



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

GUILHERME RAPOZEIRO FRANÇA

**PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS DE
RETINA EMBRIONÁRIA DE PINTO EM CULTURA:
MODULAÇÃO POR FATORES PROVENIENTES
DE CÉLULAS MAIS DIFERENCIADAS**

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

Orientadora: Ana Lúcia Marques Ventura

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
2005**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GUILHERME RAPOZEIRO FRANÇA

**PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS GLIAIS DE RETINA
EMBRIONÁRIA DE PINTO EM CULTURA: MODULAÇÃO
POR FATORES PROVENIENTES DE CÉLULAS MAIS
DIFERENCIADAS**

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

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

Orientadora: Ana Lúcia Marques Ventura

Niterói
2005

F 814

França, Guilherme Rapozeiro

Proliferação de células gliais de retina embrionária de pinto em cultura: modulação por fatores provenientes de células mais diferenciadas. – Niterói: [s.n.], 2005

92f.

Dissertação – (mestrado em neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2005.

1. Retina animal. 2. Adenosina trifosfato. 3. Proliferação. I. Título.

CDD: 591.48

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE NEUROQUÍMICA, DO PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE SOB ORIENTAÇÃO DE ANA LÚCIA MARQUES VENTURA E NA VIGÊNCIA DE AUXÍLIOS CONCEDIDOS PELO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR (CAPES) E FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana, pelo cuidado e dedicação que sempre teve em ensinar a amar a ciência. Você me mostrou que ciência de qualidade se faz com boas idéias e trabalho persistente. Ana você é o tipo de pessoa especial, que gosta de viver e estar entre os amigos, valorizando as pessoas, ouvindo os seus problemas, participando de suas vidas... É, realmente eu tenho muita sorte de ter você como minha orientadora...Espero ter a chance de continuar trabalhando com você!

Gostaria de agradecer também aos amigos do laboratório de neuroquímica, as pessoas mais fantásticas que já conheci. Um pessoal maneiro, divertido, inteligente. Amigos para todas as ocasiões, desde um papo furado até as maiores furadas, rrsrs... E não poderia me esquecer jamais do pessoal que já passou pelo lab. Haline, Glauco, Laura e Beto. Vocês fazem muita falta por aqui!

Gostaria de agradecer a Maria Leite Eduardo pelo apoio técnico, sem você nós estaríamos perdidos.

A professora Dânia Hamassaki Britto e especialmente a Andréia do lab de retina da USP, sem ela os experimentos com o confocal não teriam saído!

A minha família, que mesmo distante consigo sentir a energia positiva de vocês. Sempre torcendo pra tudo dar certo. A meus pais e irmãos, a amizade de vocês foi capaz de nutrir a minha alma com coragem e esperança. Gostaria de agradecer de maneira especial a meu avô Haraldo Rapozeiro. Homem de grande valia. Saiu dos cafundós de Sumaré (SP) com a roupa do corpo e veio parar em Volta Redonda. Naquele tempo o mundo estava em guerra, Getúlio Vargas resolveu construir uma usina metalúrgica a beira do rio Paraíba em troca de alguns soldados pé rapados tupiniquins. Lá, se casou com a vó Lucy, doando-se a uma vida de incertezas e por fim conseguiu erguer a família Rapozeiro que com muito orgulho hoje está obtendo mais uma vitória... Vó, nunca vou me esquecer da sua história, vou levá-la comigo como o meu maior tesouro.

E, como não poderia deixar de ser, a mulher mais linda do universo. Duca, você sabe o quanto é importante pra mim. Dizer que te amo seria pouco perante o que sinto por você. Estamos crescendo juntos e aprendendo a respeitar e amar um ao outro. Você é e sempre será a minha maior fonte de inspiração...Te amo demais, te amo para sempre.

Faz parte desse jogo
dizer ao mundo todo
que só conhece o seu quinhão ruim

É simples desse jeito
quando se encolhe o peito
e finge não haver competição

É a solução de quem não quer
perder aquilo que já tem
e fecha a mão pro que há de vir
(*Los Hermanos: "cara estranho"*)

Dedico esta tese a minha amada Ivana da Costa Terra.

“Todo os seres humanos, por natureza, desejam saber”

Aristóteles (384-321 a.C.)

SUMÁRIO

Abreviaturas	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Introdução	1
Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	1
Ciclo Celular.....	2
Nucleotídeos como moléculas sinalizadoras.....	6
Liberação de nucleotídeos.....	7
Receptores purinérgicos.....	09
Subtipos de receptores purinérgicos.....	10
Vias de transdução de sinal para receptores de nucleotídeos.....	14
Expressão de receptores P ₂ durante o desenvolvimento.....	19
Estrutura e neurogênese da retina de pinto.....	19
Células de Müller.....	25
Sinalização química mediada por receptores P ₂ na retina de pinto.....	27
Proliferação celular na retina.....	28
Objetivos	30
Materiais e métodos	31
Resultados	36
Discussão	60
Conclusões	66
Bibliografia	70

Abreviaturas

AMP - adenosina 3'-5' monofosfato.

AMPC - adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.

ATP - adenosina 5'-trifosfato.

BME: meio básico de Eagle

BrdU: bromo-deoxiuridina

CDK/CKI: cinase dependente de ciclina / inibidor de cinase dependente de ciclina

CMF: solução salina livre de cálcio e magnésio

CNTF: Fator neurotrófico ciliar EGF: fator de crescimento epidermal

CCG: camada de células ganglionares

CNE: camada nuclear externa

CPE: camada plexiforme externa

CNI: camada nuclear interna

CPI: camada plexiforme interna

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DNA: ácido desoxiribonucleico

E2F: fator de alongamento 2

GCL: camada de células ganglionares

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

EDTA:

E7: sétimo dia de estágio de desenvolvimento embrionário.

E8: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário.

E9: nono dia de estágio de desenvolvimento embrionário.

E13: décimo terceiro dia de estágio de desenvolvimento embrionário.

E7C2: sétimo dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por dois dias.

E8C2: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por dois dias.

E9C2: nono dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por dois dias.

E8C8: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por oito dias.

E8C15: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por quinze dias.

EPR: epitélio pigmentar da retina

ERK: Proteína cinase regulada por sinal extracelular

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

GMPc: guanosina 3'-5' monofosfato cíclico

HB-EGF: fator de crescimento epidermal ligado a heparina

IP₃ : inositol trifosfato.

KIP/CIP: Proteína inibidora de cinase / proteína inibidora de ciclina

MAPK: proteína cinase ativada por mitogeno

MEM: meio mínimo essencial

MMP: metalo protease de membrana

NGF: fator de crescimento neuronal

nNOS: óxido nítrico síntese neuronal

NO: óxido nítrico

P1: receptor purinérgico 1

P2: receptor purinérgico 2

P4: quarto dia pós-natal

PBS: tampão fosfato

PLA₂: fosfolipase A₂

PLC: fosfolipase C

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PKC: proteína cinase dependente de cálcio

Rb: retinoblastoma

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

Shh: Sonic hedge hog

SNC: sistema nervoso central

TCA: ácido tricloro acético

TGF: fator de crescimento transformador

UTP: uridina trifosfato

ZV: zona ventricular

RESUMO

O ATP está surgindo como um importante agente mitogênico no desenvolvimento da retina. Neste trabalho, nós mostramos que a resposta das células da retina de pinto para este nucleotídeo diminui com a diferenciação destas células em cultura. A resposta proliferativa induzida ou não por ATP foi consistentemente atenuada quando as células que estavam no ciclo celular entraram em contato com meio condicionado de células pós-mitóticas. O efeito do meio condicionado foi dependente da dose e reversível. A remoção do meio condicionado das culturas aumentou tanto a incorporação basal de [3H]-timidina quanto a estimulada por ATP. O efeito do meio condicionado também foi dependente do estágio de desenvolvimento da retina usado para preparar o meio. Meio condicionado de retinas de embriões com idades entre 7 e 9 dias de desenvolvimento inibiu completamente a resposta proliferativa induzida pelo ATP, bem como a atividade proliferativa das células incubadas na ausência deste nucleotídeo. Inibição semelhante do aumento na incorporação de [3H]-timidina induzida por ATP foi observada usando meio condicionado de culturas purificadas de glia. Entretanto, a incorporação basal de [3H]-timidina não foi afetada. A incubação das células com meio condicionado por 24h aboliu completamente a formação de [3H]-fosfoinosítídeos induzida por ATP. Este efeito foi bloqueado pelo antagonista PPADS, sugerindo que a ocorrência de dessensibilização de receptores P2 nas culturas tratadas com meio condicionado de células pós mitóticas. Entretanto, a remoção de pequenas moléculas como nucleotídeos através de diálise não afetou o decréscimo na atividade proliferativa induzida pelo meio condicionado, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos no arresto do ciclo celular de células da retina em estágios precoces do desenvolvimento em cultura. Estes dados em conjunto sugerem que os fatores que induzem o arresto no ciclo mitótico de células gliais sejam liberados de células pós-mitóticas e que este arresto ocorra de maneira concomitante com a dessensibilização de receptores P2 induzida por agonista.

ABSTRACT

ATP is emerging as an important mitogen in the developing retina. Here, we show that the response of chick retinal cells to this nucleotide decreases as cells differentiate in culture. Both nonstimulated or ATP-induced proliferative response of these cells was consistently attenuated if cycling cells were cocultured with cells from older embryos or if they were cultured with conditioned medium from postmitotic cells. The effect of conditioned medium was dose-dependent and reversible. Removal of conditioned medium from the cultures increased both basal and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine. The effect of conditioned medium was also dependent on the developmental stage of the retina used to prepare the medium. Conditioned medium from cells of retinas of 8- or 9-day-old embryos completely inhibited the proliferative response induced by ATP, as well as the proliferative activity of cells cultured without this nucleotide. Similar inhibition of ATP-induced increase in [³H]-thymidine incorporation was observed using conditioned medium from purified glial cultures, although basal incorporation of [³H]-thymidine was not affected. Incubation of cells with conditioned medium for 24 h completely abolished the formation of [³H]-phosphoinositides induced by ATP. This effect was blocked by the P2 receptor antagonist PPADS, suggesting that agonist-dependent desensitization of P2 receptors occurred in the cultures incubated with conditioned medium from postmitotic cells. However, removal of small molecules such as nucleotides by dialysis did not affect the decline in the proliferative activity induced by conditioned medium, suggesting that additional mechanisms contribute to conditioned medium-dependent cell cycle arrest of early developing retinal cells in culture. Taken together, our results suggest that factors that induce the arrest of glial cells in the mitotic cycle are released from postmitotic cells. The arrest of the cells is concomitant with agonist-dependent P2 receptor desensitization.

Introdução

Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central:

Os mecanismos que levam a especificação e determinação celular durante o desenvolvimento estão começando a ser elucidados. Está claro atualmente que uma célula responde a uma informação do ambiente dependendo do seu complemento de genes expressos. Uma vez que a expressão de genes varia entre as células, algumas delas irão responder a um sinal ambiental particular gerando uma determinada população celular, enquanto que outras células irão interpretar a mesma informação ambiental formando outras populações celulares. Estes fenômenos estão bem ilustrados em trabalhos utilizando células neuroepiteliais estimuladas com a molécula sinalizadora Sonic Hedgehog (Shh). Nestes trabalhos, ficou demonstrado que células neuroepiteliais localizadas na parte mais ventral da medula respondem ao Shh formando neurônios motores (Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995), enquanto que na parte mais rostral do mesencéfalo, células neuroepiteliais respondem ao Shh formando neurônios dopaminérgicos (Hynes *et al.*, 1995).

A habilidade que uma célula tem de responder a uma quantidade de estímulos ambientais é chamada de competência. Durante o processo de desenvolvimento, as células sofrem uma série de mudanças em sua competência, passando por um processo gradual de restrição ou perda de potencial (Slack, 1991).

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) depende do equilíbrio entre a geração e a eliminação de células tanto neuronais quanto

gliais. A geração dos diferentes tipos celulares ocorre através da proliferação dos blastos, seguida pela determinação e diferenciação das células para um fenótipo neuronal ou glial. A eliminação das células durante o desenvolvimento ocorre principalmente através de mecanismos de morte celular programada, sendo a apoptose o tipo de morte celular mais bem estudado até o momento (Blaschke *et al.* 1998; Mayordomo *et al.*, 2003).

Diversos estudos indicam que a proliferação, a migração, a sobrevivência, a determinação e a morte celular são processos regulados por mecanismos genéticos de cada célula, assim como por fatores epigenéticos (Belliveau e Cepko, 1999; McCabe *et al.*, 1999). Desta forma, moléculas como neuropeptídeos e neurotransmissores exibem atividades neurotróficas que podem ser importantes para o desenvolvimento (Lankford *et al.*, 1988). Um exemplo de fator epigenético muito estudado no sistema nervoso central é o fator de crescimento epidermal (EGF), que desempenha um papel central na regulação da proliferação, diferenciação e migração de células progenitoras (Anchan *et al.*, 1991; Lillien e Cepko, 1992).

Ciclo Celular:

As células eucarióticas possuem um sistema complexo de proteínas regulatórias que atuam em sua progressão através do ciclo celular (Figura 1). O centro deste sistema é uma série ordenada de reações enzimáticas, principalmente de fosforilação, que controlam os diversos eventos do ciclo, incluindo o início da replicação do DNA até a segregação dos cromossomos replicados (Albert's, B., et al. 2002).

