboratório mostram que o papel biológico de NO na sobrevida de neurônios em culturas purificadas de células neuronais da retina é dependente da PI3K (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Neste contexto, fomos primeiramente avaliar se o NO exógeno proveniente do SNAP induziria a translocação da AKT fosforilada (AKT^{Ser-473}) para o núcleo em células PC12 (neuronal dopaminérgica) ou SN56 (neuronal colinérgica) através da imunomarcagem com anticorpo secundário anti-coelho (Alexa-488) e visualizadas por microscopia de fluorescência (Zeiss/Apoptome). Na Fig. 18A mostramos que o tratamento com SNAP (80, 120 μ M), promoveu a translocação nuclear tanto em células PC12-P2 quanto SN56-P2. Observe a translocação progressiva dependente da concentração e do tempo de estimulação com o doador SNAP. Estes resultados sugerem que o tratamento com NO exógeno promoveu a translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo como um sinal talvez de sobrevivência. Nas culturas purificadas de neurônios (E8C4) a produção de NO exógeno (SNAP) ou NO endógeno (L-ARG) promoveram também o mesmo perfil de translocação da AKT/PKB ativa para o núcleo de forma gradual e dependente do tempo de exposição a estes agonistas. Portanto, sugerimos que o efeito biológico de

NO (endógeno ou exógeno) não se encontraria restrito a um tipo celular como visto primeiramente na sobrevida de neurônios purificados da retina (Mejía-García e Paes-de-carvalho, 2007) mas também em células PC12 e SN56. Este efeito biológico seria através da ativação e translocação da proteína cinase AKT/PKB para o núcleo e uma conseqüente ativação de fatores de transcrição.

Figura 18. NO promove a translocação nuclear da AKT/PKB fosforilada em cultura de células neuronais. Imunofluorescência para P-AKT^{Ser-473} em culturas de células neuronais PC12 (A) e SN56 (B) ou culturas purificadas de neurônios de E8C4 de retinas de embrião de galinha (C) utilizando anticorpo secundário anti-coelho (Alexa-488) e observadas em microscopia de deconvolução Zeiss/Apotome. Note a intensa imunomarcagem para P-AKT^{Ser-473} no citoplasma (seta vermelha). O tratamento com SNAP (80 μ M) em 30 e 60 minutos promoveu uma translocação nuclear característica dependente do tempo de estimulação com o doador tanto em PC12 (A), SN56 (B) ou por tratamento com 120 μ M de SNAP ou 1 mM de L-ARG em cultura purificada de neurônios. Imagem representativa de pelos menos 2 experimentos independentes (n=2). Aumento de 400x e escala de 20 μ m.

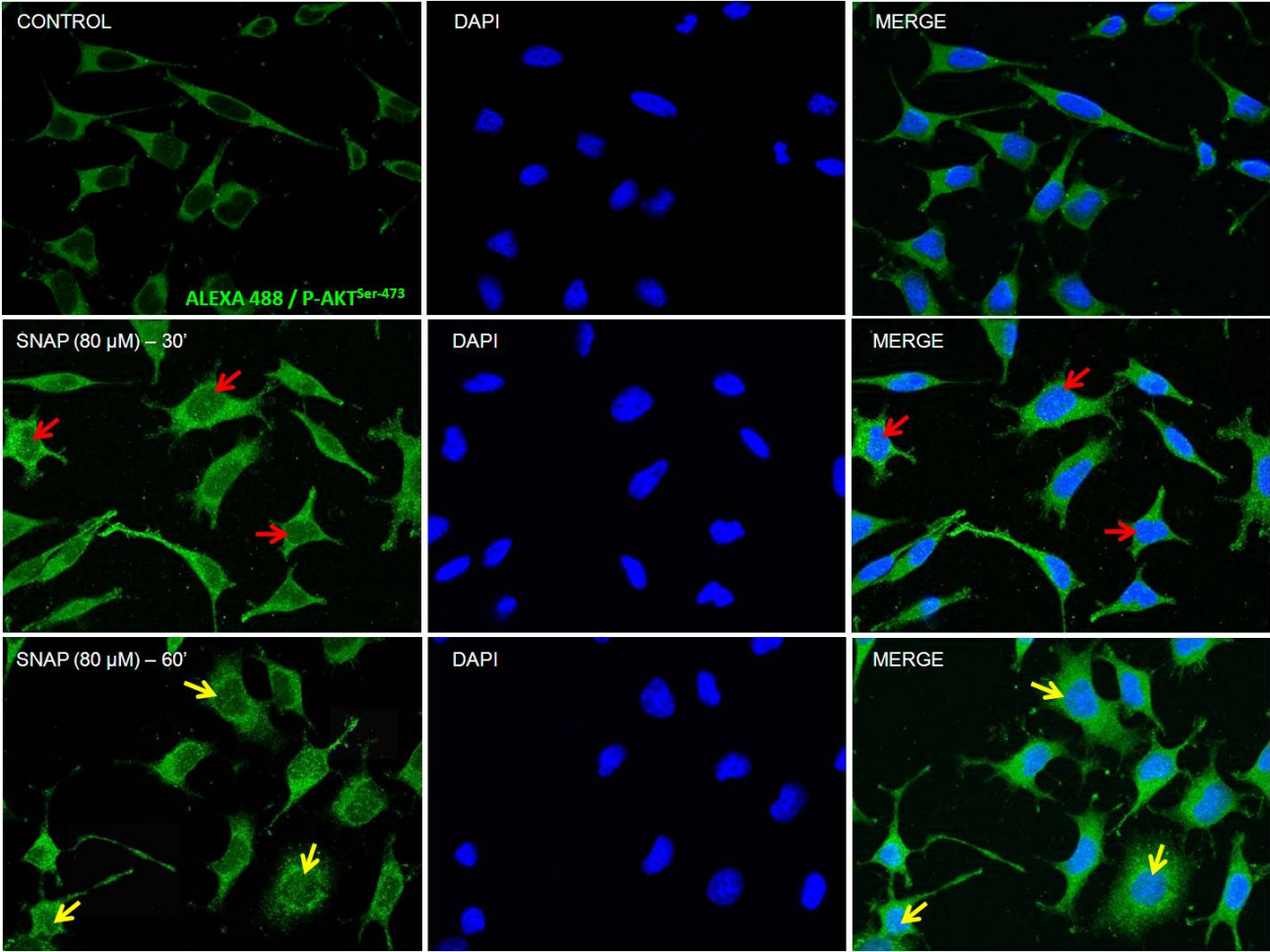
SN-56 (colinérgica)

A



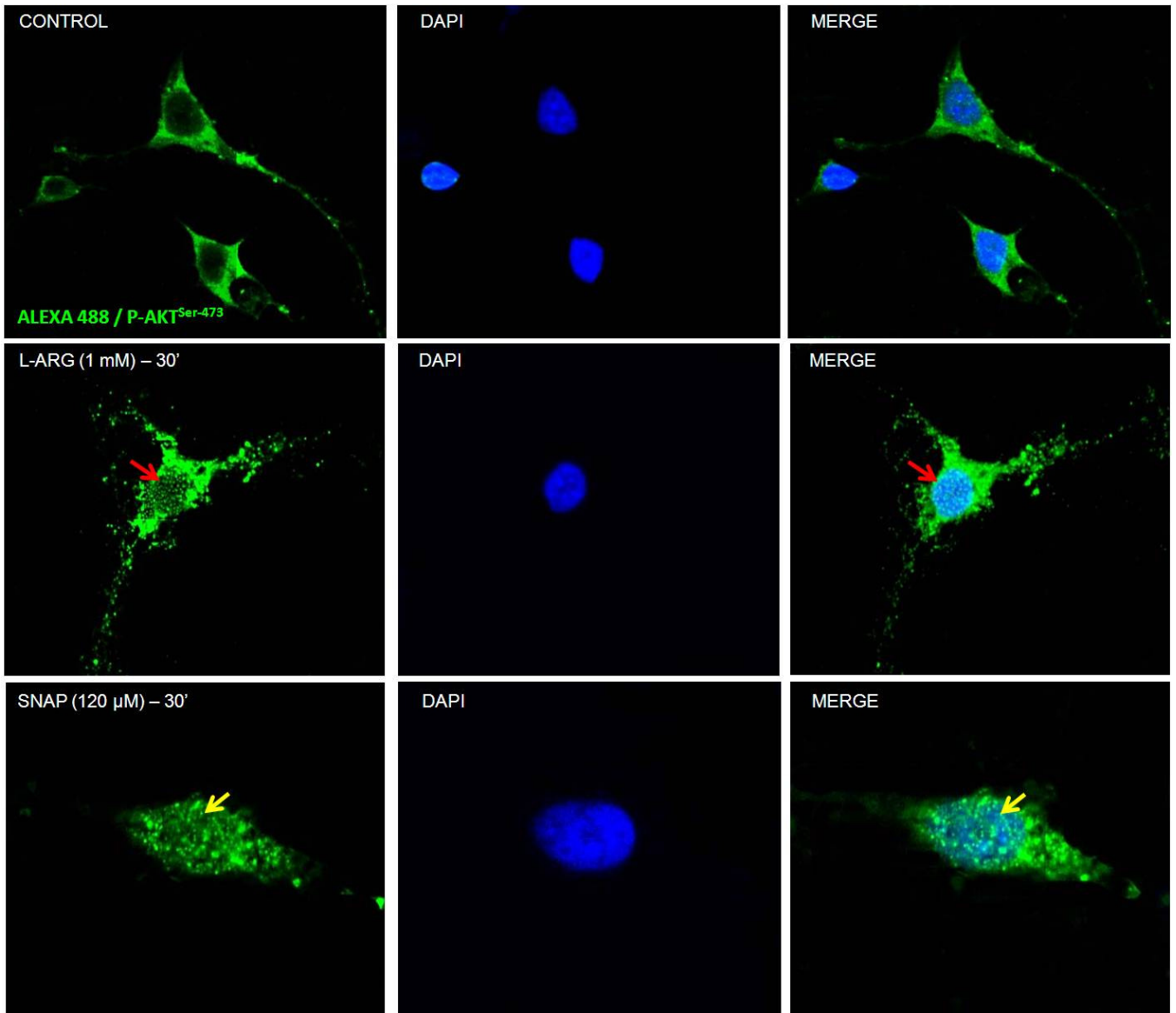
PC12 (dopaminérgica)

B



Cultura purificada de neurônio (E8C4) de retina de embrião de galinha.

C



5. DISCUSSÃO

O propósito do presente estudo foi investigar o papel regulatório do óxido nítrico (NO) na fosforilação da proteína cinase AKT/PKB em células de retina em culturas incubadas com solução salina Hank's por 24 horas, bem como determinar a via de sinalização intracelular desencadeada por NO. Os dados demonstram que o NO exógeno (SNAP), a produção de NO endógeno (L-ARG) ou mimetizado pelo tratamento com inibidores de síntese de proteínas (CHX e ANIS, aumento de L-ARG livre intracelular para síntese de NO) promovem a fosforilação da AKT/PKB de maneira dependente do tempo de estimulação e da concentração destes agonistas. Este efeito, na fosforilação da AKT/PKB, foi dependente do aumento da concentração intracelular de cálcio (proveniente do meio extracelular), da mobilização dos estoques de cálcio intracelular, e da via clássica de sinalização induzida por NO, através da produção concomitante de GMP cíclico e ativação da PKG. Além disso, foi observado que essa ativação também pode ser modulada pela ativação de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA ("upstream" da via nitrérgica), ativação da nNOS, fosforilação da CaMKII dependente de cálcio e calmodulina (Ca^{2+} -CaM), fosforilação da P-SrcTyr-416, e dependente da via da PI3K. Finalmente, demonstramos que, linhagens de tipo neuronal (PC-12 e SN56) assim como em culturas purificadas de neurônios da retina de embrião de galinha, uma subsequente migração da proteína cinase AKT/PKB fosforilada para o núcleo foi observada após tratamentos com SNAP ou L-ARG.