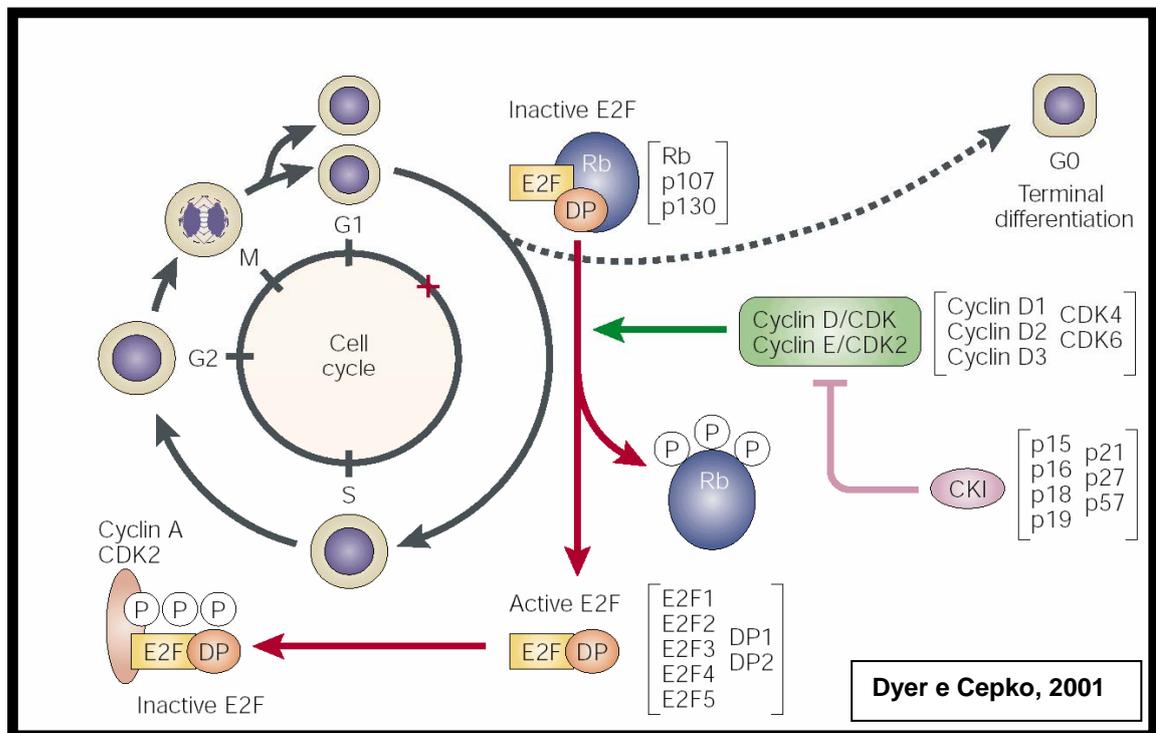


Figura 1: Esquema mostrando as principais famílias de proteínas que regulam o ciclo celular durante a fase G1/S: As proteínas da família da retinoblastoma estão ativadas quando não estão fosforiladas. Quando fosforiladas pelo complexo ciclina/cdk, perdem a atividade e liberam o fator de transcrição E2F. Esse fator possibilita a transcrição de enzimas necessárias para a fase S do ciclo celular (para revisão: Dyer e Cepko, 2001). A inibição do complexo ciclina/cdk é realizada pela interação com proteínas inibitórias que pertencem a família KIP/CIP, que por sua vez, inibem a formação do complexo ciclina/cdk e impedem a fosforilação da proteína retinoblastoma, inibindo a transcrição de genes pró-mitóticos.

O sistema de controle do ciclo celular tem um papel central na regulação do número de células que irão compor os tecidos. Distúrbios relacionados à fisiologia deste sistema podem levar a patologias como câncer e malformações do feto (Albert's, B., et al. 2002).

O ciclo celular pode ser dividido em duas etapas principais: a intérfase, que compreende a duplicação do material celular incluindo o material genético e a mitose (fase M), onde ocorre a divisão celular propriamente dita (Albert's, B., et al. 2002).

Para que as células se dividam, é necessário que elas cresçam e dupliquem seu conteúdo intracelular que inclui tanto estruturas citoplasmáticas como proteínas, RNAs e organelas quanto seu DNA nuclear. Para isto, três intervalos distintos ocorrem durante a intérfase: o primeiro deles, denominado de fase G1, ocorre entre a mitose e o período de duplicação do DNA. A etapa seguinte é a fase de síntese de DNA (fase S) e por fim, ocorre o período compreendido entre as fases S e M denominado de fase G2. A fase G1 inicia-se com o aumento de síntese de proteínas e RNAs depois da mitose quando então a célula aumenta de tamanho. Na fase S, a célula está comprometida com a duplicação do DNA e na fase G2 a célula se prepara para a mitose sintetizando os componentes que terão papel nesta fase (Albert's, B., et al. 2002).

Terminada a intérfase, a célula entra na fase M onde ocorre o fenômeno da mitose. A mitose começa com a condensação dos cromossomos. Em seguida, o envelope nuclear é desfeito e os cromossomos condensados e pareados como cromátides irmãs tornam-se presos aos microtúbulos do fuso mitótico. Continuando a mitose a célula pára brevemente em um estado

chamado de metáfase, onde os cromossomos são alinhados no plano equatorial formando o fuso mitótico. O início da anáfase é marcado pela separação das cromátides irmãs, onde os cromossomos migram para os pólos opostos da célula e formam novos núcleos. A célula divide-se em duas na citocinese, o que completa a mitose (Albert's, B., et al. 2002).

Em cada fase do ciclo celular, mecanismos ainda não totalmente elucidados são ativados com a finalidade de monitorar se as condições ambientais continuam favoráveis para a divisão celular. O sistema de controle do ciclo celular pode interromper o ciclo em pontos de checagem específicos. Estes pontos de checagem podem ser modulados de acordo com a sinalização mediada por fatores extra e intracelulares aos quais estas células estão expostas no momento da divisão. Servem para garantir a integridade da célula em cada estágio (Albert's, B., et al. 2002).

A progressão do ciclo celular é induzida por duas famílias de proteínas. A primeira é a família de proteínas cinases dependente de ciclina (cdks) que catalisam a fosforilação de proteínas específicas envolvidas em cada fase do ciclo. A segunda é uma família de proteínas chamadas ciclinas. Estas proteínas formam complexos com as cdks, ativando-as. Os níveis de cdks permanecem constantes durante o ciclo celular porém as ciclinas oscilam a cada ciclo. A progressão do ciclo celular é dependente do acoplamento das cdks com as ciclinas regulatórias (para revisão, Sherr e Roberts, 1999). A ativação das cdks 6, cdk 4 e cdk 2 está associada com a transição da fase G1 para S (Reed, 1997). Já ativação da cdk 1 está relacionada com a transição entre a fase G2 e a mitose (Jackman e Pines, 1997). Porém, a cdk 5 está

associada com a diferenciação neuronal, migração, formação de novas sinapses e regulação da transmissão sináptica (Dhavan *et al*, 2002).

Já a não progressão do ciclo celular é regulada por um outro grupo de proteínas descritas como proteínas inibidoras do complexo ciclina-CDK (CKI cyclin-dependent kinases inhibitors). Pelo menos duas famílias de CKIs foram descritas: a família INK (p15, p16, p18, p19) e a família KIP/CIP (p21, p27, p57). A inibição dos complexos ciclina-CDK pelas CKIs impede a fosforilação de diferentes substratos protéicos pró-mitóticos, o que bloqueia a entrada das células proliferantes na fase de síntese de DNA (fase S), levando-as a uma parada na fase G1 do ciclo. Esta parada ou arresto parece ser importante para a entrada da célula na fase G0 onde inicia-se sua diferenciação. (para revisão: Sherr e Roberts, 1999).

A regulação da proliferação celular por proteínas da família KIP/CIP na retina em desenvolvimento vem sendo estudada recentemente. Dyer e Cepko (2001a) demonstraram que as proteínas p27^{kip1} e p57^{kip2} regulam populações proliferativas distintas na retina em desenvolvimento, tendo sua expressão aumentada ou diminuída durante as diferentes fases do ciclo celular. Seus dados demonstraram que expressão de p57^{kip2} foi observada em 15% das células progenitoras e aumentava durante a fase G1 tardia. Já a expressão da p27^{kip1} foi observada em 90% das células proliferantes durante a fase G2 tardia ou no início da fase G1.

Nucleotídeos como moléculas sinalizadoras:

Durante muitos anos, o ATP foi estudado como o intermediário energético mais importante, pois sua hidrólise enzimática para ADP é uma das principais fontes de energia nos sistemas biológicos. Assim, nucleotídeos e nucleosídeos desempenham diversas funções biológicas como carreadores de energia, moléculas constituintes dos ácidos nucleicos e substratos para diversas enzimas (para revisão, Rathbone *et al.*, 1999).

Até recentemente, pouca atenção era dada para o papel do ATP e da adenosina como mensageiros na comunicação e sinalização extracelular. Entretanto, já em 1929, Drury e Szent-Gyorgyi descobriram que adenosina encontrada no espaço extracelular podia funcionar como um hormônio liberado pelo coração durante eventos isquêmicos

Posteriormente, alguns estudos sobre a evolução dos transmissores neuroquímicos sugeriram que os derivados das purinas podiam ter sido as substâncias transmissoras primordiais (Trans, 1981). Estes estudos evolutivos relataram ações de purinas em organismos primitivos incluindo bactérias e algas, como por exemplo, o efeito inibitório da adenosina sobre crescimento de várias espécies como *Crithidia fasciculata*, *Micrococcus sodonensis* e *Staphylococcus aureus* (para revisão: Burnstock, 1996).

Nos últimos trinta anos, o papel da adenosina e do ATP como neurotransmissor e neuromodulador no sistema nervoso central, periférico e entérico foi determinado (Burnstock, 1993). Além disso, receptores específicos para ATP (Abbracchio e Burnstock, 1994) e adenosina (Fredholm e Dunwiddie, 1988) foram identificados. Efeitos tróficos incluindo eventos plásticos envolvidos na memória e aprendizado, crescimento de processos

nervosos, neuroproteção contra estímulos tóxicos, regulação do número de células através da indução de morte celular programada e proliferação celular são exemplos de alguns dos efeitos da ativação de receptores para nucleotídeos (Ralevic e Burnstock, 1998; Rathbone *et al.*, 1999; Khakh, 2001; Burnstock, 2004).

Liberação de nucleotídeos:

A concentração extracelular de purinas depende de uma série de fatores que incluem a quantidade de purinas liberadas para o meio extracelular, o volume de líquido extracelular no local de liberação, mecanismos de captação de purinas e enzimas extracelulares que as metabolizam. No SNC as fontes de purinas extracelulares são as células neuronais, a glia, a microglia, células endoteliais e o sangue.

Múltiplos mecanismos de liberação de nucleotídeos de adenina em neurônios e astrócitos tem sido discutidos até o momento. No primeiro deles, o ATP seria liberado no espaço extracelular através da lesão da membrana plasmática. Num segundo mecanismo, o ATP passaria pela membrana plasmática intacta através de hemicanais formados por conexinas (Cotrina *et al.*, 2000) ou através de transportadores ligados à canais iônicos (Abdipranoto *et al.*, 2003; Darby *et al.*, 2003). Num terceiro mecanismo ainda, o ATP seria liberado pela exocitose de vesículas sinápticas de neurônios ou de grânulos intracelulares de células não neuronais, de maneira dependente de Na^+ e Ca^{++} (Richardson e Brown, 1987; Pintor *et al.*, 1992). Neste mecanismo, ATP seria então co-liberado com neurotransmissores clássicos como adrenalina, acetilcolina, GABA, dopamina e glutamato no sistema nervoso central por

mecanismos envolvendo a despolarização da membrana. A concentração de ATP poderia chegar a 100 μM após estimulação elétrica contínua (para revisão: Rathbone, 1999). Os mecanismos mais recentes descritos para a liberação de ATP para o espaço extracelular envolvem a glicoproteína P e o regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CNTF) (Ballerini *et al.*, 2002) bem como o óxido nítrico (NO) (Burnstock, 2004).

No sistema nervoso central, os neurônios têm sido tradicionalmente considerados como a principal fonte de liberação de ATP. Segundo Zimmermann (1994), o ATP pode ser liberado na fenda sináptica em conjunto com outros neurotransmissores, ativando receptores purinérgicos específicos e funcionando como um neuromodulador na fisiologia do SNC. Além disso, o ATP liberado para as sinapses pode ser metabolizado em adenosina por ectonucleotidases (Ceballos *et al.*, 1994). A adenosina, por sua vez, é um potente modulador inibitório, aumentando a condutância de canais de potássio pós-sinápticos e diminuindo a condutância de canais de cálcio pré-sinápticos. (Zimmermann, 1994; Cunha, 2001).

Outros estudos recentes têm demonstrado que células gliais possuem a habilidade de liberar ATP (Cotrina *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Newman, 2001), sugerindo que as células gliais podem modular a atividade neuronal pela ativação de receptores purinérgicos. Em conjunto com estes dados, Newman 2001, utilizando ensaio de quimioluminescência mostrou que o estímulo de células gliais resulta na liberação de ATP na superfície da retina.

Na retina, foi demonstrado que o ATP é a principal purina endógena, sendo a [^3H]-adenosina incorporada rapidamente fosforilada em nucleotídeos de adenina neste tecido (Perez *et al.*, 1986). Além disso, a liberação de ATP

dependente de Ca^{++} foi observada quando a retina era estimulada pela luz ou por despolarização com altas concentrações de K^+ ou, ainda, quando as células de retina são incubadas com glutamato (Santos *et al.*, 1999; Newman, 2005). Outros estudos ainda, mostraram que o ATP podia ser liberado de células do epitélio pigmentar (Pearson, *et al.*, 2005) ou de células de Müller em cultura (Newman, 2001).

Receptores purinérgicos:

Receptores purinérgicos foram detectados em várias espécies de animais (Rathbone *et al.*, 1992; Burnstock, 1993). Em mamíferos, as purinas regulam a contração muscular lisa, a agregação plaquetária e a mobilidade gastrointestinal, assim como participam na fisiologia respiratória e renal (Burnstock, 1991). No sistema nervoso, a ativação dos receptores purinérgicos pode regular o crescimento de neuritos (Gysbers e Rathbone, 1996), modular a proliferação de células gliais (Rathbone *et al.*, 1991; Abbracchio *et al.*, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994; Neary *et al.*, 1996), de progenitores retinianos (Sanches *et al.*, 2002) e de células do endotélio capilar cerebral (Rathbone *et al.*, 1992). As purinas também podem participar na síntese e liberação de neurotrofinas (Ciccarelli *et al.*, 1997), ativação de microglia e formação de escara glial (Neary *et al.*, 1996). As primeiras observações dos efeitos das purinas sobre os astrócitos foram feitas simultaneamente por dois grupos de pesquisadores. Rathbone e colaboradores (1990) purificaram vários fatores do cérebro de aves que promoviam o crescimento de astrócitos em cultura. Ao mesmo tempo Bender

e colaboradores (1990) observaram um efeito mitogênico de ATP em estudos sobre o crescimento de astrócitos em cultura.

ATP extracelular não somente induz a proliferação de astrócitos de rato (Abbracchio e Burnstock, 1994) como também causa mudanças morfológicas e aumenta a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Neary e Zhu, 1994). Estes autores constataram que uma exposição de 60 min com ATP 0,1mM foi capaz de aumentar a expressão de GFAP em 35 a 40%.

Subtipos de receptores purinérgicos:

Receptores distintos para ATP, UTP e seus derivados e para adenosina, foram descritos pela primeira vez por Burnstock e colaboradores em 1976 e 1978. Recentemente, Abbracchio e Burnstock (1994) classificaram os receptores purinérgicos como pertencentes à duas grandes famílias: 1- receptores acoplados a proteína-G (metabotrópicos) e 2- receptores diretamente ligados a canais iônicos (ionotrópicos).

Com base na fisiologia, no perfil farmacológico, na seletividade de acoplamento com vias de segundos mensageiros e na clonagem molecular, Abbracchio e Burnstock (1994) descreveram múltiplos membros destas duas classes de receptores purinérgicos. Assim, os receptores para adenosina (P_1) e ATP (P_2Y) foram classificados como metabotrópicos e os receptores para ATP do tipo P_2X foram classificados como ionotrópicos (Abbracchio e Burnstock, 1994). Enquanto a maioria dos receptores P_2 é ativada por ATP e em menor escala por ADP, algumas subclasses desses receptores podem ser ativadas por pirimidinas como UTP e UDP (Lazarowski e Harden, 1994). De acordo com estes estudos, a ordem de potência do agonista para os

receptores purinérgicos P_1 é adenosina>AMP>ADP>ATP. Já no grupo de receptores purinérgicos P_2 , o ATP é o principal agonista, sendo a ordem de potência do ligante ATP>ADP>AMP> adenosina (Abbracchio e Burnstock, 1994).

Estudos posteriores com base na estrutura molecular, distribuição nos tecidos, características farmacológicas (Abbracchio e Burnstock, 1994) e vias de sinalização específicas (Palmer e Stiles, 1995), estabeleceram que os receptores P_1 podem ser divididos em quatro subtipos, A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos associados à proteína G.

Abbracchio e Burnstock (1994) propuseram que os receptores P_2 fossem divididos em duas grandes famílias: P_2X e P_2Y . A subfamília P_2X de receptores foi identificada como canais iônicos dependentes de ligantes. Já a subfamília de receptores P_2Y está envolvida com a ativação de proteínas G (Di Virgilio, 1991; Abbracchio e Burnstock, 1994) (Figura 2). Em estudos sobre a fisiologia desses receptores demonstrou a correlação destes sítios com os fenômenos de vasoconstrição, vasodilatação, agregação plaquetária sensível ao ADP e aumento de condutância da membrana (Abbracchio e Burnstock, 1994).

Os receptores P_2X apresentam baixa afinidade para o ATP e são responsáveis pela neurotransmissão excitatória rápida já que quando ativados permitem a passagem de cátions tais como Ca^{++} , Na^+ e K^+ . Até o momento já foram descritos sete subtipos: $P_2X_{(1-7)}$ (Ralevic e Burnstock, 1998; Illes *et al.*, 2000; Burnstock, 2004), todos caracterizados por possuírem suas regiões carboxi- e amino-terminais localizadas intracelularmente e exibindo

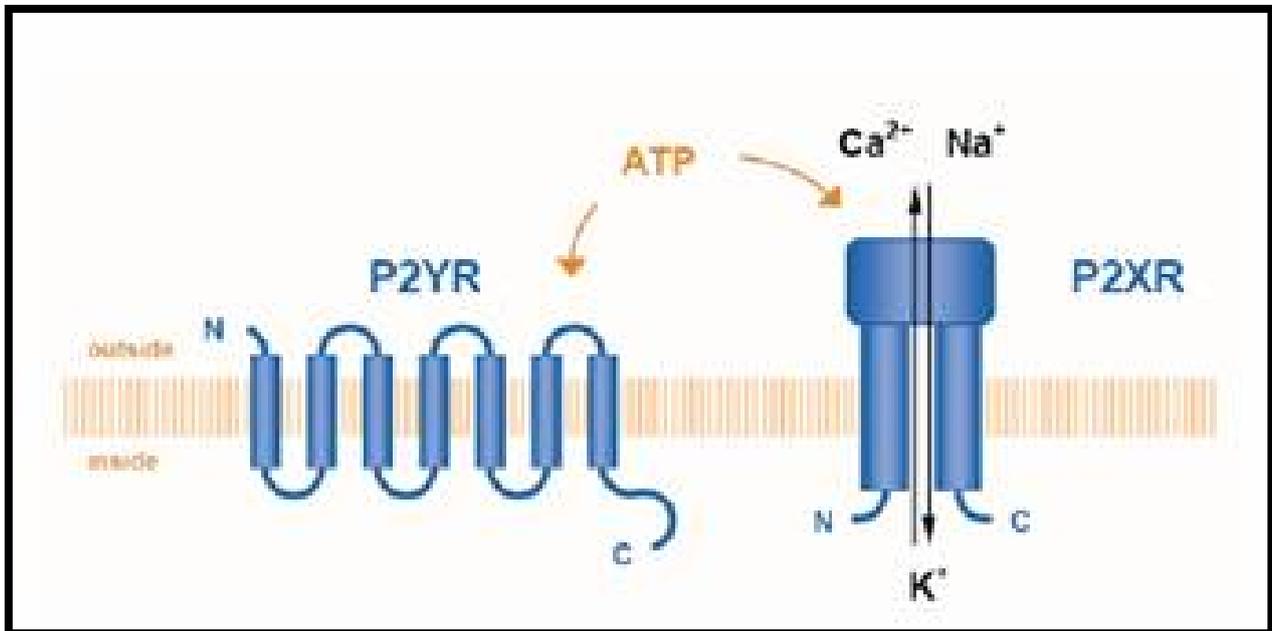
uma alça extracelular onde se ligam agonistas, antagonistas e moduladores (Khakh *et al.*, 1999).

Os receptores metabotrópicos P_2Y são estruturalmente compostos por sete domínios transmembrana, tendo a porção C-terminal localizada no meio intracelular e a porção N-terminal localizada extracelularmente. Até o momento foram identificados oito subtipos: P_2Y_1 , P_2Y_2 , $P_2Y_{3/4}$, P_2Y_6 , P_2Y_{11} , P_2Y_{12} , P_2Y_{13} e P_2Y_{14} , podendo estar acoplados a proteína- $G_{q/11}$, G_s ou G_i . Enquanto os receptores P_2Y_1 , 11 , 12 , 13 são ativados seletivamente por nucleotídeos de adenina (von K ugelgen e Wetter, 2000; Hollopeter *et al.*, 2001), o receptor P_2Y_4 humano (Chang *et al.*, 1995) e P_2Y_6 (Communi *et al.*, 1996) são estimulados por nucleotídeos de pirimidinas. Já o receptor P_2Y_2 responde igualmente bem a ATP e UTP (Lustig *et al.*, 1993).

Vias de transdu o de sinal para receptores de nucleotídeos:

Receptores A_1 são classicamente envolvidos com a inibi o da adenil ciclase (para revisão: Rathbone, 1999) através da ativa o da proteína- $G_{i\alpha 1}$ sensível   toxina pertussis. Além da adenil ciclase, outros efetores podem estar envolvidos na ativa o de receptores A_1 . Estes incluem a guanilil ciclase, além de canais de K^+ e de cálcio dependentes de voltagem (Collis e Hourani, 1993) e da fosfolipase C (Scheimann e Hicks, 1991). Receptores A_1 podem estar também ligados   fosfolipase A_2 (Collis e Hourani, 1993).

Diferentemente dos receptores A_1 , os receptores A_2 estimulam a adenil ciclase acoplando-se   proteína G_s e provocando o aumento dos níveis de cAMP intracelular (Olah e Stiles, 1990).



<http://www.acris-antibodies.com/images/review-Purinergic-G-Protein.jpg>

Figura 2: Receptores purinérgicos P2. Na esquerda está representado o receptor metabotrópico P2Y que é estruturalmente composto por sete domínios transmembrana, uma porção c-terminal localizada no meio intracelular e uma porção n-terminal localizada no meio extracelular. Na direita, está representado o receptor ionotrópico P2X, caracterizado por possuir suas regiões carboxi e amino-terminais localizadas intracelularmente e exibir uma alça extracelular onde se ligam agonistas, antagonistas e moduladores (Khakh *et al.*, 1999). Quando ativados permitem a passagem de cátions tais como Ca^{2+} , Na^+ e K^+ .

Entre os receptores para adenosina, o receptor A_3 foi o último subtipo a ser caracterizado, exibindo uma estrutura, farmacologia e distribuição nos tecidos distinta nas diferentes espécies. Em células RBL-2H3, a ativação dos receptores A_3 promove um aumento nos níveis de Ca^{++}_i através do aumento da produção de inositol trifosfato (Parekh e Penner., 1995).

Classicamente, os receptores ionotrópicos da família P_2X regulam as funções celulares através da abertura de canais de cátions (Abbracchio e Burnstock, 1994). Em geral, estes canais iônicos mostram seletividade para cátions monovalentes como Na^+ , K^+ (Harden *et al.*, 1995) e em alguns casos ao Ca^{++} (Cloues, 1995).

Os subtipos de receptores P_2X_7 diferem dos demais receptores P_2X em suas propriedades farmacológicas, sensibilidade à voltagem e condutância. Além disso, possuem funções distintas dos demais subtipos de receptores desta família, pois possuem a habilidade de formar poros na membrana celular. A ativação de receptores P_2X_7 aumenta a permeabilidade da membrana para a passagem de cátions e ânions, bem como para moléculas com até 900 Da (Ballerini *et al.*, 1995). Ballerini e colaboradores (1996) relataram a presença de receptores P_2X_7 em culturas de astrócitos de rato sendo a sua ativação capaz de aumentar a liberação de purinas destas culturas.

Por outro lado, os receptores metabotrópicos $P_2Y_{1, 2, 4, 6, 11}$ estão acoplados a família de proteínas $G_{q/11}$ e estimulam a fosfolipase C, resultando na formação de inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) com subsequente mobilização de estoques intracelulares de cálcio (Abbracchio e Burnstock, 1994; von Kügelgen e Wetter, 2000) (Figura 3). Esta via de

sinalização foi demonstrada em astrócitos corticais (Neary *et al.*, 1988; Kastritsis *et al.*, 1992) e medula de ratos (Salter e Hicks, 1995; Ho *et al.*, 1996).

O ATP e outros agonistas seletivos para receptores P₂Y, adicionados a culturas de astrócitos de rato ativam a fosfolipase C e aumentam a concentração de Ca⁺⁺ interno (Ballerini *et al.*, 1995), sendo este aumento inibido por taspigardina, uma droga que leva ao esvaziamento dos estoques de cálcio do retículo (Ballerini *et al.*, 1995). Em conjunto com esses dados, Chen e Chen (1996) mostraram que a toxina pertussis inibia o acúmulo de [H³]-fosfoinositídeos induzido por ATP, UTP e 2-metil-tio-ATP em cultura de astrócitos. Estes experimentos sugeriram que, nestas células, receptores P₂Y deviam estar acoplados a PCL_{b3} ou PCL_{b2} através da proteína Gi sensível a esta toxina.

A ativação de receptores P₂Y também foi relacionada com mudanças nos níveis intracelulares de AMPc. Em alguns tipos celulares, a ativação de receptores P₂Y aumentava o acúmulo de AMPc (Gailly *et al.*, 1993). Porém, este efeito poderia estar ocorrendo de forma indireta, uma vez que o ATP poderia estar causando a liberação de substâncias que aumentam a atividade da adenil ciclase. Por outro lado, a ativação de receptores P₂Y pode inibir o acúmulo cAMP (Harden *et al.*, 1995). Em estudos mais recentes, Abbracchio e colaboradores (2003) mostraram que o subtipo de receptor P₂Y envolvido com a ativação da adenil ciclase era o receptor P₂Y₁₁. Já os receptores P₂Y₁₂, P₂Y₁₃ e P₂Y₁₄ promovem a inibição da adenil ciclase através da ativação da proteína G_{i/o} (para revisão: Franke, 2005).

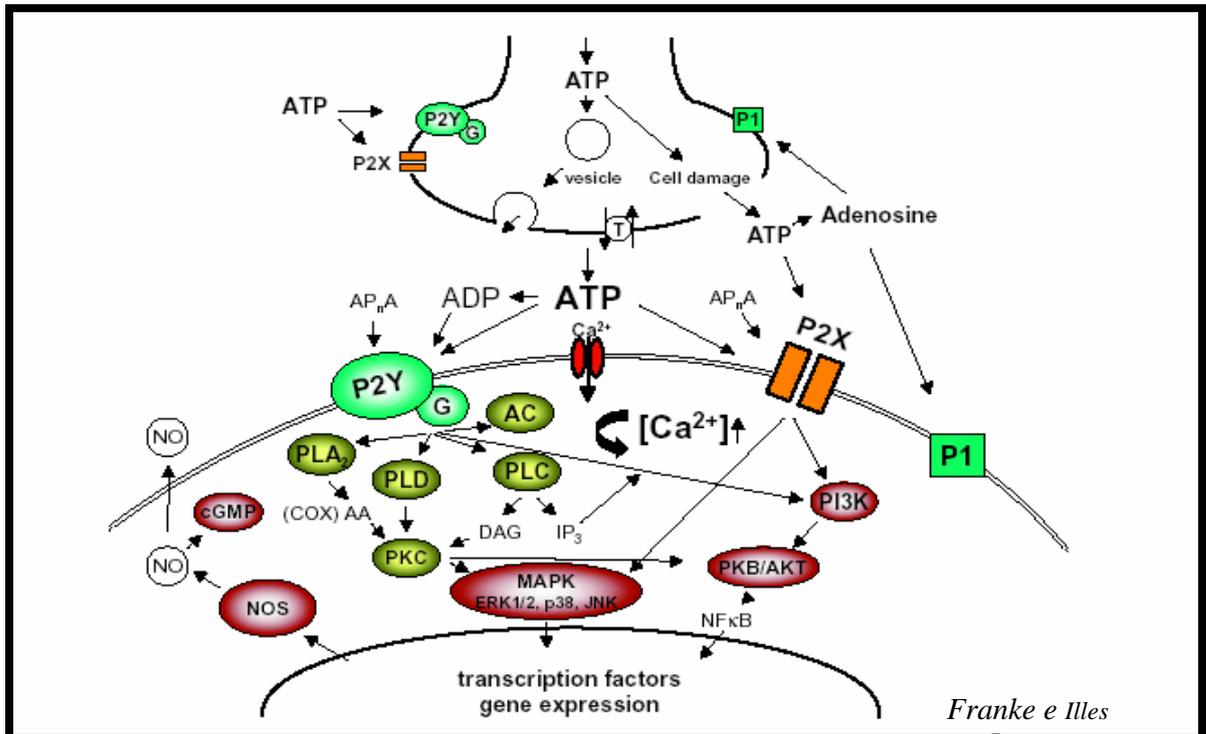


Figura 3: Diagrama esquemático ilustrando as possíveis ações do ATP identificadas até o momento. Estão representados a liberação de ATP, o metabolismo, a ativação de receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y e algumas interações com vias de segundos mensageiros recrutadas.