Neste trabalho, realizamos ensaios preliminares objetivando estabelecer um protocolo experimental que nos permitisse conhecer o efeito direto de NO na fosforilação da AKT/PKB. Embora seja bastante conhecido que proteínas serina treonina cinases podem ser estimuladas por fatores tróficos presentes no soro adicionado às culturas cultivadas "in vitro", a retirada de soro, seria uma tentativa de

estudo para nosso modelo experimental, já que tem sido claramente mostrada que a incubação com meio livre de soro em células de linhagem em cultura não causa nenhuma alteração ou dano celular, mas diminui o nível de fosforilação basal de proteínas (Oh-Hashi et al., 1999; Lim et al., 2007). Mostramos claramente em seguida, que na condição livre de soro por 24 horas não houve diferença nenhuma no nível de fosforilação basal da P-AKT quando comparadas com as culturas mantidas com soro (3% FBS). Por outro lado, quando foram feitos experimentos na situação em que a estimulação era feita com Hank's 24 horas surpreendentemente o nível de fosforilação basal da AKT/PKB e outras proteínas cinases (P-ERK^{1/2} e P-Src^{Tyr-416}) diminuíram consideravelmente (ver Fig. 1B, C). Esse perfil diminuído no nível basal da enzima não mostrou nenhuma correlação com morte celular (apoptótico ou necrótico), quando as culturas foram avaliadas pela viabilidade com MTT, liberação de LDH ou pela fragmentação de DNA em gel de agarose. Com base nestes dados sugerimos que a incubação de culturas mistas de retina embrionária de galinha, com Hank's por 24 horas constitui uma boa estratégia para investigar a regulação de proteínas serina treonina cinases por diversos agonistas.

A partir disto, propusemos inicialmente investigar o perfil de ativação da AKT/PKB por NO em células de retina em cultura. Os dados revelam que em culturas mistas E8C4 mantidas com solução salina Hank's por 24 horas, o NO exógeno proveniente do SNAP (doador de NO) foi capaz de promover a fosforilação desta enzima, de maneira dependente do tempo de estimulação (a partir de 5 minutos) e da concentração do doador. Esta fosforilação apresentou um perfil largamente sustentado entre os primeiros 15 e 90 minutos. Diferentes autores defendam que a liberação do NO é lenta a partir deste nitrosotiol SNAP em vários sistemas (Pagliaro, 2003 para revisão; Ferrero et al., 1999). Deste modo, a fosforilação sustentada da AKT/PKB pode estar

relacionada a este mecanismo lento de liberação. Dados recentes do nosso laboratório mostraram que em cultura purificada de neurônios de retina, a liberação de NO acontece gradualmente nas primeiras 3 horas, onde os níveis de liberação permaneceu constante por várias horas (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Trabalhos do grupo de Kim e colaboradores mostraram que em linhagens de tipo neuronal PC12 a fosforilação da AKT/PKB ocorreu unicamente a partir de 1 hora de exposição com SNAP (100 μ M) (Ha et al., 2003). No entanto, outros pesquisadores sugerem que esse NO liberado pelo SNAP teria vários efeitos fisiológicos, inclusive na migração e na angiogênese de células endoteliais (Kawasaki K. et al., 2003). Por outro lado, utilizando células corticais de rato em cultura, o grupo de González tem mostrado contrariamente que na condição livre de soro, o doador SNAP induz morte neuronal por um mecanismo apoptótico (Figuroa et al., 2005). E não seria nada estranho levantar esta questão de que o doador SNAP na concentração de 150 μ M produzisse também morte de células neuronais nas condições experimentais de incubação com Hank's por 24 horas. Entretanto, observações descritas na figura 2C descartaram essa possibilidade de morte aparente através de experimentos de sobrevivência em cultura de células de retina. Vale a pena ressaltar que a exposição crônica ao SNAP 100 μ M ou 120 μ M por 24 ou 48 hr induz proteção neuronal em cultura purificada de neurônios e não morte dessas células (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com o doador SNAP promove a fosforilação gradual e sustentada da AKT/PKB mediada pelo NO exógeno e sem nenhuma alteração na sobrevivência destas culturas.

A via de sinalização através da via clássica de NO-GMPc foi demonstrada induzir crescimento de neuritos, um primeiro sinal de diferenciação (Yamazaki et al., 2004; 2001), além da sobrevivência de neurônios cerebelares (Ciani et al., 2002). Dados

do nosso laboratório mostraram também que NO, via a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), tem papel na sobrevivência de neurônios de retina em culturas purificadas (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). O NO liberado pelo doador SNAP leva a uma produção de GMPc como foi claramente documentado pelos grupos de Magdalena Torres e Kim respectivamente (Ferrero et al., 1999; Há et al., 2003). Nesse contexto, nossos experimentos seguintes tiveram como objetivo caracterizar a cascata de sinalização induzida por NO.

Nossos resultados mostram claramente que o tratamento com zaprinast promoveu uma fosforilação da AKT/PKB dependente de tempo e da concentração, o que sugere que o acúmulo de GMP-cíclico através da inibição da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5, enzima que degrada GMPc) esteja participando da cascata clássica na fosforilação rápida da AKT/PKB induzida por NO. Estas observações foram reproduzidas conjuntamente através da produção aumentada de GMP-cíclico pelo ativador direto da enzima GCs (YC-1) ou através do tratamento com um análogo não hidrolisável (8Br-GMPc), que induzem um mesmo efeito positivo na fosforilação da AKT/PKB rápido em 5 minutos e sustentado até os 45 minutos. Esses dados revelaram previamente que a fosforilação da AKT/PKB depende da produção de GMP-cíclico através da ativação da enzima GCs. Sob essas mesmas condições experimentais a inibição farmacológica da GCs por ODQ ou LY83583 ou inibição da PKG por KT5823 foram capazes também de bloquear o efeito do NO. Em concordância com nossas observações, o grupo de Kim (2003) demonstrou que, em células PC-12, o sistema GMPc/PKG induzia a fosforilação da AKT após 1 hora de tratamento com 8Br-GMPc (Há et al., 2003). Nossos mostram que o NO exógeno, através da cascata clássica (GCs-GMPc/PKG), promoveu a fosforilação da AKT/PKB de maneira rápida (5 minutos) e sustentada (em 15, 30 e 60 minutos) em células de retina em cultura e que este efeito foi

bloqueado por inibidores da GCs e PKG. Finalmente, podemos descartar qualquer efeito de S-nitrosilação direta na fosforilação da AKT/PKB, pois quando as culturas foram tratadas com DTT (antioxidante) não houve inibição, reforçando a hipótese de que o NO promove a fosforilação de modo dependente da via clássica de NO.

Conhecendo a ampla distribuição da enzima óxido nítrico sintase de tipo neuronal (nNOS) no SNC (Bredt et al., 1990, 1991) e embora esta enzima tenha sido imunodetectada apenas em neurônios, nas culturas mistas de células de retina de galinha, (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000), e também tenha sido demonstrada uma atividade alta em estágios precoces do desenvolvimento da retina de galinha (E8) (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996), pouco se sabe do papel regulatório desta nNOS na fosforilação da ATK/PKB. Desse modo, com o intuito de mostrar o efeito do NO liberado endogenamente através da nNOS e mimetizar os efeitos de NO exógeno, as células de retina em cultura incubadas com Hank's foram investigadas em função do tratamento com a L-ARG. O efeito de L-ARG sobre a fosforilação da AKT/PKB demonstrou uma dependência da dose, onde o aumento da concentração deste substrato para enzima nNOS foi acompanhado de um aumento rápido na fosforilação da cinase AKT/PKB em 5 minutos, como nos casos anteriores, e sustentada por 1 e 2 horas. No entanto, nas concentrações de 2 e 3 mM a resposta positiva diminuiu significativamente (ver Fig. 4A). Uma situação parecida foi observada pelo grupo de Kaneki quando em vários modelos celulares em cultura tratadas com altas concentrações de NO produziram inativação da AKT/PKB (Yasukawa et al., 2005). Essa inativação descrita foi mediada por um mecanismo de S-nitrosilação da AKT/PKB na serina 224 e independente da formação de GMPc e ativação da PKG. Portanto, esse achado sugere a possibilidade de haver um sítio de regulação diferente na P-AKT induzido a partir de

concentrações superiores de NO que poderiam ser liberadas através da exposição à L-ARG (2 e 3 mM).

Entretanto, a possibilidade de uma produção de NO endógeno liberado através da atividade da enzima (nNOS) a partir do substrato L-ARG, foi confirmado quando foram usados vários inibidores da NOS como o L-NAME, análogo seletivo da L-ARG o NARG ou inibidores seletivos para a enzima sintase de tipo neuronal (L-NIO e 7-NI). Todos esses compostos foram capazes de bloquear completamente o efeito da L-ARG na fosforilação da AKT/PKB. Esses dados sugerem claramente que a produção de NO endógeno envolve a ativação da nNOS a partir do tratamento com L-ARG (1mM) e induz a fosforilação da AKT/PKB de maneira dependente do tempo e da concentração em nossas culturas. Dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de investigação mostraram o fortalecimento no sistema de sinalização de NO endógeno através da conversão de L-ARG em L-citrulina pela disponibilidade de L-ARG induzida pelo inibidor de síntese de proteínas (CHX) em células neuronais de retina em cultura que contêm a nNOS (Cossenza et al., 2006). Deste modo, os resultados obtidos sobre a produção de NO a partir de L-ARG confirmam a nossa hipótese, de que a produção de NO endógeno através da atividade da nNOS pode ser reduzido por tratamento com inibidor da enzima NOS (L-NAME).

A sinalização nitrérgica clássica (NO-GMPc/PKG) é regulada através da ativação de receptores glutamatérgicos. No entanto, alguns dos efeitos do zaprinast parecem envolver a liberação de glutamato e conseqüente aumento na concentração de GMP cíclico na retina isolada de rato (Barabár et al., 2002; 2003) sugerindo haver um papel regulatório de feedback positivo entre ambos os sistemas. O glutamato é um neurotransmissor capaz de promover mudança de potencial da célula nervosa, que é um evento importante para a comunicação celular do sistema nervoso. A existência de

receptores de tipo ionotrópico e metabotrópico foi demonstrada na retina de várias espécies, incluindo na retina de aves (Hack et al., 2002; para revisão Thoreson e Witkovsky, 1999; Sampaio e Paes-de-Carvalho, 1998), assim como também, em cultura de células de retina de embrião de galinha (Cristóvão et al., 2002b). Estas observações nos levaram a sugerir que o sistema glutamatérgico modulador da via nitrérgica (NO) poderiam regular de maneira linear a fosforilação da AKT/PKB. Nossos dados apontam que a fosforilação da AKT/PKB é dependente do tempo de exposição ao glutamato (500 μ M). Embora dados da literatura sugiram que altas doses de glutamato possam ser excitotóxicas para culturas da retina embrionária de galinha (López-Colomé e López, 2003; Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001), a concentração de glutamato e o tempo de exposição usados nestes experimentos não induziu nenhum sinal de morte celular. Igual resultado foi documentado por Ulliam e colaboradores em células ganglionares de retina de rato (Ulliam et al., 2004). Esses achados sugerem que o sistema glutamatérgico possa modular o sistema nitrérgico, via fosforilação da AKT/PKB, sem nenhum sinal de morte aparente nas culturas de retina.

Entretanto, a produção de NO é regulada também pela ativação de receptores ionotrópicos de tipo NMDA (Christopherson et al., 1999) ou AMPA/Kainato (Radenovic e Selakovic, 2005). Dados anteriores do laboratório estabeleceram uma ligação entre a ativação de receptores NMDA, o influxo de cálcio (Ca^{2+}) e a ativação da nNOS nas células da retina (Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996). De fato, no presente trabalho demonstramos que nas culturas mistas o tratamento com NMDA induz a fosforilação da AKT/PKB de maneira similar ao observado com SNAP, L-ARG e glutamato (rápida e sustentada). Estes efeitos do glutamato e NMDA foram bloqueados pelo inibidor geral da NOS (L-NAME) e pelo inibidor específico do receptor de tipo NMDA (MK-801). Por outro lado, o antagonista do receptor de tipo AMPA/Kainato

(DNQX) não foi capaz de bloquear o efeito do glutamato em nossas células de retina em cultura (dados não mostrados). Além disto, observações de outros autores sugerem também que o glutamato, através do receptor de tipo AMPA, induz a fosforilação da AKT/PKB e este efeito é em parte atribuído à presença de células gliais na cultura (exemplo: glia de Bermann) (Molares et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados por nosso grupo de trabalho, que mostrou que o glutamato induz fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ e da CREB em culturas purificadas de glia de Müller através de receptores AMPA/Kainato e foram inibidas por DNQX, mas não com MK-801 (Socodato et al., submetido). Esses dados, em conjunto, sugerem fortemente que o sistema glutamatérgico de tipo ionotrópico promove a fosforilação da AKT/PKB através ativação do receptor de tipo NMDA, e da produção de NO endógeno pela nNOS em células de retina em cultura.

Por outro lado, foi demonstrado anteriormente no laboratório que a despolarização com alto potássio (KCl) induz a liberação de purinas em neurônios purificados de retina em cultura (Paes-de-Carvalho et al., 1990). Além disto, a alteração do potencial da membrana e liberação de purinas pelo glutamato foi dependente da participação do cálcio externo e de receptores de tipo NMDA em culturas mistas de retina de galinha (Paes-de-Carvalho et al., 2005). Processos induzidos pela mudança de potencial da célula nervosa apresentam efeitos na sobrevivência de neurônios simpáticos tratados com KCl (Ikegami e Koike, 2000). Nesse trabalho também se mostrou que a despolarização da célula com KCl desencadeia a ativação das vias da CaMKII e PI3K/AKT provavelmente de uma maneira dependente de cálcio externo. Neste contexto, o nosso trabalho mostra que a despolarização da membrana por tratamento com KCl, glutamato ou NMDA induz também a fosforilação da AKT/PKB de maneira rápida e sustentada. Estas evidências nos levaram a suspeitar que KCl e glutamato

podessam promover primeiramente o influxo de cálcio externo respectivamente através de canais ativado por voltagem e ativação do receptor de tipo NMDA, e secundariamente, envolvendo a elevação de cálcio intracelular, levaria a efeitos positivos na fosforilação da AKT/PKB. De fato, a sinalização por NO exógeno, a produção de NO endógeno ou tratamento com NMDA foi bloqueada por tratamento prévio com EGTA. Estudos realizados em neurônios cerebelares mostraram que ativação da AKT/PKB por BDNF promoveu a fosforilação do receptor de tipo NMDA (com aumento intracelular de cálcio) indicando um mecanismo de sinalização dependente de cálcio externo na fosforilação da AKT/PKB (Sánchez-Pérez et al., 2006). Em função destas observações, podemos sugerir que SNAP ou L-ARG poderiam aumentar a concentração de cálcio intracelular. De fato, no presente estudo confirmamos que o efeito de SNAP e de L-ARG promoveram o influxo rápido de cálcio externo em culturas purificadas de neurônios. Esse aumento de cálcio intracelular foi bloqueado pela nifedipina, o que viria a confirmar a hipótese acima com relação ao envolvimento do cálcio externo na fosforilação da AKT/PKB promovida por NO. Desse modo, estes dados em conjunto sugerem que a produção de NO endógeno (L-ARG) ou NO exógeno (SNAP) promovem a fosforilação da AKT/PKB através do aumento da concentração de cálcio intracelular, proveniente do meio extracelular através da ativação de receptores de tipo NMDA e do canal de cálcio tipo L. Estes dados estão em concordância com os reportados pelo grupo de Yun em 2003, que mostram que KCl induz aumento da sobrevivência neuronal via ativação dos canais de cálcio tipo-L. Eles argüem que o bloqueio do influxo de cálcio proveniente do meio extracelular é um importante elemento na regulação da sobrevivência porque a nifedipina e o EGTA bloquearam esse efeito (Kim et al., 2003).

Dados da literatura mostram que o aumento de cálcio intracelular através da mobilização dos estoques de cálcio interno também participaria na fosforilação da AKT/PKB (Pandiella-Alonso et al., 1986). O grupo Comella demonstrou claramente que em motoneurônios isolados do cordão espinhal de embrião de galinha (MTN) a via da PI3K/AKT é regulada por aumento da concentração de cálcio intracelular (advindo do espaço extracelular) e da mobilização do cálcio interno induzido por GDNF (Pérez-García et al., 2004). Essas evidências em conjunto com nossas observações sugerem que a fosforilação da AKT/PKB também é induzida pela mobilização do cálcio interno, uma vez que BAPTA, TPG ou EGTA bloquearam significativamente os efeitos de SNAP, YC-1 ou L-ARG. Por outro lado, o tratamento das culturas de retina com PMA ou Carbacol, que facilitam a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares mimetizou os efeitos de NO na fosforilação da AKT/PKB, reforçando mais ainda a nossa hipótese descrita anteriormente de ser o cálcio liberado a partir dos estoques intracelulares também envolvidos na fosforilação da AKT/PKB.

Foi proposto que a atividade bio-elétrica conjuntamente com neurotrofinas (NTs) coopera para promover sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento (Franklin e Johnson, 1992). A atividade neuronal induzida por despolarização exerce estes efeitos por aumento da concentração de cálcio intracelular (Egea et al., 2001). O cálcio desencadeia a ativação de vias de sinalização semelhantes às desencadeadas por neurotrofinas, através da proteína ligadora de cálcio, a calmodulina (CALM) (Finkbeiner e Greenberg, 1996). A partir dessa premissa caracterizamos melhor o efeito de cálcio na fosforilação da AKT/PKB. A possibilidade do complexo Ca^{2+} -CALM promover a fosforilação da AKT/PKB via PI3K foi descrita pelo grupo da Rosa-Soler, que propõem existir um sítio de ligação dentro do domínio regulatório da subunidade P85 da PI3K (Pérez-García et al., 2004). Outros resultados semelhantes foram

encontrados em que o complexo Ca^{2+} -CALM induziu a produção de PIP2 e PIP3, um sinal de ativação da PI3K. O mesmo grupo sugere a existência de outro sítio de ligação diferente e de alta afinidade dentro da subunidade catalítica P110 da PI3K (Joyal et al., 1997; Fisher et al., 1998). Embora existam dados em que o complexo Ca^{2+} -CALM apresenta ligação direta com as subunidades da PI3K (catalítica ou regulatória) após tratamentos com BDNF ou NGF, uma recente investigação mostrada por Deb (2004), confirma que este complexo pode também interagir diretamente com a proteína cinase AKT/PKB após tratamento com EGF (Deb et al., 2004). Assim, aparentemente não parecem existir padrões relacionados à ativação da AKT/PKB com a geração de uma determinada resposta, o que indica que esses parâmetros poderiam variar de acordo com o tipo celular e receptores de fatores tróficos envolvidos. Por outro lado, os nossos experimentos sugerem que o pré-tratamento com vários inibidores de CALM (Calmidazolium, W-7 ou TRIF) bloqueou tanto o efeito do NO exógeno como o NO endógeno na fosforilação da AKT/PKB e não mostrou alteração alguma na viabilidade celular destas culturas. Portanto, com estes achados sugerimos que SNAP e L-ARG, fornecendo NO exógeno e produzindo NO endógeno respectivamente, promovem o aumento da concentração de cálcio intracelular, formação do complexo Ca^{2+} -CALM e conseqüente fosforilação da AKT/PKB.

Monteiro e colaboradores em 2003 mostraram que em fibroblastos de camundongo, o par NO/GMPc promove a fosforilação de proteínas em resíduos tirosina, através das posteriormente identificadas cinase de adesão focal (FAK), Src e MAP cinase (Oliveira et al., 2003). Evidências experimentais descritas pela literatura têm mostrado a participação da proteína P21Ras como um ponto de convergência entre diferentes cascatas de sinalização (Kolch W. 2000). A base estrutural para a interação entre NO e P21Ras foi inicialmente proposta através de um mecanismo de S-

nitrosilação de um único resíduo de cisteína (Cys118) presente na P21Ras (Oliveira et al., 2003). Além disto, várias evidências têm sugerido que múltiplos complexos de sinalização poderiam participar nos efeitos celulares seguidos à estimulação de receptores de glutamato de tipo ionotrópico (Husi et al., 2000; Sheng e Pak, 2000). Por exemplo, a via da MAPKs/ERK $\frac{1}{2}$ é uma das vias de transdução de sinal dependente do influxo de cálcio através da ativação de receptores NMDA (Bading e Greenberg, 1991; Kurino et al., 1995). É interessante também que a concentração de cálcio intracelular aumentada através da ativação de canais de Ca $^{2+}$ dependentes de voltagem pode promover a fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ via Src (Perkinton et al., 1999). Deste modo, a relação entre NO e a ativação da ERK $\frac{1}{2}$ vem sendo estabelecida em vários estudos (Yamazaki et al., 2005), aparentemente através da via GMPc/PKG (Endo e Launey, 2003) ou através de um mecanismo dependente de Ca $^{2+}$ -CAM, via CAMKK (Schmitt et al., 2004). Assim, em função destes achados coletados da literatura nós procuramos estabelecer primeiramente se o inibidor da via das ERK poderia regular a fosforilação da AKT/PKB. Nesse contexto, a pré-incubação das culturas de retina com inibidor da MEK (PD98059) não bloqueou o efeito de SNAP, ou da L-ARG e nem do YC-1. Dados preliminares e não mostrados neste trabalho com outro inibidor estruturalmente diferente da MEK (OU126) mostrou efeito similar. Embora NO promova também a fosforilação da ERK $\frac{1}{2}$ (Socodato et al., submetido) sugerimos que seja regulada pela via da PI3K/AKT.