A ativação de receptores P₂Y também foi relacionada com mudanças nos níveis intracelulares de AMPc. Em alguns tipos celulares, a ativação de receptores P₂Y aumentava o acúmulo de AMPc (Gailly *et al.*, 1993). Porém, este efeito poderia estar ocorrendo de forma indireta, uma vez que o ATP poderia estar causando a liberação de substâncias que aumentam a atividade da adenil ciclase. Por outro lado, a ativação de receptores P₂Y pode inibir o acúmulo cAMP (Harden *et al.*, 1995). Em estudos mais recentes, Abbracchio e colaboradores (2003) mostraram que o subtipo de receptor P₂Y envolvido com a ativação da adenil ciclase era o receptor P₂Y₁₁. Já os receptores P₂Y₁₂, P₂Y₁₃ e P₂Y₁₄ promovem a inibição da adenil ciclase através da ativação da proteína G_{i/o} (para revisão: Franke, 2005).

Mais recentemente, foi mostrado que a ativação de receptores P₂Y em cultura de astrócitos pode ativar a via das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Neary *et al.*, 1996). Membros clássicos da família MAPK, como as proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs), estão envolvidas no crescimento celular, diferenciação e proliferação (Neary *et al.*, 1996; Neary *et al.*, 1999) enquanto que as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) e a p38 estão envolvidas com mecanismos de morte celular (Campos *et al.*, 2002).

A ativação da cascata das MAPKs mediada por receptores P₂Y, em particular as ERK1/2 ou a cinase do N-terminal do c-Jun (JNKs), foi recentemente relacionada com a ativação da caspase-3 e apoptose (Neary *et al.*, 1999; Sellers *et al.*, 2001). Além disso, estudos recentes sugerem que a ativação de um receptor P₂Y acoplado a PLA₂ seja acompanhada por um

aumento na expressão da ciclooxigenase 2 (Abbracchio *et al.*, 1999; Brambilla *et al.*, 2002).

A resposta celular de receptores acoplados à proteína G ao agonista geralmente podem ser rapidamente atenuadas. Os mecanismos que atenuam a sinalização destes receptores são considerados de grande interesse, uma vez que fornecem subsídios à célula para responder adequadamente à hormônios e neurotransmissores. Interações entre os sistemas purinérgico e nitrérgico tem sido propostas em diferentes condições fisiológicas e em diferentes modelos de lesão cerebral (Viscomi *et al.*, 2004). Nos últimos anos, um número crescente de evidências vêm demonstrando que a modulação do cálcio intracelular é dependente da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) após lesão do SNC (Viscomi *et al.*, 2004). Além disso, estudos recentes utilizando células mesangiais de rato (Liu *et al.*, 2002) mostram que a dessensibilização induzida por ATP 0,1mM de receptores P₂Y, pode ser revertida pelo uso de doadores de óxido nítrico (NO) por um mecanismo independente de GMPc, trazendo fortes evidências para a participação deste sistema na modulação da resposta purinérgica ao agonista.

Expressão de receptores P₂ durante o desenvolvimento:

Utilizando imunohistoquímica e RT-PCR, vários grupos têm demonstrado a expressão dos diferentes subtipos de receptores P₂X e P₂Y em vários tecidos e órgãos, incluindo o cérebro e a medula, durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal de ratos (Bennett *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2003). RNAs mensageiros para os subtipos de receptores P₂ estudados foram inicialmente observados durante o 11º dia de desenvolvimento embrionário

do cérebro de rato (E11). Estes receptores aparecem expressos de forma dinâmica, alternando entre o aumento e a diminuição de expressão dos respectivos RNAm durante os diferentes estágios de desenvolvimento do embrião (Cheung *et al.*, 2003). Nestes estudos com RT-PCR foram detectados transcritos para P₂Y₁, P₂Y₄, P₂Y₆ e P₂Y₁₂, mas não para o receptor P₂Y₂, durante a fase embrionária deste animal (Bennett *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003). No 18º dia de estágio embrionário, uma forte expressão de P₂Y₁ foi detectada, consistente com um aumento na regulação do RNAm deste receptor na fase final do desenvolvimento. O receptor P₂Y₁ também foi detectado no cérebro de ratos durante o 1º dia pós-natal (Cheung *et al.*, 2003). Em cérebro de pinto, o receptor P₂Y₁ foi detectado durante os primeiros 10 dias de desenvolvimento embrionário (Meyer *et al.*, 1999). Já a expressão de P₂Y₁₂ foi menor em E13 e E17, mas aumentou gradualmente durante a 1ª e a 6ª semana de desenvolvimento pós-eclosão (Sasaki *et al.*, 2003).

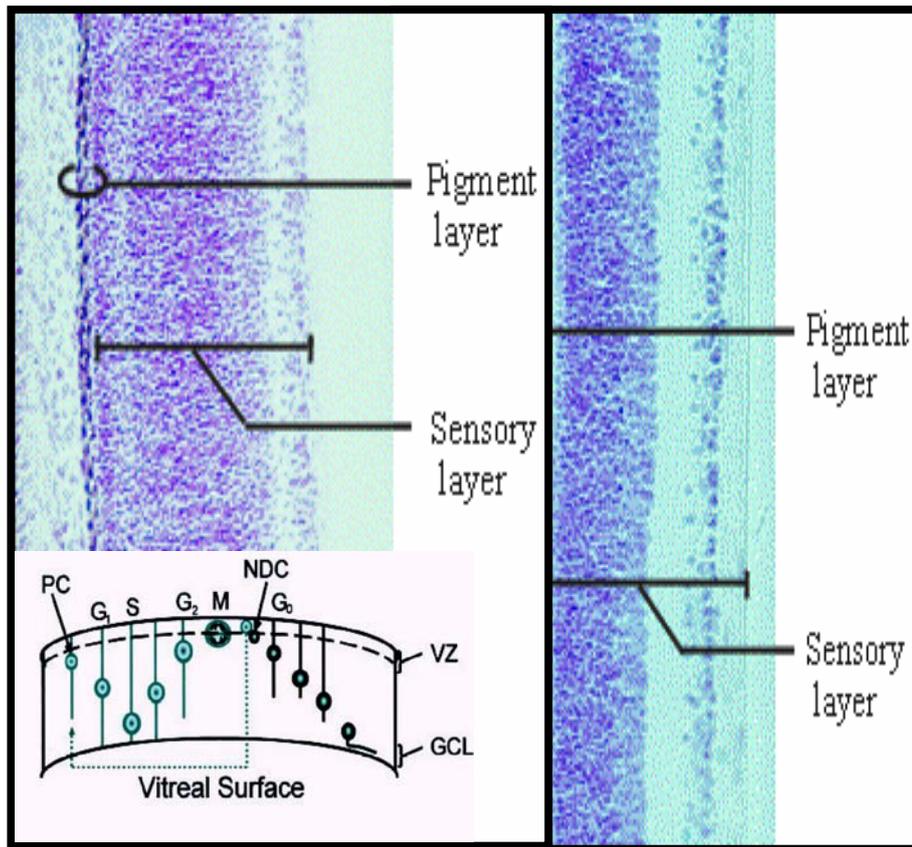
Estrutura e neurogênese da retina de pinto:

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

O tecido retiniano é especializado em converter a energia luminosa do ambiente em sinais químicos e elétricos neurais, que são processados e

interpretados pelo cérebro. Atenção especial tem sido dada para esta estrutura devido a vários fatores. Um deles é o fato de se tratar de uma região do sistema nervoso central de fácil acesso, podendo ser obtida durante quase todo o período de desenvolvimento embrionário. Um outro é o fato de ser uma estrutura isolada de outras estruturas nervosas e bastante conhecida do ponto de vista histológico, se comparada com outras estruturas do sistema nervoso, embora possua uma organização sináptica semelhante à organização das outras áreas. Além disso, a maioria dos mediadores químicos encontrados em várias regiões do cérebro também estão presentes neste tecido. Essa combinação de diversidade fisiológica e simplicidade de organização fazem da retina um modelo bastante útil para o estudo das interações moleculares do SNC.

Durante a formação da retina neural, o processo de mitose é confinado na camada de células progenitoras imediatamente adjacente ao epitélio pigmentar da retina, a zona ventricular (ZV) (Figura 4). Os núcleos dos progenitores da retina se movimentam por migração nuclear intercinética, movendo-se da ZV em direção a camada de células ganglionares (CCG) durante a fase G1 do ciclo celular. Após a duplicação do DNA na fase S, os núcleos retornam a ZV durante a fase G2 para finalizar o ciclo com a mitose (para revisão, Jakobson, 1978; Pearson *et al.*, 2002).



Pearson, 2002

E7

E13

Figura 4: Representação da retina de embrião de pinto com 7 (E7) e 13 (E13) dias de desenvolvimento embrionário. Durante a formação da retina neural, o processo de mitose é confinado na camada de células progenitoras imediatamente adjacente ao epitélio pigmentar da retina, a zona ventricular (VZ). Os núcleos dos progenitores da retina se movimentam por migração nuclear intercinética, movendo-se da VZ em direção a camada de células ganglionares (GCL) durante a fase G1 do ciclo celular. Após a duplicação do DNA na fase S, os núcleos retornam a VZ durante a fase G2 para finalizar o ciclo com a mitose (para revisão: Jakobson, 1978; Pearson *et al.*, 2002).

A medida que as células vão saindo do ciclo celular, o tecido retiniano vai sendo formado em camadas que podem ser basicamente divididas em camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e camadas de prolongamentos (camadas plexiformes). Do epitélio pigmentar em direção ao vítreo, a retina é composta pela camada dos fotorreceptores (camada nuclear externa, CNE), seguida pela camada plexiforme externa (CPE), pela camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e pela camada das células ganglionares (CCG) (Figura 5).

Histologicamente, existem 6 tipos de neurônios e 1 tipo celular glial na retina (para revisão, Rodieck, 1998). Na retina de pinto, a diferenciação das primeiras células ocorre a partir do segundo dia embrionário (E2), do centro para a periferia, começando pelas células ganglionares, seguidas pelos fotorreceptores e pelas células amácrinas e horizontais (Fujita e Hori, 1963; Morris, 1973; Spence e Robson, 1989; Prada *et al.*, 1991). As últimas células a saírem do ciclo celular são as células bipolares e a glia de Müller, havendo o término de divisões celulares em E12 (Kahn, 1974; Prada *et al.*, 1991) (Figura 6).

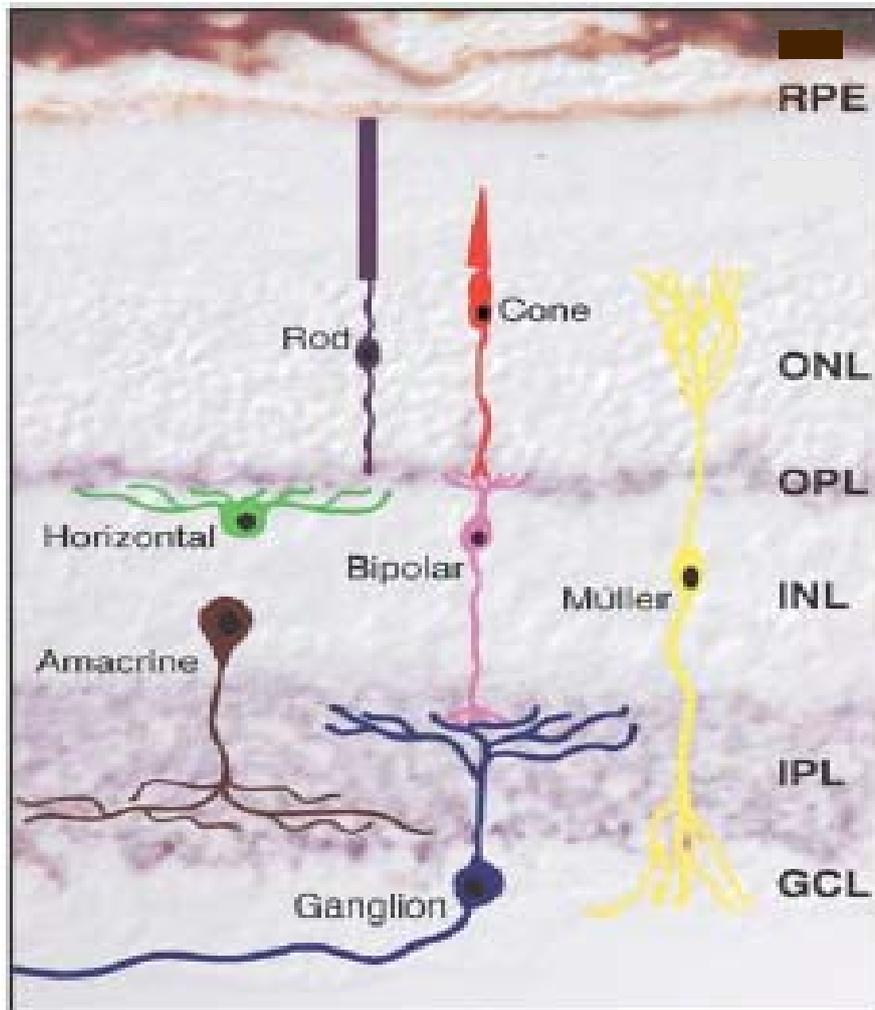


Figura 5: Representação esquemática da retina de pinto, mostrando suas diferentes camadas e tipos celulares. RPE: epitélio pigmentar da retina, ONL: camada nuclear externa, OPL: camada plexiforme externa, INL: camada nuclear interna, IPL: camada plexiforme interna, GCL: camada de células ganglionares. As células desenhadas em roxo e vermelho representam os fotorreceptores bastonetes e cones respectivamente, em verde, as horizontais, em rosa, as bipolares, em marrom, as amácrinas, em azul escuro, as ganglionares e em amarelo, a glia de Müller. (Klessen *et al.*, 2004).