Dados reportados na literatura mostram que NMDA, através do aumento da concentração de Ca $^{2+}$ intracelular em células de neuroblastoma NG-180, promoveram a ativação da CaMKK e conseqüente fosforilação da AKT/PKB (Yano et al., 1998). Assim, inibidores de CaMKII (KN-62 e KN-93) bloquearam respectivamente os efeitos do NO endógeno e NO exógeno. Surpreendentemente, os tratamentos com SNAP ou L-

ARG promoveram a fosforilação da proteína cinase dependente de Ca^{2+} -CaM (CaMKII) e foram inibidos pelo inibidor da própria enzima (KN-93). Com base nessas observações, sugerimos que o tratamento com NO promove o acúmulo de Ca^{2+} intracelular, formação do complexo Ca^{2+} -CaM, fosforilação da CaMKII e conseqüente fosforilação da AKT/PKB através da via independente da ERK em culturas retina.

Atualmente diversos autores têm apontado a participação da enzima tirosina cinase c-Src na fosforilação da AKT/PKB por tratamento com glutamato, via ativação de receptores de tipo NMDA (Crossthwaite et al., 2004), ou diretamente através da via clássica de NO (GMPc/PKG), por tratamento com DETA-NO, um doador de NO (Tejedo et al., 2004). Assim, em nosso modelo experimental observamos que o inibidor da família tirosina cinase Src (PP1) bloqueou significativamente a fosforilação da AKT/PKB por NO tanto endógeno como exógeno. Este bloqueio envolveu também a participação da produção de GMPc, o que sugere uma vez mais que a concomitante produção de GMPc induzida por YC-1 se encontra comprometida na fosforilação da AKT/PKB via NO. No entanto, aqui também mostramos que o NO exógeno (L-ARG), endógeno (SNAP) e produção de GMPc promoveram a fosforilação da P-SrcTyr-416 dependente do tempo de estimulação e da concentração destes agonistas. Esses dados estão em concordância com os da literatura mostrados por Tejedo et al. (2001) sugerindo que o NO promova a sobrevivência de células RINm5F via PI3K/AKT dependente da ativação da P-Src. Especulamos que a proteína cinase Src poderia reforçar o sinal mediado por NO na AKT/PKB em uma etapa paralela à ativação da PKG. Entretanto, dados da literatura nos dão uma clara visão de uma ligação direta com a PI3K, através do domínio SH2 da subunidade regulatória P85 (Pawson et al., 2001). Esse achado reforça a nossa hipótese de que o NO promove a fosforilação da P-Src^{Tyr-416} de maneira dependente da formação de GMP cíclico e deste modo induz a

fosforilação da AKT/PKB. Outra possibilidade como mecanismo alternativo seria que a fosforilação da Src esteja regulando a atividade da tirosina fosfatase PTEN (Lu et al., 2003) ou através da interação direta com a AKT/PKB (Jiang e Qiu Y., 2003). Este último mecanismo pressupõe que a Src possa regular diretamente a atividade da AKT/PKB por fosforilação na tirosina 315 e treonina 326 no “loop” de ativação da AKT/PKB.

Um número crescente de evidências experimentais tem demonstrado a participação de NO na liberação de neurotransmissores no SNC (Ohkuma e Katsura, 2001, para revisão). Por outro lado, os resultados descritos por Clementi em 1995 mostram que NO modula os sinais enviados por receptores de fatores tróficos (neurotrofinas) com atividade tirosina cinase, através de uma via de sinalização envolvendo GMP cíclico-PKG. Nesse contexto, foi mostrado que o fator neurotrófico BDNF regula positivamente a expressão da enzima nNOS durante o desenvolvimento do SNC, o que sugere um importante papel deste fator neurotrófico nos efeitos de NO (Cellerino et al., 1999, Cheng et al., 2003). Entretanto, outros estudos demonstraram que NO promoveu a ativação da P21-Ras, recrutamento da enzima PI3K e da Raf-1 cinase (Lander et al., 1995, Deora et al., 2000). Desse modo, avaliamos que, sob nossas condições experimentais, o efeito de inibidores da PI3K (LY294002 e Wortmannin), principal enzima envolvida na via de sinalização envolvendo a fosforilação da AKT/PKB, foram capazes de bloquear a fosforilação desta enzima por NO em culturas de células de retina. Essas evidências nos permitem sugerir que a fosforilação da AKT/PKB envolve a participação da PI3K, abrindo a possibilidade de que a produção de GMP cíclico e ativação da PKG estejam modulando a fosforilação da AKT/PKB por um mecanismo ainda desconhecido, ou através de uma via alternativa na liberação de

neurotransmissores induzida por NO e a consequente ativação de receptores tirosina cinase, no caso para BDNF, e fosforilação da AKT/PKB dependente de Src e PI3K.

Trabalhos prévios do laboratório mostram que a troca de meio (estresse oxidativo) desencadeia morte celular em cultura purificada de neurônios, mas este efeito foi bloqueado pelo tratamento com adenosina (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001) ou com NO (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Em contrapartida, dados na literatura mostram que a deprivação de soro no meio da cultura induz a produção de radicais livres pela mitocôndria ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , malondialdeído) induzindo mecanismos oxidativos de estresse celular que têm como resultado final morte por apoptose (Andoh et al., 2003) ou de forma contrária, ativação de múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo a PI3K/ATK para induzir a proliferação ou sobrevivência (Lim et al., 2007). Dados na literatura também apontam que H_2O_2 induz ativação direta da PI3K através da formação de um complexo com a subunidade catalítica p110 (Qin e Chock, 2003). Outros estudos têm documentado que H_2O_2 promove a inibição da fosfatase PTEN, induzindo maior acúmulo do PIP3 e consequente ativação da AKT/PKB (Kwon et al., 2004). Nesse contexto, tentamos caracterizar de forma indireta que H_2O_2 induz ativação da ATK/PKB via PI3K ou através da regulação redox da fosfatase PTEN. Efetivamente, demonstramos que H_2O_2 induz claramente o aumento dos níveis de fosforilação da AKT/PKB de modo dependente da concentração. Uma possibilidade a ser verificada seria aquela observada por Wang e colaboradores em 2000 que, em células HeLa, H_2O_2 induz ativação do EGFR e consequente fosforilação da AKT/PKB. Embora a transativação do receptor tirosina cinase (RTK) não possa ser excluída, outros trabalhos confirmam a nossa hipótese que de fato H_2O_2 induz a transativação do EGFR (Chen et al., 2001, Zhougang e Schnellmann, 2004). Entretanto, Frank et al. (2000) mostraram que H_2O_2 promove também uma clivagem do complexo

HB-EGF imaturo por metaloproteinase e Chen et al., (2001), mostra que este composto promove uma ativação intermediária via P-Src em células endoteliais. Além disto, outra possibilidade a ser considerada é também a nível da inibição redox da fosfatase PTEN como dito acima. Recentemente, radicais livres ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) produzidos por NADPH oxidases têm mostrado uma inibição reversível da fosfatase PTP1B que deste modo regula sinais produzidos por receptores tirosina cinases (Bae et al., 1997 e 2000). Foi também mostrado que H_2O_2 inibe de forma reversível a fosfatase PTEN, aumentando a sinalização PI3K/AKT (Lee et al., 2002, Kwon et al., 2004). Neste sentido, intuímos que o efeito do H_2O_2 não seja diretamente na enzima PI3K, mas sim na inibição da fosfatase PTEN ou PTP1B, duas enzimas importantes que regulam a sinalização da PI3K/AKT.

O pré-tratamento com DTT (um antioxidante com propriedades de bloquear nitrosilação em proteínas) foi capaz de bloquear a fosforilação da AKT/PKB induzida por H_2O_2 . Com efeito, a possibilidade descrita anteriormente pode ser mais considerada porque H_2O_2 inibe por mecanismos de S-nitrosilação a fosfatase PTEN tendo como resultado final o aumento na fosforilação da AKT/PKB (Lim e Clément, 2007). Deste modo, sugerimos que o efeito de H_2O_2 seja via um mecanismo redox por S-nitrosilação direta na PTEN, e por outro lado, o efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB seja independente de S-nitrosilação porque em nossos dados o DTT não foi capaz de bloquear a fosforilação da AKT/PKB. No entanto, não descartamos a participação de mecanismo de S-nitrosilação da PTEN por tratamento com NO. Pois em contraste com outras revisões o grupo de Whorton em 2005 mostrou que nitrosotióis promovem a oxidação e inativação da tirosina fosfatase PTEN dependente da liberação de NO (Yu et al., 2005). Assim podemos sugerir que o SNAP (nitrosotiol), produtor de NO exógeno e o tratamento com a L-ARG (NO endógeno) regulam positivamente a fosforilação da

AKT/PKB por um mecanismo independente de S-nitrosilação desta enzima, mas dependente da inativação da fosfatase PTEN.

Por outro lado, NAC (outro antioxidante) não mostrou nenhum sinal inibitório da AKT/PKB estimulada por H_2O_2 . Uma possibilidade seria que NAC possa estar sequestrando radicais livres como NO (scavenger) e não H_2O_2 , e seria através deste efeito que o NO não teria mais efeito na fosforilação da AKT/PKB, pois na presença de NAC a fosforilação induzida por SNAP ou L-ARG foi bloqueada. Esse aparente mecanismo inibitório com tratamento com NAC pode sugerir uma via alternativa como “scavenger” do próprio NO e em consequência, independente de S-nitrosilação já que a forma oxidada do doador SNAP (NAP) não mostrou efeito nem na sobrevivência das culturas purificadas (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007) e nem na fosforilação da AKT/PKB (dados não mostrados). No entanto, mais experimentos são necessários para excluir esta possibilidade do NAC atuar como “scavenger” de NO.

Vários estudos têm proposto uma relação direta entre o aumento de L-ARG transportada do espaço extracelular e produção de NO (Wiesinger, 2001). Outros autores colocam a importância deste transporte de L-ARG como um fenômeno chamado “paradoxo da L-ARG” onde se determina que a produção de NO possa ser aumentada por adição de L-ARG extracelular, além da concentração intracelular de L-ARG ainda estar elevada. Este achado sugere que a L-ARG disponível no meio intracelular seria compartimentalizada em diferentes “pools” e utilizada para outros fins. Neste sentido, a enzima NOS teria pouco acesso a este “pool” e usaria a L-ARG proveniente do meio extracelular para produção de NO (Kurz e Harrison, 1997, Vega-Agapito et al., 1999, 2002). Dados do nosso laboratório mostram que a captação de L-ARG do meio extracelular pelas células de retina de pinto ocorre através de um sistema de transporte de alta afinidade (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000). O nosso grupo mostrou mais

recentemente que a ativação de receptores de tipo NMDA mimetiza o efeito de CHX na inibição de síntese de proteínas, tendo como consequência final um aumento de L-ARG intracelular livre (não incorporada em proteínas) disponível para mais síntese de NO (Cossenza et al., 2006). Neste sentido, os nossos dados apontam que inibidores de síntese de proteínas promovem maior acúmulo do “pool” intracelular livre de L-ARG e também uma maior síntese de NO. Nesse contexto, a quantificação de nitrito mostra que tanto L-ARG, quanto inibidores da síntese de proteínas (CHX, ANIS), induzem maior produção de NO (NO_2). Esse NO endógeno foi produzido pela atividade da nNOS pois L-NAME foi capaz de inibir sua produção em ambos os casos (CHX e ANIS). Desta forma, sugerimos que tratamento com inibidores da síntese de proteínas (CHX e ANIS) promovem a produção de NO dependente da L-ARG intracelular aumentada.