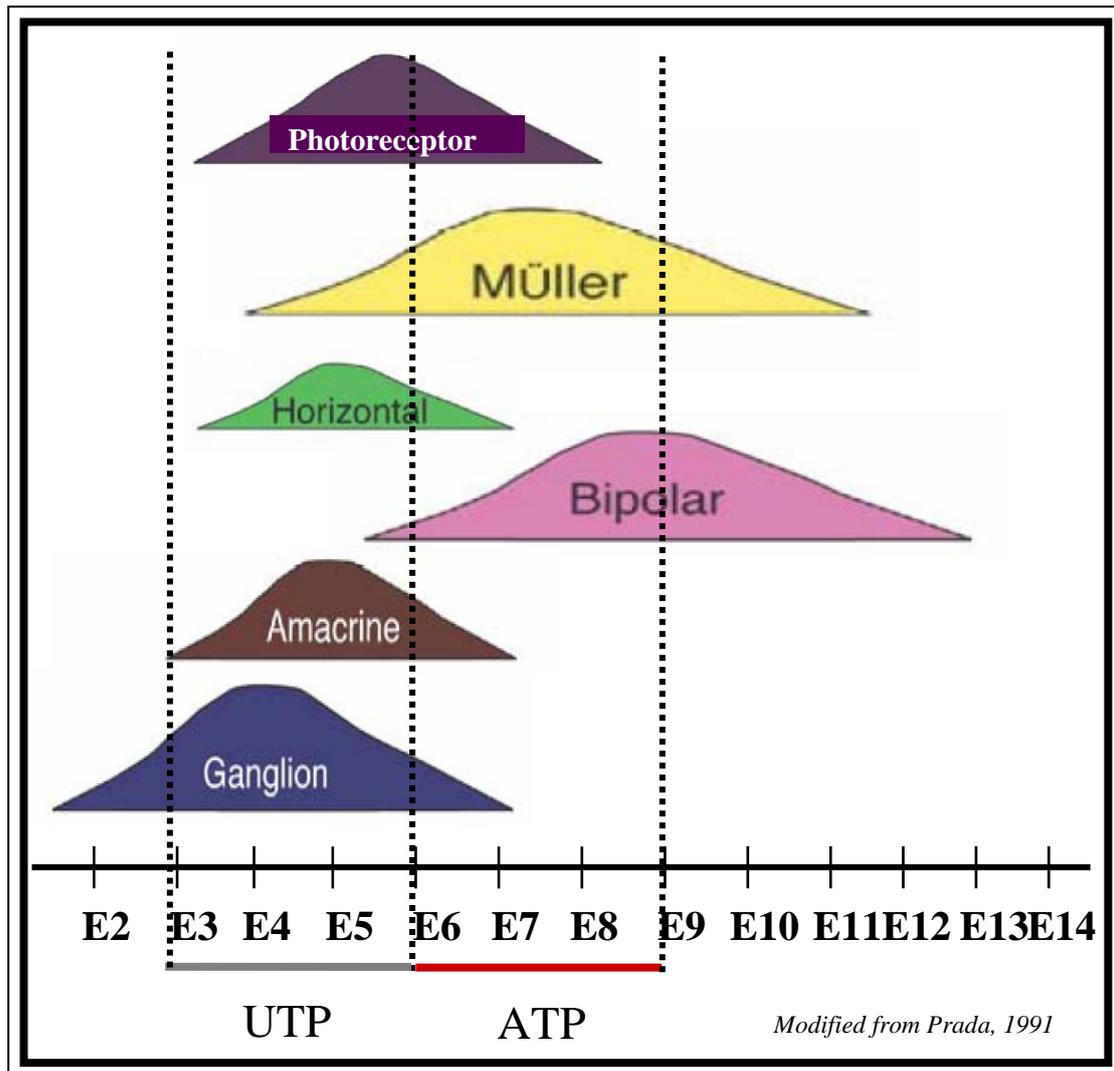


Figura 6: Representação esquemática do curso temporal da neurogênese na retina embrionária de pinto. Na retina de pinto, a diferenciação das primeiras células ocorre a partir do segundo dia embrionário (E2), do centro para a periferia, começando pelas células ganglionares, seguidas pelos fotorreceptores e pelas células amácrinas e horizontais. As últimas células a saírem do ciclo celular são as células bipolares e a glia de Muller, havendo o término de divisões celulares e E12. Em cinza, as idades embrionárias onde o UTP induz proliferação retina embrionária de pinto (Pearson *et al.*, 2002). Em vermelho, as idades embrionárias onde se observa o aumento da proliferação induzido por ATP (Sanches *et al* 2002).

Células de Müller:

As células de Müller são as principais células gliais na retina, representando 90% deste tipo celular nesse tecido. Além disso, existem mais 3 tipos de células gliais retinianas que são representadas pelos astrócitos, pela microglia e por oligodendrócitos. As células de Müller além de oferecer sustentação e nutrição aos neurônios retinianos, ela pode estar envolvida na modulação neuroquímica da retina. A glia de Müller também desempenha um importante papel de manutenção e sobrevivência de neurônios em condições fisiopatológicas, como, por exemplo, pela sua habilidade de promover uma rápida recaptção de glutamato do meio extracelular quando processos de lesão retiniana decorrentes de traumas mecânicos ou isquemia tecidual ocorrem (para revisão, Sarthy e Ripps, 2001). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que as células gliais podem modular diretamente a atividade neural pela liberação de substâncias neuroativas.

Na retina de pinto, estas células gliais já estão presentes em fases bem precoces do desenvolvimento, por volta do 6º dia embrionário (Meller e Glees, 1964). As células de Müller formam uma matriz na qual as células neuronais da retina são ordenadas antes da fase de neurogênese, ou seja, elas servem como um suporte que auxilia na estratificação da retina (Newman e Reichenbach, 1996).

As células de Müller se dispõem radialmente em relação à retina e percorrem toda a espessura da retina neural (figura 5). Seu corpo celular está situado no meio da CNI, de onde partem seus processos em ambas as direções da retina. Na região mais interna da retina, seus processos se expandem e vão dar origem a um prolongamento em forma de pé que na

borda interna deste tecido, formam a membrana limitante interna. Por outro lado, na borda externa da retina, já na camada de fotorreceptores, as projeções das células de Müller vão dar origem a membrana limitante externa. Além dos prolongamentos mencionados acima, processos secundários partindo do corpo celular envolvem os corpos celulares e dendritos dos neurônios e os axônios das células ganglionares (Newman e Reichenbach, 1996). Em termos funcionais, as células de Müller expressam uma grande variedade de canais iônicos dependentes de voltagem (Ca^{2+} , K^+ , Na^+) e receptores para amino-ácidos, catecolaminas, peptídeos neuroativos, hormônios e para fatores de crescimento, além de transportadores de alta afinidade para glutamato e GABA (Newman e Reichenbach, 1996).

Estudos recentes apontam para células de Müller da retina como principal fonte de regeneração neural. Estes estudos demonstraram que a glia radial poder ser as células tronco no SNC de mamíferos em desenvolvimento, uma vez que podem gerar novos neurônios e glia (Malatesta *et al.*, 2000; Noctor *et al.*, 2001). Outros estudos no cérebro de mamíferos têm demonstrado que progenitores de astrócitos podem ser as células tronco neurais na zona subventricular do cérebro de roedores (Laywell *et al.*, 2000; Alvarez-Buylla *et al.*, 2001) e do hipocampo (Seri *et al.*, 2001). Além disso, astrócitos do córtex de roedores são capazes de gerar novos neurônios com a expressão de Pax6 (Heins *et al.*, 2002). Fischer e Reh (2001) tem demonstrado que a glia de Müller na retina também pode ser a fonte celular para a regeneração neural.

Estudos mais recentes têm demonstrado que as células gliais podem modular diretamente a atividade neural pela liberação de substâncias

neuroativas. Quando a retina sofre lesão, células de Müller entram novamente no ciclo celular. Em conjunto com a proliferação, as células de Müller se tornam indiferenciadas e começam a expressar combinações de fatores de transcrição que são normalmente expressos em progenitores retinianos. Entre as novas células geradas pela proliferação de progenitores derivados da glia de Müller, ~70% permanecem indiferenciadas, ~30% formam novas células gliais e uma pequena porcentagem de ~5% se diferenciam em neurônios (Fisher e Reh, 2003).

Sinalização química mediada por receptores P₂ na retina de pinto:

Além dos receptores colinérgicos muscarínicos, foi demonstrado que receptores purinérgicos estão entre os primeiros receptores de membrana funcionalmente ativos em células de embrião de pinto durante a formação da camada germinativa (Laasberg, 1990).

A presença tanto de receptores P₂X quanto P₂Y foi demonstrada na retina (para revisão: Peralta e Pintor, 1998). Enquanto a ativação de receptores do tipo P₂X por ATP parece potenciar a liberação de GABA mediada por concentrações altas de KCl (Neal *et al.*, 1998) assim como diminuir a liberação de acetilcolina dependente de luz (Neal e Cunningham, 1994), a ativação de receptores do tipo P₂Y por ATP está envolvida na mobilização de cálcio proveniente de estoques intracelulares neste tecido e que após a sinaptogênese neste tecido, ocorria uma diminuição na concentração de Ca⁺⁺ intracelular induzida por ATP. (Sugioka *et al.*, 1996).

Proliferação celular na retina:

Na retina embrionária de pinto, a mobilização de cálcio intracelular foi correlacionada temporal e espacialmente com a proliferação celular, sugerindo a participação destes neurotransmissores neste processo (Yamashita *et al.*, 1994; Sugioka *et al.*, 1996; Sakaki *et al.*, 1997). Além disso, a participação de receptores purinérgicos P2 na proliferação de células retinianas foi demonstrada pela inibição da incorporação de [³H]-timidina pelos antagonistas purinérgicos PPADS e suramina (Sugioka *et al.*, 1999b).

Sugioka (1999a), utilizando um kit para detecção de ATP com luciferin-luciferase, mostrou que a retina de embrião de pinto com 3 dias de desenvolvimento acumula ATP no meio de cultura, chegando aos níveis máximos após 1h de cultivo. O acúmulo de ATP se mantém após 24h e diminui 50% após 48h de cultivo.

Pearson *et al.*, 2002, mostrou que os sistemas purinérgico e colinérgico muscarínico podem estar modulando a proliferação celular na retina de pinto durante estágios precoces do desenvolvimento embrionário. Seus estudos demonstram que carbacol (agonista muscarínico) aumenta o intervalo de tempo entre as mitoses, resultando na diminuição de populações celulares neste tecido. Já o UTP diminui o intervalo de tempo entre as mitoses, estimulando a proliferação celular na retina. Entretanto, Milenckovik *et al* (2003), estudando a síntese de DNA induzida pela ativação de receptores P2Y em células de Müller de hamster, concluiu que o efeito mitogênico do ATP envolvia a transativação de receptores tirosina cinase para o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF). A ativação de receptores P2Y por ATP levava a um aumento nos

níveis de cálcio intracelular que por sua vez podia causar a liberação de PDGF para o meio extracelular. Este fator então ativaria o receptor PDGF- α , provocando a ativação de metaloproteinases de matriz (MMP) que clivariam o HB-EGF da matriz extracelular, ativando, conseqüentemente, o receptor de EGF.

A resposta da retina para o ATP é predominante nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e o envolvimento de receptores purinérgicos na regulação da síntese de DNA na retina foi demonstrada (Sugioka *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2002; Sanches *et al.*, 2002). Esta resposta é preliminarmente associada com a mobilização cálcio de estoques intracelulares (Yamashita e Sugioka, 1998; Sugioka *et al.*, 1999a; 1999b; Sugioka e Yamashita, 2003;) e ativação de PKC e MAPKs (Sanches *et al.*, 2002).

Por outro lado, foi demonstrado que a proliferação de progenitores na retina de rato pode ser estimulada por fatores tróficos como o fator de crescimento de fibroblasto (FGFs), EGF e o fator de crescimento tumoral (TGF α) (Anchan *et al.*, 1991; Lillien e Cepko 1992). Além disso, fatores solúveis podem ser liberados regulando negativamente a proliferação neste tecido. Ikeda e Puro (1995) mostraram que TGF β 2, além de agonistas para receptores metabotrópicos glutamatérgicos, foi capaz de inibir a proliferação de células gliais da retina humana induzida por bFGF, PDGF, EGF e fator de crescimento do nervo (NGF). Posteriormente, Gomes e colaboradores (1999), utilizando meio condicionado de culturas purificadas de neurônios, induziram a diferenciação de astrócitos de camundongos através da expressão heteróloga do promotor do gene para GFAP e que o fator liberado pelos

neurônios capaz de ativar este promotor era o TGF β 1 (de Sampaio e Spohr, *et al.*, 2002).

Nesta mesma linha, Close e colaboradores (2005) mostraram que neurônios da retina de rato liberam fatores que regulam a proliferação de progenitores neste tecido. Foi mostrado que TGF β , quando liberado por neurônios, inibe a proliferação de progenitores retinianos no quarto dia de desenvolvimento pós-natal (P4). Além disso, o uso de anticorpos contra TGF β em retinas de ratos em P6, período em que ocorre um declínio na proliferação deste tecido, aliado com um estímulo proliferativo por EGF, resulta no aumento da proliferação da glia de Müller "*in vivo*", o que mostra que o TGF regula negativamente a proliferação de progenitores e da glia de Müller na retina de rato em desenvolvimento.

Objetivos

- 1- Identificar os tipos celulares envolvidos na proliferação celular induzida por ATP.
- 2- Investigar a razão do efeito proliferativo do ATP diminuir durante o desenvolvimento da retina.
- 3- Identificar os elementos envolvidos na diminuição do efeito proliferativo do ATP; Investigar os possíveis mecanismos de transdução de sinais envolvidos nesta diminuição.

Materiais e Métodos

Materiais:

[³H]-timidina (40 Ci/mmol) e [³H]-myo-inositol (22.2 Ci/mmol), BrdU foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.; ATP, ADP, PPADS, glutamina, penicilina-g, sulfato de estreptomicina da Sigma (St. Louis, MO, USA).; BME, DMEM, MEM da Life Technologies Inc.; Tripsina da Worthington Biochemical (Freehold, NJ, USA).

Cultura de retina:

Retinas de embrião de pinto em diferentes fases do desenvolvimento (E7, E8, E9 e E10) foram dissecadas em ambiente estéril, em solução salina sem cálcio e magnésio (CMF). As retinas foram tratadas com tripsina 0.1% por 20min, à 37°C. A solução de tripsina foi retirada e as células mecanicamente dissociadas em 5mL de meio BME ou MEM, suplementados com 2% de soro fetal bovino, antibióticos (0.1mg/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina) e glutamina 200mM. As células foram semeadas sobre lamínulas ou placas de Petri de 35mm de diâmetro, na densidade de aproximadamente 3×10^6 células por placa. Após 24h de cultivo, as culturas foram tratadas ou não com agentes farmacológicos específicos e/ou meio condicionado e incubadas à 37°C por mais 24h. Após este período, foram utilizadas nos experimentos de incorporação de [³H]-timidina ou imunocitoquímica. Para se avaliar o acúmulo de [³H]- fosfoinositídeos, 1×10^6 células por placa foram utilizadas.

Acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos:

Cultura de células de retina obtidas de embriões de pinto de 7 dias E7 foram incubadas por 2.5h, à 37°C, em 1 mL de meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) livre de inositol, contendo 1 µCi de [³H]-myo-inositol. LiCl, a concentração final de 10 mM, foi adicionado 1.5h após o início do protocolo e realizou-se uma nova incubação de 1h. Em seguida, realizou-se a adição de ATP, a concentração final de 0.1mM e submeteu-se o sistema à uma nova incubação de 1h. O estímulo foi interrompido com a lavagem das culturas com 2 mL de solução de Hank's tamponada com HEPES (3x) 2mL, seguida da raspagem das placas adicionadas de TCA (ácido tricloroacético) 50% à uma concentração final de 15% em solução de Hank's. As culturas foram então transferidas para tubos de centrífuga e congeladas overnight à -20°C. Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 15000 g por 25 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro, lavado por três vezes com 2,5 mL de éter etílico e neutralizado com solução de Tris-HCl 20 mMol/L (pH 7,4) contendo 5mMol/L de EDTA. A solução final foi transferida para colunas de troca iônica contendo 1 mL de resina Dowex X-8, previamente equilibrada com ácido fórmico 1 Mol/L. As frações foram seqüencialmente eluídas com (1) 5 mL de água deionizada, (2) 5 mL de solução tetraborato de sódio 5 mMol/L / formiato de amônio 60 mMol/L e (3) 4 mL de solução ácido fórmico 0,1 mMol/L / formiato de amônio 1 Mol/L. Esta seqüência de eluição removeu em (1) [³H]-inositol, em (2) [³H]-glicerofosfoinositol e em (3) derivados fosforilados de [³H]-inositol. A radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

O precipitado obtido a partir da centrifugação foi dissolvido em NaOH 1 Mol/L e o teor protéico dosado utilizando-se o método de Lowry et al., 1951. Os resultados obtidos a partir da determinação da radioatividade foram normalizados para CPM/mg de proteína (CPM = contagens por minuto na cintilação líquida).

Incorporação de [³H]-timidina:

Culturas tratadas ou não foram incubadas com [³H]-timidina (0.25 – 0.5 µCi) por 1h, à 37°C. As culturas foram então lavadas 4 vezes com 2mL de BME tamponado com HEPES 25mM, ph 7.4. As células foram dissolvidas com 0.2 mL de NaOH 0.4N. Após 15min. Foi adicionado 3mL de água destilada e transferido para tubo de ensaio. As amostras foram então incubadas à 4°C, durante 30min. Após a adição de TCA 50%. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro do tipo Whatmann GF/B e lavados 3 vezes com TCA 5% gelado. Os filtros foram secos à 100°C por 1h e a radioatividade determinada por cintilação líquida.

Co-culturas de retinas de diferentes idades:

Retinas de embriões de 7 e 9 dias foram dissecadas, incubadas com tripsina 0.1% e dissociadas separadamente. Alíquotas contendo 3×10^6 células de E7 foram misturadas com densidades crescentes de células de E9 e a mistura de células resultante semeada em placas de cultura de 35 mm. As culturas foram então mantidas por 24 h na presença ou ausência de ATP 0.1 mM. Após este período, as culturas foram utilizadas nos experimentos de incorporação de [³H]-timidina.

Obtenção e tratamento com meios condicionados:

Para obtenção de meios condicionados, culturas de retinas de E7, E8 e E9 contendo 10^7 de células foram estabelecidas como descrito para culturas menos densas. Resumidamente, após estabelecidas em placa de petri, o meio destas culturas era substituído por meio fresco com soro 2% a cada 24h de cultivo, até que atingissem a idade necessária para se obter o meio condicionado. Então, para se obter o meio condicionado de E8C8, por exemplo, as células de embriões com 8 dias de desenvolvimento foram cultivadas por 8 dias e a cada intervalo de 24h o meio condicionado era coletado e substituído por meio fresco.

Para obtenção de culturas purificadas de glia (Cossenza e Paes de Carvalho, 2000) utilizamos retinas de E8, cultivadas por 15 dias.

Para a realização do tratamento das culturas de E7 com meios condicionados obtidos de culturas com diferentes idades, o meio coletado (meio condicionado) foi complementado com glutamina 1mM e glicose 2mM, filtrado e congelado à $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Exceto quando especificado, o meio condicionado foi diluído na proporção de 1:1 e adicionado à culturas de células de E7 (3×10^6 células/placa), cultivadas por 24h na presença ou não de ATP 0.1 mM. Após outras 24h, as culturas foram lavadas e processadas para a incorporação de [^3H]-timidina. Para os experimentos de acúmulo de [^3H]-fosfoinosítídeos, culturas de E7 contendo 1×10^7 células/placa foram utilizadas.

Imunocitoquímica de BrDU:

Células, tratadas ou não, cultivadas sobre lamínulas, foram incubadas com Bromo-Deoxi-Uridina (BrDU) 1mM por 2 horas, lavadas com solução salina balanceada (PBS) e fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato, por 60 minutos, à temperatura de 4°C. Após incubação em HCl por 30 minutos à 37°C para a desnaturação do DNA, as culturas foram lavadas e incubadas por 24 h com anticorpo monoclonal anti-BrDU Amersham na diluição de 1:500. Foram então lavadas e incubadas por mais uma hora com antisoro secundário anti-camundongo fluorescente Alexa 594. As lamínulas foram montadas com vecta shield e analisadas por microscopia confocal.

Diálise do meio condicionado:

O meio condicionado foi produzido como descrito no item 3.5 e dialisado com membrana permeável a moléculas menores do que 12 KDa durante 12 horas a 4° C sob agitação. Em seguida, o meio condicionado dialisado foi suplementado com meio de cultura fresco na concentração de 1:1 acrescido de soro fetal bovino 2%, glutamina 1mM, glicose 2mM e esterilizado por filtração.

Resultados

Sanches e cols. (2002) demonstraram que culturas de células de retinas obtidas de embriões de pinto em estágios crescentes de desenvolvimento incorporavam menos [³H]-timidina quando estimuladas com ATP, sugerindo que a proliferação de células induzida por ATP diminuía com a diferenciação do tecido. Com o objetivo de investigar se a diminuição na incorporação de [³H]-timidina induzida por ATP também poderia ser observada em células de retina se desenvolvendo em cultura, o efeito de ATP sobre a proliferação foi caracterizado em células mantidas em cultura por períodos crescentes de tempo (Figura 7). As culturas foram obtidas de embriões com 7 dias de desenvolvimento (E7) e mantidas por um período total de cinco dias (E7C5). Nos tempos indicados, um grupo de culturas foi processado para a incorporação de [³H]-timidina após ter sido previamente incubado por 24 h na presença ou ausência de ATP 0.1 mM. Em células obtidas de embriões com 7 dias e cultivadas por 24 h (E7C1), um aumento de 97.1% acima dos níveis basais foi observado na incorporação de [³H]-timidina nas células tratadas com ATP. Apesar da incorporação de [³H]-timidina diminuir ~68% e 52% nas próximas 24 horas de cultivo, nas culturas controle e nas tratadas, respectivamente, o ATP ainda foi capaz de induzir uma incorporação de [³H]-timidina 140% acima dos níveis controle. Uma diminuição no estímulo do ATP foi observada nos próximos 3 dias de cultivo. Enquanto em culturas de E7C3 o efeito deste nucleotídeo foi 55.1% acima do basal, em culturas de E7C5 a resposta das células foi de apenas 20.9% acima da incorporação basal de [³H]-timidina.

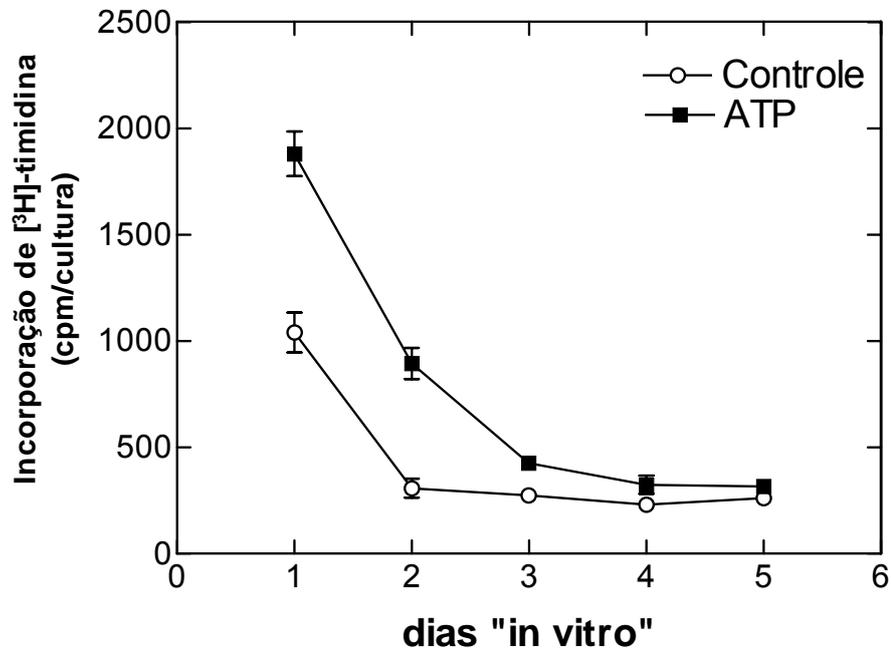


Figura 7- Efeito de ATP 0.1 mM sobre a incorporação de [³H]-timidina em células de retina de pinto cultivadas por diversos períodos de tempo. Retinas de embriões com 7 dias foram dissecadas e 3×10^6 células foram cultivadas em placas de 35 mm pelos tempos indicados. As culturas foram pré-tratadas com ATP 0.1 mM 24 h antes do ensaio de proliferação. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em duplicata.

Na retina de pinto, tanto células bipolares quanto a glia de Müller proliferam entre o 7^o e o 9^o dia de desenvolvimento embrionário (Prada et al., 1991). Sanches e cols. (2002) observaram que ATP era capaz de induzir proliferação em culturas de células de retina obtidas de embriões deste mesmo período de desenvolvimento. Com o objetivo de investigar o tipo celular em que o ATP induzia um aumento na síntese de DNA, resolvemos identificar o tipo celular afetado pelo ATP através de imunocitoquímica para BrdU e microscopia confocal. Células de retina de E7 cultivadas por 24h e tratadas com ATP 0.1mM por mais 24h (E7C2) foram incubadas com o análogo BrdU na concentração de 1 mM por 2 h e processadas para imunocitoquímica como descrito nos Métodos. Na figura 8A podemos observar a marcação para BrdU em vermelho em culturas controle, sem tratamento. Já na figura 8B, podemos observar a marcação para BrdU em culturas tratadas com ATP. Tendo em vista que as células de retina em cultura tendem a formar grumos, de tal forma que células gliais se localizam no assoalho da placa de cultura e os neurônios se estabelecem sobre este tipo celular, uma pequena diferença na focalização dos núcleos das células gliais e dos núcleos dos neuroblastos pode ser detectada por microscopia confocal. Com base nesta diferença, então, procedemos a escolha do plano de imagem onde as células marcadas para BrdU estavam localizadas e fotografamos seus núcleos. Nossas análises revelaram que as únicas células marcadas para BrdU foram as células que tinham contato com o assoalho da placa, cujos núcleos apresentavam aspecto semelhante à núcleos de células gliais. Nenhuma marcação foi observada em núcleos de neurônios.

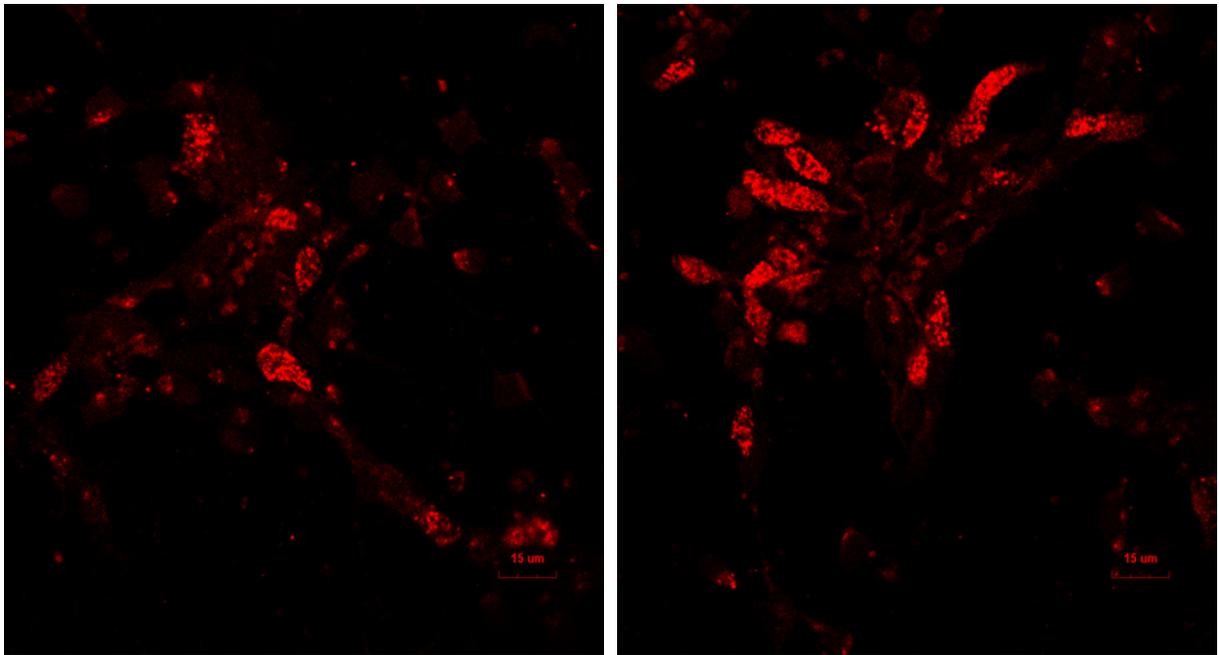


Figura 8- Imunocitoquímica para BrdU em células de retina de E7 cultivadas por 24 h na ausência (A) ou presença de ATP 0.1 mM (B). As células foram semeadas em lamínulas, cultivadas por 24 h e incubadas com BrdU 1mM, por 2 horas. Após este período, as culturas foram fixadas e processadas por imunocitoquímica e analisadas por microscopia confocal. Em vermelho estão mostrados núcleos de células com morfologia glial marcados para BrdU. A barra representa 15 μ m.