CHX, um inibidor de síntese de proteínas como dito acima, tem sido empregado como um inibidor de mecanismos apoptóticos (Wyllie et al., 1984). Este mecanismo antiapoptótico foi sugerido devido à inibição da síntese de proteínas pró-apoptóticas como Bax, PUMA, e o fator de transcrição Noxa dependente de P53 (Bai e Cederbaum, 2006). Por outro lado, foi mostrado que a anisomicina é um potente inibidor da LTD, além de bloquear a síntese de proteínas (Xiong et al., 2006). Em decorrência destes achados, sugerimos a possibilidade de que o NO estaria sendo disponibilizado e ativando várias vias de transdução de sinal na célula para promover efeitos de sobrevivência de neurônios como mostrado em nosso trabalho (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007) ou por outro lado, regulando a proliferação de células da retina (Magalhães et al., 2006). Nossos dados mostram pela primeira vez um sistema de regulação de proteínas serina treonina cinase (AKT/PKB e ERK $\frac{1}{2}$) através da produção biológica de NO endógeno por tratamento com CHX ou ANIS. Este efeito biológico na fosforilação da

AKT/PKB e da ERK1/2 é bloqueado pelo inibidor da NOS (L-NAME) e por inibidores da via clássica de NO (ODQ e KT5823), sugerindo que tanto o NO endógeno proveniente da disponibilidade aumentada de L-ARG intracelular por CHX ou ANIS quanto por tratamento direto com L-ARG teriam papéis biológicos na regulação de proteínas de sinalização envolvidas na sobrevivência (AKT/PKB, ERK1/2) em nosso modelo de células de retina de pinto em cultura. Estudos adicionais são necessários para averiguar o real papel do NO sintetizado a partir do tratamento com CHX e ANIS.

Foi mostrado que a super-expressão constitutiva da AKT/PKB regula a morte celular e a proliferação induzida pela retirada de soro do meio de cultura em células HepG2 (Gupta et al., 2004). Este efeito característico da AKT/PKB em induzir sobrevivência, proliferação ou crescimento de células neuronais depende de receptores tirosina cinases para ativar várias proteínas alvo citoplasmáticas ou nucleares por AKT/PKB (Meier et al., 1997; Borgatti et al., 2003). Por outro lado, o mecanismo pela qual a AKT/PKB é estimulada envolve o recrutamento desta proteína do citoplasma para a membrana através da ação da PI3K e formação de PIP2, PIP3 e também ativação da PDK1 (Lawlor and Alessi, 2001; Scheid et al., 2005). Neste contexto, foi mostrado uma subsequente liberação da AKT/PKB fosforilada (AKT^{Ser-473} ou AKT^{Thre-308}) da membrana para vários alvos citoplasmáticos (exemplo: GSK3 β), translocação desta proteína para a mitocôndria induzida por IGF-1 em células SH-SY5Y ou HEK-293 (Bijur e Jope., 2003) ou translocação para o núcleo em células PC12 estimulada por NGF (Borgatti et al., 2003). Desta forma, a AKT/PKB pode promover a ativação de proteínas essenciais para a sobrevivência como CREB (Ciani et al., 2002) ou NF- κ B, dois fatores de transcrição (Taylor et al., 2004). Em dados recentes do nosso laboratório mostramos que o papel biológico de NO sobre a sobrevivência de neurônios purificados de retina em cultura é dependente da PI3K (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). A partir de

nossos dados de imunofluorescência, sugerimos que NO promove a translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo. Este papel de NO observado na translocação da AKT/PKB foi dependente do tempo (30 e 60 minutos) nos vários modelos utilizados (PC12, SN56 ou neurônios purificados de retina de pinto). Estes dados estão em concordância com os dados de Bijur e Jope (2003), que mostram que a translocação da AKT/PKB para a mitocôndria e o núcleo ocorreu entre 20 e 30 minutos de estimulação em células HEK-293 com IGF-1 (Andjelkovic et al., 1997; Meier et al., 1997). Uma possibilidade para o tempo estendido de 60 minutos em nosso modelo celular talvez seja o envolvimento de um mecanismo de sinalização mais prolongado desencadeado por NO e sua interação com outras vias de sinalização citoplasmáticas ou nucleares. Portanto, sugerimos em forma geral que NO apresenta um efeito na sobrevivência de neurônios através de múltiplas vias de sinalização envolvendo a ativação e translocação para o núcleo da AKT/PKB, um sinal importante como regulador de proteínas citoplasmáticas, mitocondriais e nucleares na retina embrionária de galinha.

6. CONCLUSÕES

- SNAP, um doador de NO (NO exógeno) estimula a fosforilação da AKT/PKB (AKT^{Ser-473} e AKT^{Thre-308}) de maneira dose e tempo dependente.
- A fosforilação da AKT/PKB por SNAP foi mimetizada pela L-ARG (NO endógeno) de maneira dependente do tempo e da exposição deste substrato através da ativação da nNOS.
- Os receptores de glutamato de tipo NMDA também foram capazes de estimular a fosforilação da AKT/PKB pela via nitrérgica.
- Os efeitos do glutamato, NMDA, SNAP e L-ARG sobre a fosforilação da AKT/PKB requerem a produção de GMP cíclico e ativação da PKG.
- Proteínas intermediárias como Src e CaMKII participam conjuntamente para promover a fosforilação da AKT/PKB induzida por NO.
- NO induz aumento de cálcio intracelular através de receptores NMDA e canais de cálcio tipo-L.
- O aumento intracelular de cálcio, proveniente do meio extracelular ou dos estoques intracelulares, contribui na ativação da AKT/PKB induzida por NO.
- A formação do complexo cálcio-calmodulina é essencial para ativação da AKT/PKB.
- A fosforilação da AKT/PKB por NO envolve múltiplas vias de sinalização como CaMKII, Src e PI3K, mas independe da via das MAPs cinases (ERK½).
- Tratamento com H₂O₂ mimetiza o efeito de NO na fosforilação da AKT/PKB provavelmente pela inibição redox da PTEN.

- É possível que NO regule a inibição da PTEN por S-nitrosilação, causando consequente aumento na fosforilação da AKT/PKB.
- Aumento do “pool” de L-ARG livre intracelular por inibidores de síntese de proteínas (CHX e ANIS) contribui na biosíntese de NO através da enzima nNOS.
- NO proveniente do tratamento com CHX ou ANIS promove a fosforilação da AKT/PKB via produção de GMPc/PKG.
- Um passo essencial para efeitos de sobrevivência possa ser a translocação da AKT/PKB fosforilada para o núcleo em diferentes tipos celulares.
- O efeito de NO na translocação nuclear de AKT/PKB não fica restrito ao nosso modelo celular, mas também ocorre em outros modelos celulares (PC12 e SN56).
- O mecanismo de sinalização proposto para o NO dá uma idéia mais sólida da importância deste neurotransmissor na regulação da fisiologia do sistema nervoso central.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, R. (1992). Plasticity and differentiation of retinal precursor cells. *Internat. Ver. Cytology*: 1-67.

ADLER, R. (1993). Determination of cellular types in the retina. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* (34): 1677-1681.

AHERN GP., KLYACHKO VA., JACKSON MB. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* (25): 507-510.

ALDERTON, WK., COOPER CE., KNOWLES RG. (2001). Nitric Oxide Synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry Society*.

ALESSI, D.R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. HEMMINGS, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* (15): 6541–6551.

ALVARES, B., DENOCOLA, A. RADI, R. (1995). Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem Res Toxicol.* (6): 859-864.

ANDJELKOVIC M., ALESSI DR., MEIER R., FERNANDEZ A., LAMB NJ., FRECH M. CRON P., COHEN P., LUCOCQ JM., HEMMINGS BA. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* (272): 31515-31524.

ANDOH T., CHIUEH CC., CHOCK PB. (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates the expression of thioredoxin and thioredoxin peroxidase-1 during hormesis in response to oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* (278): 885-890.

ARAKI, M. (1984). Immunocytochemical study on photoreceptor cell differentiation in the cultured retina of the chick. *Develop. Biol.* (103): 313-318.

ARIANO, MA, LEWICKI, JA, BRANDWEIN, HJ. MURAD, F. (1982). Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* (79): 1316-1320.

BADING H., GREENBERG ME. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science.* (253): 912-914.

BAE YS., KANGSW., SEO MS., BAINES IC., TEKLE E., CHOCK PB., RHEE SG. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Rol in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (272): 217-221.

BAE YS., SUNG JY., KIM OS., KIM YJ., HUR KC., KAZLAUSKAS A., RHEE SG., (2000). Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* (275): 10527-10531.

BAI J., CEDERBAUM A. (2006). Cycloheximide protects HepG2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing p53 and phosphorylated p53 levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (319): 1435-1443.

BARABÁS P., KOVÁCS I., KOVÁCS R., PÁLHALMI J., KARDOS J., SCHOUSBOE A. (2002). Light-induced changes in glutamate release from isolated rat retina is regulated by cyclic guanosine monophosphate. *J. Neurosci.* (67): 149-155.

BARABÁS P., RIELD Z., KARDOS J. (2003). Sildenafil, N-deethyl-sildenafil and Zaprinast enhance photoreceptor response in the isolated rat retina. *Neurochem. Inter.* (43): 591-595.

BECKMAN JS., CHEN J. CROW JP. YE JZ. (1996). Reaction of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* (103): 371-380.

BIJUR GN., JOPE RS. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* (87): 1427-1435.

BINDOKAS, V.P., JORDAN, J., LEE, C.C., MILLER, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16(4): 1324-36.

BORGATTI P., MARTELLI AM., BELLACOSA A., CASTO R., MASSARI L., CAPITANI S., NERI LM. (2000). Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like mc3t3-e1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett.* (477): 27-32.

BORGATTI P., MARTELLI AM., TABELLINI G., BELLACOSA A., CAPITANI S., NERI LM. (2003). Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J. Cell. Physiol.* (196): 79-88.

BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72): 248-254.

BRETT DD., GLATT CE., HWANG PM., FOTUHI M., DAWSON TM., SNYDER SH. (1991). Nitric oxide synthetase protein and mRNA are discretely localized in neuronal population of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. (7): 615-624.

BRETT, D.S. SNYDER, SH. (1990). Isolation of Nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci*. (87): 682-685.

BRETT, DS., SNYDER, SH. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci*. (86): 9030-9033.

BRENNAN J.E., BRETT D.S. (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*. (7): 374-378.

BULLER, A.L., LARSON, H.C., SCHNEIDER, B.E., BEATON, J.A., MORRISSET, R.A., MONAGHAN, D.T. (1994). The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J. Neurosci*. (14): 5471-5484.

BUTLER, AR., FLITMEY, FW. WILLIAMS, DLH. (1995). NO nitrosonium ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *TIPS* (16): 18-22.

BUTLER, AR., FLITMEY, FW. WILLIAMS, DLH. (1995). NO nitrosonium ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *TIPS* (16): 18-22.

CALABRESE V., MANCUSO C., CALVANNI M., RIZZARELLI E., BUTTERFIELD DA., STELLA AM. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci*. (8): 765-775.

CELLERINO A., ARANGO-GONZALEZ BA., KOHLER K. (1999). Effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the rodent retina. *Eur. J. Neurosci*. (11): 2824-2834.