Além disso, embora não tenhamos quantificado, um aumento no número de núcleos marcados com as características acima podia ser observado nas culturas tratadas com ATP. Estes resultados em conjunto com as evidências anteriores sugerem fortemente que o efeito mitogênico do ATP ocorra em células gliais e não em neurônios.

Dyer e Cepko (2001), através de vários trabalhos na retina de rato, sugerem que a proliferação celular na retina seja controlada por populações celulares que já abandonaram o ciclo celular e se diferenciaram. Com base nesta hipótese, a diminuição progressiva na resposta proliferativa de células de retina ao ATP observada em nossos primeiros experimentos (figura 7) poderia ser devida ao aparecimento de fatores inibitórios em culturas mais diferenciadas. Com o objetivo de investigar se células mais diferenciadas da retina eram capazes de inibir a incorporação de [³H]-timidina induzida por ATP neste tecido, realizamos o cultivo de células de E7 (3×10^6 células) em conjunto com células de E9 (9×10^6 células). Na figura 9, podemos verificar que quando células de E7 foram incubadas com ATP por 24h, um aumento de ~186.5% na incorporação de [³H]-timidina foi observada (controle = 1650 ± 152.8 cpm/cultura; ATP = 4245 ± 850.2 cpm/cultura). Entretanto, nenhum aumento na incorporação de [³H]-timidina foi observado em culturas de células de E9 tratadas com ATP (controle = 1392.7 ± 143.7 cpm/cultura; ATP = 1408.5 ± 123.4 cpm/cultura) ou em células de E7 co-cultivadas com células de E9 (controle = 1650 ± 161.1 cpm/cultura; ATP = 1841 ± 130.8 cpm/cultura).

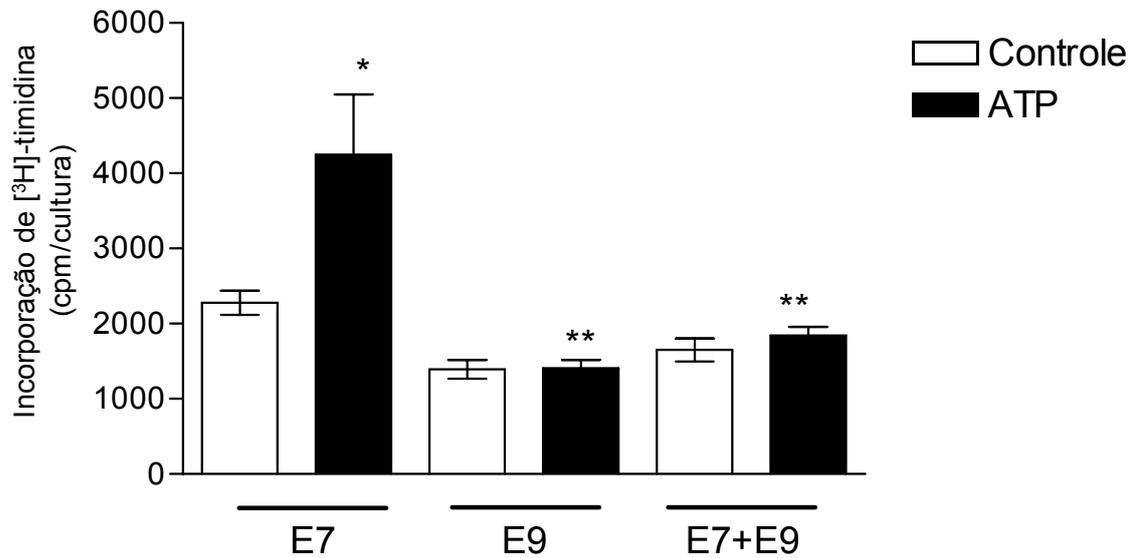


Figura 9- Incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em células de retinas de E7 cocultivadas com células de retinas de E9. Células de retinas de E7 (3×10^6 células) foram cultivadas com 9×10^6 células de retinas de E9 e tratadas ou não com ATP 0.1 mM, por 24 h. Após este período, a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina foi analisada. Os dados representam a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.01$ comparado com culturas de E7 tratadas ou não com ATP. ** $p < 0.001$ comparado com culturas de E7 tratadas com ATP.

Estes dados sugerem que populações celulares em estágios mais avançados do desenvolvimento sejam capazes de controlar a proliferação de progenitores retinianos induzida por nucleotídeos.

O efeito inibitório na síntese de DNA foi dependente da quantidade de células mais diferenciadas adicionadas às culturas (figura 10). Uma diminuição progressiva tanto na incorporação basal de [³H]-timidina quanto na incorporação estimulada por ATP foi observada quando células de E7 foram cultivadas com quantidades crescentes de células de E9. Enquanto ATP induziu um aumento de ~210% na incorporação de [³H]-timidina em culturas contendo 3×10^6 células de E7, o efeito deste nucleotídeo diminuiu para 131.7% e 135.2% quando a mesma quantidade de células de E7 foi cultivada, respectivamente, na presença de 9×10^6 (1:4) e 1.8×10^7 (1:7) células de E9. Além disto, a medida em que mais células de E9 foram adicionadas às culturas, a incorporação basal de [³H]-timidina também diminuiu, atingindo 41.7% dos níveis basais de células de E7 nas culturas contendo 1.8×10^7 células de E9.

O efeito inibitório de células mais diferenciadas sobre a incorporação de [³H]-timidina em células jovens poderia ser devido ao contato entre as células proliferantes e não proliferantes ou a ação inibitória de fatores liberados das células mais diferenciadas. Com o objetivo de distinguir entre estas duas possibilidades, analisamos o efeito de meios condicionados (MC) de culturas de células de retina em estágios mais avançados de desenvolvimento (figura 11). Nesta série de experimentos, células em E7C1 foram tratadas com meio condicionado de culturas de E8C2 por 24 h, na presença ou ausência de ATP 0.1mM.

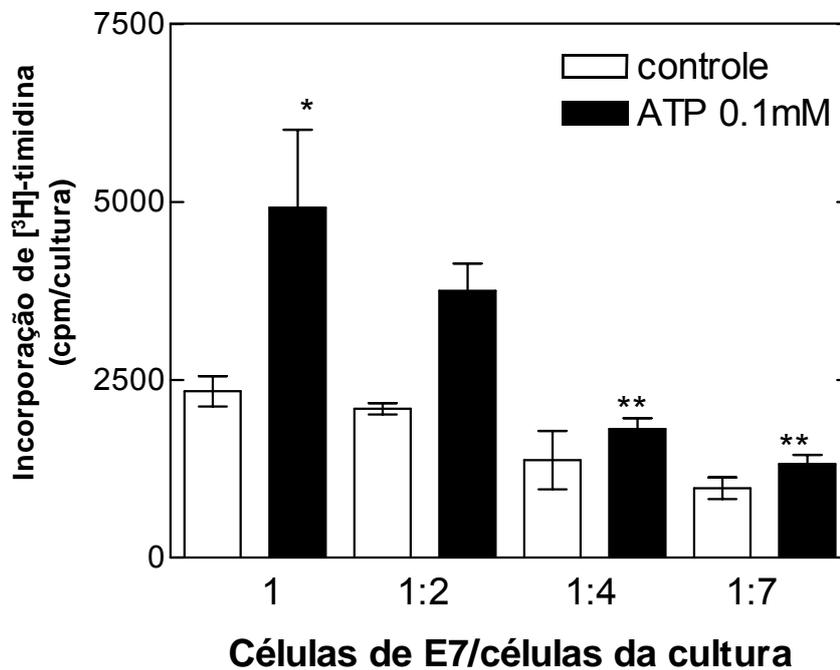


Figura 10- Incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em células de retinas de E7 em função da quantidade de células de retinas de E9 adicionadas à co-cultura. Células de retinas de E7 (3×10^6 células) foram co-cultivadas com 3×10^6 (1:2), 9×10^6 (1:4) ou 1.8×10^7 (1:7) células de E9, por 2 - 4 h. Após este período, ATP 0.1 mM foi adicionado e as células cultivadas por 24 h, quando então foram processadas para incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. Os dados representam a média \pm EPM de 6 a 8 culturas ensaiadas em 4 experimentos independentes. * $p < 0.01$ comparado com o controle. ** $p < 0.001$ comparado com o ATP em culturas de E7.

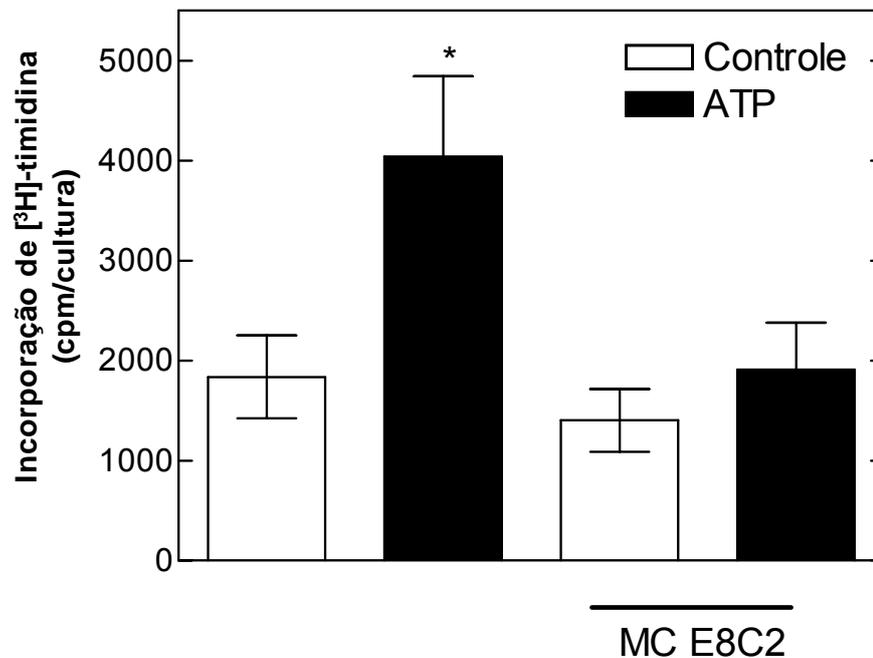


Figura 11- Efeito de meio condicionado (MC) de culturas de E8C2 na proliferação de células de retinas de E7. Culturas contendo 3×10^6 células de retinas de E7 foram estabelecidas e cultivadas em meio normal contendo 2% soro fetal bovino. Após 24 h, as culturas foram tratadas com ATP 0.1mM ou meio condicionado retirado de culturas de E8C2, diluído na proporção de 1:1 com meio fresco. Após mais 24 h, as culturas foram processadas para incorporação de [³H]-timidina. Os dados representam a média \pm EPM de 13 ou 14 culturas ensaiadas em 7 experimentos independentes. * $p < 0.05$ quando comparado com os valores de culturas controle ou culturas tratadas com MC e estimuladas com ATP.

Nenhuma diferença na incorporação basal de [³H]-timidina foi observada entre as culturas controle e as culturas tratadas com MC (1837.2 ± 414.9 cpm/cultura comparado com 1402.4 ± 313.5 cpm/cultura). Entretanto, o estímulo na incorporação de [³H]-timidina induzido por ATP diminuiu de 220% nas culturas não tratadas com MC para 136.2% dos níveis basais em culturas tratadas com MC (de 4044.2 ± 799.1 cpm/cultura para 1911 ± 471.1 cpm/cultura).

O efeito inibitório dos meios condicionados de culturas mais diferenciadas (E8C2) foi dependente de sua dose adicionada às culturas de E7C1 (figura 12). Atenuação máxima na resposta das células ao ATP foi observada com 1 mL ou doses maiores de MC. A incorporação basal de [³H]-timidina também foi afetada pela adição de MC e uma diminuição máxima de aproximadamente 50% foi observada com volumes iguais ou maiores do que 0.5 mL de MC. Em todos os experimentos subsequentes, 1 mL de MC + 1 mL de meio fresco (diluição de 1:1) por cultura foram utilizados .

A presença de fatores inibitórios da proliferação celular em meios condicionados de culturas mais diferenciadas poderia ser fruto apenas da situação artificial que é o cultivo de células em presença de soro fetal bovino, um componente de cultivo variável que poderia induzir as células a produzir e liberar tais fatores. Para descartar esta hipótese, células de E7C2 foram tratadas com meio condicionado de E8C8 produzido na ausência de soro fetal bovino 2% e estimuladas com ATP 0,1mM, por 24h.

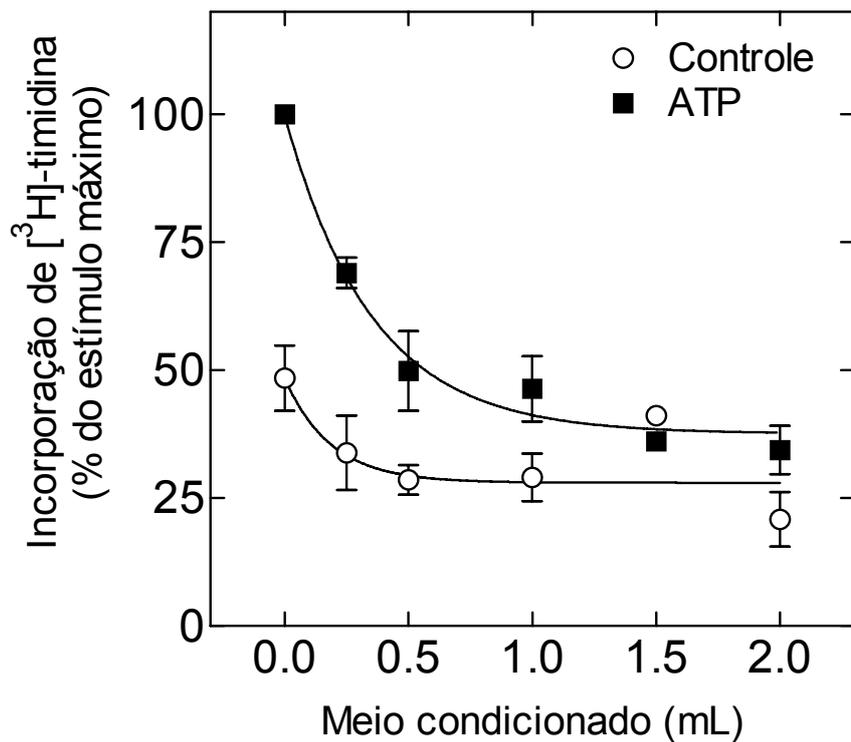


Figura 12- Efeito de concentrações crescentes de MC de culturas mais diferenciadas sobre a incorporação de [3H]-timidina em culturas de E7. Culturas de células de retina de E7 foram estabelecidas como descrito em Materiais e Métodos. Após 24 h de cultivo, o meio foi substituído por doses crescentes de MC de culturas de E8C2, diluídos ou não em meio fresco. As culturas foram então incubadas por mais 24 h na presença ou não de ATP 0.1 mM e processadas para incorporação de [3H]timidina. Os valores representam a média \pm EPM de 2 ou 3 experimentos realizados em duplicata.