CHANG MS., LEE, MS., CHEN, BC., SHEU, JR., LIN, CH. (2004). YC-1-Induced Cyclooxygenase-2 Expression Is Mediated by cGMP-Dependent Activations of Ras, Phosphoinositide-3-OH-kinase, Akt, and Nuclear Factor-kB in Human Pulmonary Epithelial Cells. *Mol. Pharmacol*. (66): 561-571.

CHATTERTON, J.E., AWOBULUYI, M., PREMKUMAR, L.S., TAKAHASHI, H., TALANTOVA, M., SHIN, Y., CUI, J., TU, S., SEVARINO, K.A., NAKANISHI, N., TONG, G., LIPTON, S.A., ZHANG, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 15(6873): 793-798.

CHEN K., VITA JA., BERK BC., KEANEY JF. Jr. (2001). C-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Biol. Chem.* (276): 16045-16050.

CHEN, L., HUANG, L.Y. (1992). Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* (356): 521-523.

CHENG A., WANG S. CAI J., RAO MS., MATTSON MP. (2003). Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.* (258):319-333.

CHOI, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1, 623-634.

CHRISTOPHERSON KS., HILLIER BJ., LIM WA., BREDT DS. (1999). PSD-95 assemble a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* (274): 27467-27473.

CHUN, M., OH, S., KIM, I., LIM, K. (1998). Light and electron microscopical analysis of nitric oxide synthase-like immunoreactive neurons in the rat retina. *Vis. Neurosci.* (16): 379-389.

CIANI E., VIRGILI M., CONSTESTABILE A. (2002). AKT pathway mediated a cGMP-dependent survival role of nitric oxide cerebellar granule neurons. *J. neurochem.* (81): 218-228.

CLEMENTI E., SCIORATI C., RICCIO M., MILOSO M., MELDOLESI J., NISTICÓ G. (1995). *J. Biol. Chem.* (282): 22277-22282.

COLLINGRIDGE, G.L., BLISS, T.V. (1987). NMDA receptors: their role in long term potentiation. *Trends Neurosci.* (10): 288-293.

CONUS N.M., HANNAN K.M., CRISTIANO B.E, HEMMINGS B.A. e PEARSON R.B. (2002). Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J. Biol. Chem.* (277): 38021–38028.

COSENZA M., CADILHE D.V., COUTINHO R.N., PAES-DE-CARVALHO R. (2006) Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. *J. Neurochem.* (97): 1481-1493.

COSENZA M., PAES-DE-CARVALHO R. (2000). L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* (74): 1885-1894.

COULOMBRE, AJ. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* (96): 153-189.

CRISTÓVÃO A.J., OLIVEIRA C.R., CARVALHO C.M. (2002a). Expression of AMPA/kainate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 1-9.

CRISTOVÃO A.J., OLIVEIRA C.R., CARVALHO C.M. (2002b). Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res.* 99, 125-133.

CROSTHWAITE AJ., VALLI H., WILLIAMS RJ. (2004). Inhibiting Src family tyrosine kinase activity blocks glutamate signaling to Erk $\frac{1}{2}$ and Akt/PKB but not JNK in cultured striatal neurons. *J. Neurochem.* (88): 1127-1139.

CUI QL., FOGLE E., ALMAZAN G. (2006). Muscarinic acetylcholine receptors mediate oligodendrocyte progenitor survival through Src-like tyrosine kinases and PI3K/Akt pathway. *Neurochem. Int.* (48); 383-393.

DATTA, S.R., BRUNET, A. GREENBERG, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905–2927.

DAWSON, TM., BREDT, DS., FOTUHI, M., HWANG, PM. SNYDER, SH. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (88): 7797-7801.

DE FARIA, MH., PAES-DE-CARVALHO, R., DO NASCIMENTO, JLM. HOKOÇ, JN. (1996). Development of NADPH-diaphorase in the avian retina: Regulation of calcium ions and relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem* (67): 1063-1071.

DE MELLO, F.G. (1978). The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J. Neurochem.* (31): 1049-1053.

DE MELLO, FG. (1980). Aspectos neuroquímicos da diferenciação embrionária da retina de pinto. *Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências.*

DEB TB., COTICCHIA CM., DICKSON RB. (2004). Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279 (37): 38903-38911.

DENICOLA, A., FREEMAN, BA., TRUJILLO, M., RADI, R. (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidation. *Arch Biochem Biophys.* (333): 49-58.

DENICOLA, A., SOUZA, JM., AUGUSTO, O. RADI, R. (1995). Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-livre reactivity of peroxynitrite: role of the hydroxamic groups. *Free Radi Biol Med.* (19): 11-19.

DEORA AA., HAJJAR DP., LANDER HM. (200). *Biochemistry* (39): 9901- 9908.

DESSI, F., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., KHRESTCHATISKY, M., BEN-ARI, Y. (1993). Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.* 60(5): 1953-5.

DUGAN, L.L., SENSI, S.L., CANZONIERO, L.M., HANDRAN, S.D., ROTHMAN, S.M., LIN, T.S., GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15(10): 6377-88.

EGEA J., ESPINET C., SOLER RM., DOLCET X., YUSTE VJ., ENCINAS M., IGLESIAS M., ROCAMORA N., COMELLA JX. (2001). Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J. Cell. Biol.* (154): 585-597.

EISERICH JP., HIRTOVA M., CROSS CE., JONES AD., FREMANN BA. ET AL., VLIET A. (1998). Formation nitric oxide-derivad inflammatory oxidant bymyeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* (391): 393-397.

ENDO S., LAUNEY T. (2003). Nitric oxide activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett.* (350): 122-126.

ENGELMANN, JA., LUO, J., CANTKEY, LC. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev. Genet.* (8): 606-619.

FERREIRA J.M., PAES-DE-CARVALHO R. (2001). Long-term activation of adenosine A2a receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* (900): 169-176.

FERRERO R., RODRÍGUEZ-PASCUAL F., MIRAS-PORTUGAL MT., TORRES M. (1999). Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlatiion with nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* (127): 779-787.

- FIGUEROA S., LÓPEZ E., ARCE C., OSET-GASQUE M.J., GONZÁLEZ MP.** (2005). SNAP, a NO donor, induces cellular protection only when cortical neurons are submitted to some aggression process. *Brain Res.* (1034): 25– 33.
- FINKBEINER S., GREENBERG ME.** (1996). Ca²⁺-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity?. *Neurons.* (16): 233-236.
- FISCHER RJ., JULSGART J., BERCHTOLD MW.** (1998).High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase. *FEBS Lett.* (425): 175-177.
- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M., MURAD, F.** (1991). Isoforms of nitric oxide synthase-characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* (42): 1849-1857.
- FRANK GD., EGUCHI S., YAMAKAWA T., TANAKA S., INAGAMI T., E MOTLEY ED.** (2000). Envolvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology* (141): 3120-3126.
- FRANKLIN JL., JOHNSON EM.** (1992). Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.* (15): 501-508.
- FUCHS, S.A., BERGER, R., KLOMP, L.W., DE KONING, T.J.** (2005). D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Mol Genet Metab.* 85(3): 168-180.
- FUJITA S. E HORII M.** (1963). Analysis of cytogenesis in the chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch. Histol. Jap.* (23): 359-366.
- FURUYAMA, T., INAGAKI, S. e TAKAGI, H.** (1993). Localizations of alfa-1 and beta-1 subunits o soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Mol Brain Res.* (20): 335-344.
- GALLY, J.A., MONTAGUE, P.R., REEKE Jr., G.N. EDELMAN, G.M.** (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (87): 3547-3551.
- GELLER, DA., LOWENSTEIN, CJ., SHAPIRO, RA., NUSSLER AK., DI SM., WANG SC., NAKAYAMA DK. SIMMONS RL., SNYDER SH. BILLIAR TR.** (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA* (90): 3491-3495.

- GERBER, G., KANGRGA, I., RYU, P. D., LAREW, J. S., RANDIC, M.** (1989). Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* (9): 3606-3617.
- GERHART, J. KIRCHNER, M.** (1997). Cells, Embryos, and Evolution. *Blackwell Science.* 642p.
- GIBB, A. J., COLQUHOUN, D.** (1992). Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus. *J. Physiol.* (456): 143-79.
- GOUREAU O., JEANNY, JC., BECQUET, F., HARTMANN, MP. COURTOIS, Y.** (1993) Protection against light-induced degeneration by an inhibitor of NO synthase. *Neuroreport.* (5): 233-36.
- GOW, AJ. ISCHIROPOULOS, H.** (2001). Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell. Physiol.* (187): 277-282.
- GRIFFITH, O.W., STUEHR, D.J.** (1995). Nitric oxides synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev.Physiol.* (57): 707-736.
- GRYLEWSKI, RJ., PALMER, RRJ., MONCADA, S.** (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* (320): 454-456.
- GUPTA D., SYED NA., ROESLER WJ., KHANDELWAL RL.** (2004). Effect of overexpression and nuclear translocation of constitutively active PKB- α on cellular survival and proliferation in HepG2 cells. *J. Cell. Biochem.* (93): 513-525.
- HA K., KIM K., KWON Y., BAI, S., NAM, W., YOO, Y., KIM, PKM, CHUNG, H., BILLIAR, TR. KIM, Y.** (2003). Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells Through cGMP-dependet PI3 Kinase/Akt activation. *J. FASEB* (17): 1036-1047.
- HACK I., Koulen P., PEICHL L., BRANDSTATTER JH.** (2002). Development of glutamatergic synapses in the rat retina: the postnatal expression of ionotropic glutamate receptor subunits. *Vis. Neurosci.* (19): 1-13.
- HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* (88): 49-92.
- HANADA M., FENG J., HEMMINGS B.A.** (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochim.Biophys. Acta* (697):3–16.
- HASHIMOTO, A., NISHIKAWA, T., OKA, T., TAKAHASHI, K.** (1993). Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J. Neurochem.* 60 (2): 783-786.

- HAWKINS, PT., ANDERSON, KE., DAVIDSON, K., STEPHENS LR.** (2006). Signalling through class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc. Trans.* (34): 647-662.
- HIBBS, J.B. JR, TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z.** (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 235(4787): 473-476.
- HOFFMAN, M., SPANO, PF., TRABUCCHI, M. KUMAMURA, K.** (1997). Guanylate cyclase activity in various rat brain areas. *J. Neurochem.* (29): 395-396.
- HOGG NEIL.** (2000). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annun. Ver. Pharmacol. Toxicol.* (42): 585-600.
- HOLLMANN, M., BOULTER, J., MARON, C., HEINEMANN, S.** (1994). Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren. Physiol. Biochem.* (17): 182-193.
- HUGHES WF. LA VELLE A.** (1974). An the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat. Rec.* (17): 297-302.
- HUME, R. I., DINGLEDINE, R., HEINEMANN, S. F.** (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science.* (253): 1028-31.
- HUSI H., WARD MA., CHOUDHARY JS., BLACKSTOCK WP., GRANT SGN.** (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* (3): 661-669.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84(24): 9265-9.
- IKEGAMI K., KOIKE T.** (2000). Membrane depolarization-mediated survival of sympathetic neurons occurs through both phosphatidylinositol 3-kinase and CaM kinase II-dependent pathway. *Brain Res.* 218-226.
- IKONOMIDOU, C., BOSCH, F., MIKSA, M., BITTIGAU, P., VOCKLER, J., DIKRANIAN, K., TENKOVA, T. I., STEFOVSKA, V., TURSKI, L., OLNEY, J. W.** (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science.* (283): 70-74.
- ISHII, T., MORIYOSHI, K., SUGIHARA, H., SAKURADA, K., KADOTANI, H., YOKOI, M., AKAZAWA, C., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., MASU, M., NAKANISHI, S.** (1993). Molecular characterization of the family of the N Methyl-D-Aspartate receptor subunit. *J. Biol. Chem.* (268): 2836-2843.

JIANG T. QIU Y. (2003). Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J. Biol. Chem.* 278: 15789–15793.

JIANG T., QIU Y. (2003). Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J Biol Chem* (278): 15789-15793.

JOYAL JL., BURKS DJ., PONS S., MATTER WF., VLAHOS CJ., WHITE MF., SACKS DB. (1997). Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* (272): 28183-28186.

KAHN AJ. (1973). Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* (63): 285-290.

KAHN AJ. (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neuron in the developing chick neural retina. *Develop. Biol.* (38): 30-40.

KAMISAKI Y., WADA K., BRIAN K., BANABANLI B. DAVIS K., MARTIN E., et al., (1998). Na activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (95): 11584-11589.

KAWASAKI K., SMITH JR. RS., HSIEH CM., SUN J., CHAO J., LIAO JK. (2003). Activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase AKT pathway mediated nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* (23): 5726-5737.

KIM TW., LEE CH., CHOI CY., KWON NS., BAEK KJ., KIM YG., YUN HY. (2003). Nitric oxide mediates membrane depolarization-promoted survival of rat neuronal PC12 cells. *Neurosci. Lett.* (344): 209-211.

KOINSTINAHO, J. SAGAR, SM. (1995). NADPH-diaphorase-reactive neurons in the retina. *Prog. Retinal Eye Res.* (15): 69-87.

KOINSTINAHO, J., SWANSON, RA., VENTE, JD. SAGAR, SM. (1993) NADPH-diaphorase (Nitric Oxide Synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: Putative target cells and stimulation by light. *Neuroscience.* (57): 587-597.

KOLB H. (1994) The architecture of functional neural circuit in the vertebrate retina—The proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (35): 2385-2404.

KOLCH W. (2000). The regulation of the Ras/Raf/Mek/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* (351): 289-305.

KONISHI, M., HOLLINGWORTH, S., HARKINS, A.B., BAYLOR, S.M. (1991). Myoplasmic calcium transients in intact frog skeletal muscle fibers monitored with the fluorescent indicator fura-2. *J. Gen. Physiol.* (97): 271-301.

KURINO M., FUKUNAGA K., USHIO Y., MIYAMOTO E. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *J. Neurochem.* (65): 1282-1289.

KURZ S. AND HARRISON D. G. (1997) Insulin and the arginine paradox. *J. Clin. Invest.* (99): 369-370.

KUTSUWADA, T., KASHIWABUCHI, N., MORI, H., SAKIMURA, K., KUSHIYA, E., ARAKI, K., MEGURO, H., MASAKI, H., KUMANISHI, T., ARAKAWA, M., MISHINA, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* (358): 36-41.

KWON J., LEE SR., YANG KS., AHN Y., KIM YJ., STADTMAN ER., RHEE SG. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (101): 16419-16424.

LANDER HM., OGIESTE JS., PEARCE SFA., LEVI R. NOVOGRODSKY A. (1995). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on P21Ras. *J. Biol. Chem.* (270): 7017-7020.

LAWLOR MA., ALESSI DR. (2001). PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival, and insulin responses?. *J. Cell. Sci.* (114): 2903-2910.

LAWLOR, M.A. ALESSI, D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *J. Cell Sci.* (114): 2903-2910.

LEE SR., YANG KS., KWON J., LEE C. JEONG W., RHEE SG. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2. *J. Biol. Chem.* (277): 20336-20342.

LEI, SZ., PAN, ZH., AGGARWAL, SK., CHEN, HSV., HARTMAN, J., SUCHER, NJ. LIPTON, SA. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* (8): 1087-1099.

LI C., JACKSON RM. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* (282): 227-241.

LIM S., CLÉMENT MV. (2007). Phosphorylation of the survival kinase Akt by superoxide is dependent on an ascorbate-reversible oxidation of PTEN. *Free Rad. Bio. Med.* (42): 1178-1192.

LÓPEZ-COLOMÉ AM., LÓPEZ E. (2003). Glutamate receptors coupled to nitric oxide synthesis in embryonic retina. *Dev. Neurosci.* (25):293-300.

LU Y., YU Q., LIU JH, ZHANG J, WANG H, KOUL D, MCMURRAY JS, FANG X, UNG WK, SIMINOVITCH KA, MILLS GB. (2003). Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J. Biol Chem* (278): 40057-40066.

MACDERMOTT, A.B., MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L, SMITH, S.J., BARKER J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cords neurones. *Nature.* (321): 519-522.

MAGALHÃES, C.R., SOCODATO, R.E., PAES-DE-CARVALHO, R. (2006). Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMPindependent mechanism. *Int. J. Dev. Neurosci.* (24): 53-60.

MAHADEV K., WU X., ZILBERING A., ZHU L., LAWRENCE JT., GOLDSTEIN BJ. (2001). Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* (276): 48662-48669.

MALINSKI T., TAHA Z., GRUNFELD S., PATTON S., KAPTURCZAK M., TOMBOULIAN F. (1993). Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by peroxynitrite microsensors. *Biochem Biophys. Res. Commun.* (193):1076-1082.

MALTA CAVERSAN O. (2008). Regulação da Expressão de subunidades do receptor NMDA em cultura de retina. Tese submetida à Universidade federal Fluminense visando a obtenção de grau de mestre em neuroimunologia. pg. 119.

MARTIN DP., SCHMIDT RE., DiSTEFANO PS., LOWRYOH., CARTER JG., JOHNSON EM Jr. (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell. Biol.* (106): 829-844.

MASON, WT. BIGHOUSE. (1975). Correlation of rhodopsin biogenesis with ultrastructure morphogenesis in the chick retina. *J. Cell. Biol.* (64): 235-241.

MAYER, B. (1995). Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. En: Nitric oxide in the Nervous System. *Academic Press. Limited. Vincent, S. R.* (Ed): 21-42.

MEGURO, H., MORI, H., ARAKI, K., KUSHIYA, E., KUTSUWADA, T., YAMAZAKI, M., KUMANISHI, T., ARAKAWA, M., SAKIMURA, K., MISHINA, M. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*. (357): 70-74.

MEIER R., ALESSI DR., CRON P., ANDJELKOVIC M., HEMMING BA. (1997). Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B-beta. *J. Biol. Chem.* (272): 30491-30497.

MEJÍA-GARCÍA T.A., PAES-DE-CARVALHO R. (2007). Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *J. Neurochem.* (100): 382-394.

MEY, J. THANOS, S. (2000) Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res.* (32): 343-379.

MILLER, RF., SLAUHGTER, M. (1986). Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. *Trends Neurosci.* (9): 211-218.

MIRANDA, K., ESPEY, MG., JOURD'HEUIL, D., GRISHNAM, MB., FUKUTO, M., FEELISCH, M. WINK, DA. (2000). The Chemical Biology of Nitric Oxide. In: Ignarro, LJ. (Ed.), Nitric Oxide: *Biology and Pathobiology*. Academic Press. San Diego (USA): 41-55.

MIRANDA, KM., NIMS, RW., THOMAS, DD., ESPEY, MG., CITRIN, D., BARTBERGER, MD., PAOLOCCI, N., FUKUTO, JM., FEELISCH, M. WINK, DA. (2003). Comparison of the reactivity of Nitric Oxide and Nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *Journal of Inorganic Biochemistry* (93): 52-60.

MISHIMA H. FUJITA H. (1978). Studies on the citodifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using the electronmicroscopic autoradiography of 3H-thymidine. *Albrecht V. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalm.* (206): 1-10.

MONAGHAN, D. T., BRIDGES, R. J. COTMAN, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.* (29): 365-402.

MONCADA, S., RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. (1988). Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 37(13), 2495-501.

MONTAGUE, PR., GANCAYCO, CD., WINN, MJ., MARCHASE, RB. FRIEDLANDER, MJ. (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* (263): 973-977.

MONTAGUE, PR., GANCAYCO, CD., WINN, MJ., MARCHASE, RB. FRIEDLANDER, MJ. (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* (263): 973-977.

MONTI B., MARRI L. AND CONTESTABILE A. (2002) NMDA receptor-dependent CREB activation in survival of cerebellar granule cells during in vivo and in vitro development. *Eur. J. Neurosci.* (16): 1490-1498.

MONYER, H., SPRENGEL, R., SCHOEPFER, R., HERB, A., HIGUCHI, M., LOMELI, H., BURNASHEV, N., SAKMANN, B., SEEBURG, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* (256): 1217-1221.

MORALES M., GONZÁLEZ-MEJÍA ME., BERNABÉ A., HERNÁNDEZ-KELLY LCR., ORTEGA A. (2006). Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem. Res.* (>):

MORIYOSHI, K., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., NAKANISHI, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* (354): 31-37.

MOSSMAN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* (65): 55–63.

NAKANISHI, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* (258): 597-603.

NAKANISHI, S., MASU, M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Ann. Ver. Biophys. Biomol. Struct.* (23): 319-348.

NATHAN, C. XIE, QW. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* (269): 13725-13728.

NICHOLLS, D.G. (1985). A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* (63): 97-106.

NISHIKAWA, T. (2005). Metabolism and functional roles of endogenous Dserine in mammalian brains. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9): 1561-5.

OH-HASHI K., MARUYAMA W., YI H., TAKAHASHI T., NAOI M., ISOBE K. (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (263): 504-509.

OHKUMA S., KATSURA M. (2001). Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.* (64): 97-108.

OLIVEIRA CJR., SCHINDLER F., VENTURA AM., MORAIS MS., ARAI RJ., DEBBAS V., STERN E., MONTEIRO HP. (2003). Nitric oxide and activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* (35): 381-396.

OLNEY, J.W. (1989). Excitotoxicity and N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Drug Dev. Res.* (17): 299-319.

OMKUMAR, R. V., KIELY, M. J., ROSENSTEIN, A. J., MIN, K. T., KENNEDY, M. B. (1996). Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-independent protein kinase II in the NR2B subunit of the Nmethyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* (271): 31670-8.

PAES-DE-CARVALHO R., BRAAS KM., SNYDER SH., ADLER R. (1990). Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* (55): 1603-1611.

PAES-DE-CARVALHO R., DIAS BV., MARTINS RA., PEREIRA MR., PORTUGAL CC., LANFREDI C. (2005). Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transportes-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem. Int.* (46): 441-451.

PAES-de-CARVALHO, R., MATTOS, JC. (1996). Development of nitric oxide synthase in the avian retina. *Rev. Bras. Biol.* (56): 145-152.

PAGLIARO, P. (2003). Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* (73): 2137-2149.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327(6122), 524-6.

PANDIELLA-ALONSO A., MALGAROLI A., VICENTINI L.M., MELDELESI J. (1986). Early rise of cytosolic Ca^{2+} induced by NGF in PC12 and chromaffin cells. *FEBS Lett.* (208): 48-51.

PAWSON T., GISH GD., NASH P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cells. Biol.* (11): 504-511.

PÉREZ-GARCÍA MJ., CEÑA, V., DE PABLO Y., LLOVERA M., COMELLA JX., SOLER RM. (2004). Glial cells line-derived neurotrophic factor increase intracellular calcium concentration: Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 279 (7): 6132-6142.

PERKINTON MS., SIHRA TS., WILLIAMS JR. (1999). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J. Neurosci.* (19):5861-5874.

PETERSON R.T. SCHREIBER S.L. (1999). Kinase phosphorylation: keeping it all in the family. *Curr. Biol.* (9): R521–R524.

PINEDA, J., KOGAN, JH., AGHAJANIAN, GK. (1996). Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J. Neurosci.* (16): 1389-1399.

PITTMAN RN., WANG S., DiBENEDETTO AJ., MILLS JC. (1993). A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cells death. *J. Neurosci.* (13): 3669-3680.

PLÁTENÍK, J., KURAMOTO, N., YONEDA, Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* (67): 335-64.

POLLOCK, JS., FÖRSTERMANN, U., MITCHELL, JÁ., WARNER, TD., SCHMIDT, HHHW., NAKAME, M. MURAD F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 10480-10484.

PRADA, OF., ARMENGOL, JÁ., GENIS-GALVEZ, JM. (1979). Algunos datos autoradiográficos sobre la histogénesis retiniana. *Morfología normal e Patología.* (3): 379-385.

QIN S., CHOCK P.B. (2003). Implication of phosphatidylinositol 3-Kinase membrane recruitment in hydrogen peroxide-induced activation of PI3K and AKT. *Biochemistry.* (42): 2995-3003.

QIN S., STADTMAN, ER., CHOCK PB. (2000). Regulation of oxidative stress-induced calcium release by phosphatidylinositol 3-kinase and Bruton's kinase in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (97): 7118-7123.

RADENOVIC L., SELAKOVIC V. (2005). Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. *Brain Res. Bull.* (67): 133-141.

RADI, R. (1996). Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzimol.* (269): 354-366.

RAMAN, I. M., TONG, G., JAHR, C. E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron.* (16): 415-421.

ROGERS, N. IGNARRO, LJ. (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun.* (189): 242-249.

SALTER MW., KALIA LV. (2004). Src kinases: A hub for NMDA receptor regulation. *Nature.* (5): 317-328.

SAMPAIO LFS., PAES-DE-CARVALHO R. (1998). Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. *Neurochem. Int.* 33, 367-374.

SÁNCHEZ-PÉREZ AM., LLANSOLA M., FELIPO V. (2006). Modulation of NMDA receptors by AKT kinase. *Neurochem. Int.* (49): 351-358.

SATO, T. (1990). NADPH-diaphorase positive amacrine cells in the retinae of the frog (*Rana esculenta*) and pigeon (*Columbia livia*). *Arch. Histol. Cytol.* (53): 63-69.

SCATTON, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (7): 389-400.

SCHEID, M.P. WOODGETT, J.R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt *FEBS Lett.* 546: 108-112.

SCHELL, M. J., MOLLIVER, M. E., SNYDER, S. H. (1995). D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (92): 3948-52.

SCHMIDT, HW., GAGNE, GD., NAKANE, M., POLLOCK, JS., MILLER, MF., MURAD, F. (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneuronal functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem Cytochem.* (40): 1439-1456.

SCHMIDT, HW., LOHMANN, SM. WALTER, U. (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim. Biophys Acta* (1178): 153-175.

SCHMITT JM., WAYMAN GA., NOZAKI N., SODERLING TR. (2004). Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J. Biol. Chem.* 279 (23):24064-24072.

SCHOEPP, D.D., BOCKAERT, J., SLADDECZEK, F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acids receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (11): 508-515.

SERGHINI R., FROISSARD P., SOLA B., DUVAL D. (1994). Cycloheximide and Actinomycin D block the toxic effect of glutamic acid on PC12 cells. *Neuroreport.* (6): 29-32.

SHENG M., PAK DTS., (2000). Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal signaling protein. *Annu. Rev. Physiol.* (62): 755-778.

SOCODATO RES., MAGALHÃES CR., PAES-DE-CARVALHO R. (2008). (manuscrito submetido).

SPENCE, SG. ROBSON, JA. (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*, (3): 801-812.

SPIKE, RC, TODD, AJ. JOHNSTON, HM. (1993). Coexistence of NADPH-diaphorase with GABA, glycine and acetylcholine in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* (335): 320-333.

STAMBOLIC V., SUZUKI A., DE LA POMPA J.L., BROTHERS G.M., MIRTOSOS C., SASAKI T., RULAND J., PENNINGER J.M., SIDEROVSKI D.P. MAK T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* (95): 29-39.

STAMLER, JS., SINGEL, DJ. LOSCALZO, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its rdox-actived forms. *Science* (258).

STENKAMP, DL., IUVONE, PM., ADLER. (1994). Photochemical movements of cultured embryonic photoreceptors: Regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. *J. Neurosci.* (14): 3083-3096.

STUEHR, DJ., CHO, HJ., KWON, NS., WEISE, MF. e NATHAN, CF. (1991). Purification and characterization of the citokyne-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containig flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA* (90): 3491-3495.

SUGIHARA, H., MORIYOSHI, K., ISHII, T., MASU, M., NAKANISHI, S. (1992). Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generate by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (185): 826-832.

SUGIOTA M., YAMASHITA M. (2003). Calcium signaling to nucleus via store-operated system during cell cycle in retinal neuroepithelium. *Neurosci. Res.* (45): 447-458.

TAYLOR JM., CRACK PJ., GOULD JA., ALI U., HERTZOG PJ., IANNELLO RC. (2004). Akt phosphorylation and NF- κ B activation are counterregulated under conditions of oxidative stress. *Exp. Cell Res.* (300): 463-475.

TEJEDO J.R., CAHUANA G.M., RAMÍREZ R., ESBERT M., JIMÉNEZ J., SOBRINO F. BEDOYA F. (2004). Nitric oxide triggers the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT survival pathway in Insulin-producing RINm5F cells by arousing Src to activate insulin receptor substrate-1. *Endocrinology* (145): 2319-2327.

TEJEDO J.R., RAMÍREZ R., CAHUANA G.M., RINCÓN P., SOBRINO F. BEDOYA F. J. (2001). Evidence for involvement of c-Src in the anti-apoptotic action of nitric oxide in serum-deprived RINm5F cells. *Cell signal.* (13): 809-817.

TENG B., MURTHY, KS., KUEMMERLE, JF., GRIDER, JR., SASE, K., MICHEL, T. MAKHLOUF GM. (1998). Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* (275): 342-351.

THORESON WB., WITKOVSKY P. (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* (18): 765-810.

ULLIAM E., BARKIS W., CHEN S., DIAMOND J. AND BARRES B. (2004). Invulnerability of retinal ganglion cell to NMDA excitotoxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* (26).

ULLRICH A. SCHLESSINGER. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* (61): 203-212.

VEGA-AGAPITO V., ALMEIDA A., HATZOGLOU M. AND BOLANOS J. P. (2002) Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system $\gamma(+)$ in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J. Biol. Chem.* 277 (29): 753–29 759.

VEGA-AGAPITO V., ALMEIDA A., HEALES S. J., MEDINA J. M. AND BOLANOS J. P. (1999) Peroxynitrite anion stimulates arginine release from cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* (73): 1446–1452.

VINCENT, SR. (1994). Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress Neurobiol.* (42): 129-160.

WANG X., McCULLOUGH KD., FRANKE TF., HOLBOOK NJ. (2000). Epidermal growth factor receptor dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* (275): 14624-14631.

WANG, L.Y., ORSER, B.A., BRAUTIGAN, D.L., MACDONALD, J.F. (1994). Regulation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons by protein phosphatases 1 and 2A. *Nature.* 369(6477): 230-232.

WANG, X. ROBINSON, PJ. (1997). Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J. Neurochem.* (68): 443-456.

WATKINS, J.C. (1989). The NMDA concept: origins and development. In the NMDA Receptor (Watkins J.C. and Collingridge G.L., Eds). *IRL Press, Oxford.* p. 1-7.

WATKINS, J.C., KROGSSGAARD-LARSEN, P., HONORÉ, T. (1990). Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* (11): 25-33.

WEILER, R. KEWITZ, B. (1993). NADPH-diaphorase, co-localizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina. *Neurosci. Lett.* (158): 151-154.

WIESINGER, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64(4), 365-91.

WIESINGER, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64 (4): 365-91.

WINK DA., HANBAUER I. KRISHNA MC., DEGRAFF W., GAMSON J. MITCHELL JB. (1997). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (90): 9813-9817.

WOOD, P.L., RAO, T.S., IYENGAR, S., LANTHORN, T., MONAHAN, J., CORDI, A., SUN, E., VAZQUEZ, M., GRAY, N., CONTRERAS, P. (1990). A review of the in vitro and in vivo neurochemical characterization of the NMDA/PCP/glycine/ion channel receptor macrocomplex. *Neurochem. Res.* V. (15): 217-230.

WU G., MORRIS Jr. SM. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* (336): 1-17.

WU, HH., WILLIAMS, CV. McLOON, SC. (1994). Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* (265): 1593-1596.

WU, SY., DUN, NJ. (1996). Potentiation of IPSC by nitric oxide in immature rat sympathetic preganglionic neurons in vitro. *J. Physiol.* (495): 479-490.

WYLLIE AH., MORRIS RG., SMITH AL., DUNLOP D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: associated with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* (142): 67-77.

WYMANN, MP., ZVELEBIL, M., LAFFARGUE, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signaling- which way to target?. *Trends Pharmacol Sci.* (24): 366-376.

XIONG W., KOJIC LZ., ZHANG L., PRASAD S. DOUGLAS R. WANG Y., CYNADER M. (2006). Anisomycin activates p38 MAP kinase to induced LTD in mouse primary visual cortex. *Brian Res.* (1085): 68-76.

YAMAMOTO, R., BREDT, DS., SNYDER, SH., e STONE, RA. (1993) The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related craneial ganglia. *Neuroscience.* (54): 189-200.

YAMAZAKI M., CHIBA K., MOHRI T., HATANAKA H. (2001). Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade through nitric oxide synthesis as a mechanism of neuritogenic effect of genipin in PC12 cells. *J. Neurochem.* (79): 45-54.

YAMAZAKI M., CHIBA K., MOHRI T., HATANAKA H. (2004). Cyclic GMP-dependent neurite outgrowth by genipin and nerve growth factor in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* (488): 35-43.

YAMAZAKI M., CHIBA K., MONRI T. (2005). Fundamental rol of nitric oxide in neuritogenesis of PC12h cells. *Br. J. Pharmacol.* (146): 662-669.

YANO S., TOKUMITSU H., e SODERLING T.R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature.* 392: 584-587.

YASUKAWA T., TOKUNAGA E., OTA H., SUGITA H., MARTYN J.A. e KANEKI M. (2005). S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 28.

YU CX., LI S., WHORTON R. (2005). Redox regulation of PTEN by S-Nitrosothiols. *Mol. Pharmacol.* (68): 847-854.

YUN, H., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. (1999). Glutamate-stimulated calcium activation of Ras/Erk pathway mediated by nitric oxide, *Diabetes Res. Clin. Pract.* (45): 113–115.

ZHOUGANG S. SCHNELLMANN RG. (2004). H₂O₂-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK^{1/2}, but not Akt, activation in renal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* (286): 858-865.