Como pode ser observado na figura 13, meios condicionados produzidos na ausência de soro resultaram na mesma diminuição da incorporação de [³H]-timidina que os meios produzidos com soro 2%, sugerindo que o efeito do meio condicionado seja independente da presença ou não de soro durante a sua obtenção.

Tendo em vista que o efeito dos meios condicionados não era fruto apenas do cultivo das células em presença de soro durante a sua obtenção, formulamos a hipótese de que o amadurecimento das células seria um fator determinante no aparecimento da atividade inibitória destes meios. Para investigar esta possibilidade, culturas foram estabelecidas usando 1×10^7 células de retinas de embriões com 7, 8 e 9 dias de desenvolvimento embrionário. Os meios condicionados por 24 h foram obtidos no segundo dia após o início das culturas. As figuras 14A e 14B mostram, respectivamente, o efeito dos meios condicionados obtidos de embriões com idades crescentes sobre a incorporação de [³H]-timidina basal e estimulada com ATP em culturas em E7C2. Como pode ser observado, a medida em que embriões mais velhos foram utilizados, um aumento progressivo na inibição da incorporação de [³H]-timidina foi obtido. Meios preparados com embriões de 8 ou mais dias induziram uma diminuição de ~40% e ~60% na incorporação de [³H]-timidina basal e estimulada por ATP, respectivamente. Esta inibição se manteve igualmente alta quando os meios condicionados foram obtidos de células cultivadas até o 8º dia (E8C8). Uma diminuição semelhante na incorporação de [³H]-timidina induzida por ATP também foi obtida com o tratamento das células com MC obtido de culturas purificadas de células gliais.

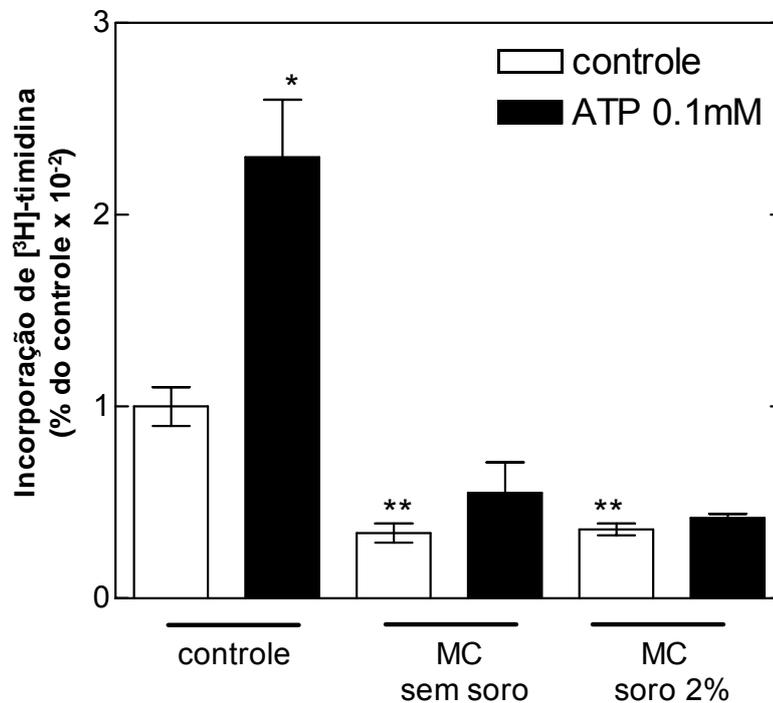


Figura 13- Efeito de MC de culturas de E8C8 produzido na ausência de soro fetal bovino sobre a incorporação de [3H]-timidina de culturas de E7C2. Após 24 h de cultivo, o meio de culturas de células de retinas de E7 foi substituído por meios condicionados de culturas de E8C8 obtidos na presença ou ausência de 2% de soro fetal bovino. Após mais 24h de cultivo, as células foram processadas para a incorporação de [3H]-timidina. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.001$ quando comparado com valores obtidos em culturas controle ou tratadas com MC+ATP. ** $p < 0.05$ quando comparado com valores obtidos em culturas controle ou tratadas com MC.

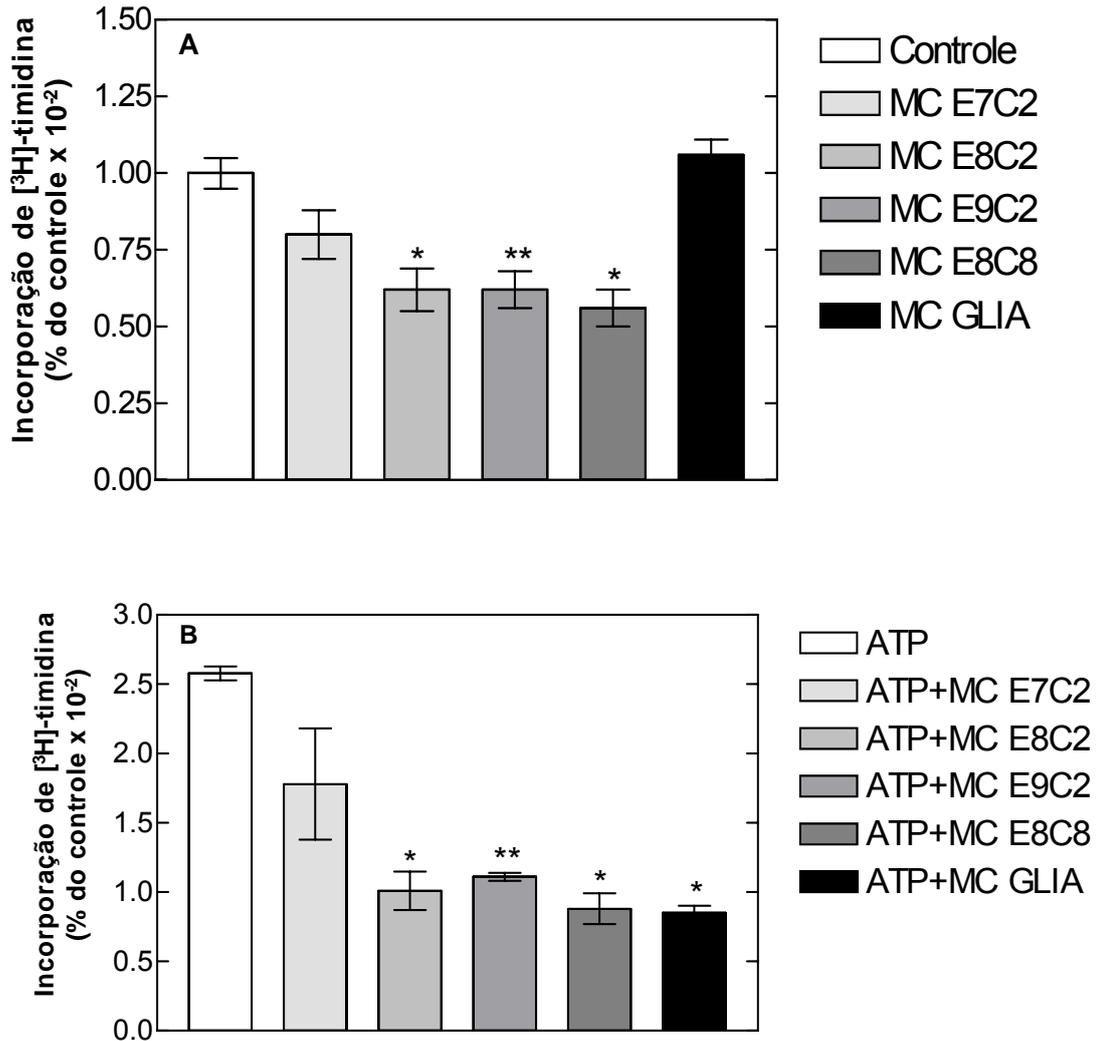


Figura 14- Inibição na incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina basal (A) e estimulada por ATP (B) induzida por MCs de culturas preparadas com células de retinas de embriões com idades crescentes. Os meios condicionados foram obtidos no segundo dia de cultivo de culturas contendo 10^7 células/placa e preparadas a partir de embriões com 7, 8 ou 9 dias. O efeito de MC de culturas em E8C8 ou E8C15 enriquecidas em glia também foi determinado. Os dados representam a média \pm EPM de 3 a 5 experimentos independentes realizados em duplicata. Em (A), * $p < 0.001$ e ** $p < 0.05$ comparados às culturas não tratadas com MC. Em (B), * $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$ comparados aos níveis estimulados com ATP em culturas não tratadas com MC.

Entretanto, este meio não foi capaz de alterar a proliferação basal das culturas, sugerindo que a presença de neurônios seja necessária para a produção e/ou liberação de fatores com atividade inibitória da proliferação celular.

Variações no microambiente químico celular podem induzir diminuição na proliferação celular e indução de determinados fenótipos em células progenitoras após sua última mitose (Altshuler et al., 1991; Harris, 1991; Reh, 1991). Para investigar um possível papel do meio condicionado na saída das células proliferantes do ciclo e na diferenciação celular, realizamos os tratamentos das células como descrito anteriormente e observamos se o efeito inibitório causado pelo meio condicionado era reversível. A figura 15 mostra o efeito da retirada de MC de culturas mais diferenciadas (E8C8) sobre a incorporação de [³H]-timidina em culturas de células de retina de E7. Após 4h do início do cultivo, o meio das culturas foi substituído por MC de E8C8 obtidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 24h, este meio foi removido e as células cultivadas por mais 24 h em meio fresco. O tratamento com ATP 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. A retirada de MC seguida por cultivo das células em meio fresco reverteu a inibição na incorporação de [³H]-timidina causada pelo MC tanto em culturas controle quanto estimuladas com ATP. Enquanto a resposta induzida por ATP diminuiu para níveis controle quando as células foram tratadas com MC nas últimas 24 h ou durante todo o período estudado ($108.7 \pm 22.5\%$ e $64.3 \pm 19.8\%$, respectivamente), tanto a incorporação basal de [³H]-timidina quanto a estimulada por ATP aumentaram

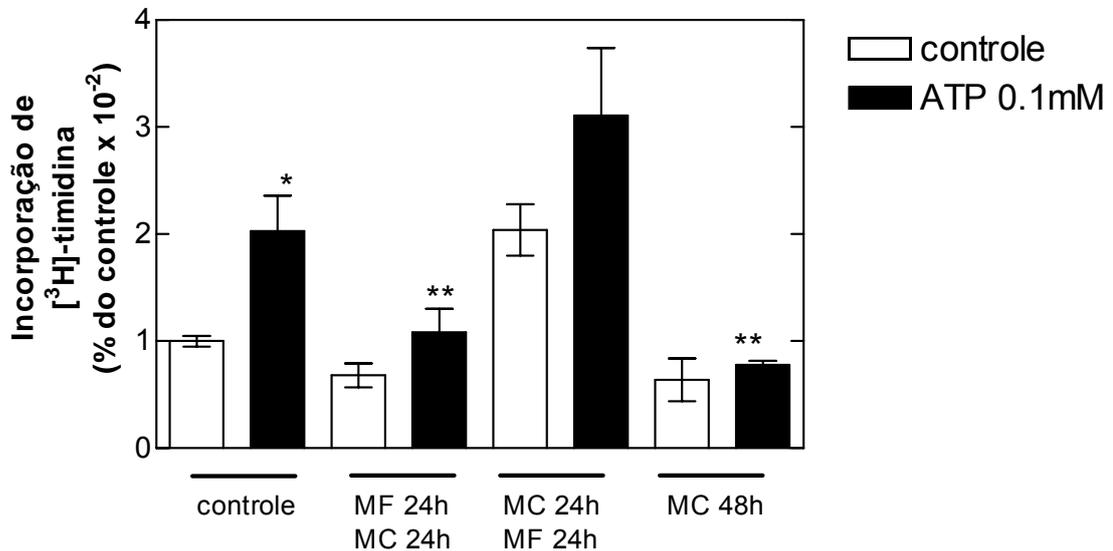


Figura 15- Efeito da retirada do MC de culturas mais diferenciadas sobre a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em culturas de células de retina de E7. Culturas de células de retina de E7 foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 4 h do início do cultivo, o meio das culturas foi substituído por MC de culturas de E8C8. Após 24 h, o MC foi removido e as culturas incubadas por mais 24 h em meio fresco. O tratamento com ATP 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. Os dados representam a média \pm EPM de 3 a 6 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.01$ comparado com os níveis controle sem tratamento com MC e ** $p < 0.001$ comparado com os níveis estimulados com ATP de culturas não tratadas com MC no segundo dia.

significativamente quando o MC foi adicionado no início das culturas e removido após 24 h ($204.3 \pm 24.3\%$ e $311.0 \pm 63\%$, respectivamente). Estes dados sugerem que o tratamento com MC de E8C8 não seja capaz de induzir mudanças no perfil de diferenciação das células retinianas durante as primeiras 24h de tratamento. Entretanto, nenhuma análise com marcadores específicos para diferenciação celular foi realizada.

Dyer e Cepko (2001) sugeriram que a proliferação celular na retina seria regulada pela população de células que já abandonaram o ciclo celular e iniciaram a diferenciação. Dados prévios do nosso grupo sugeriram fortemente que células gliais eram as células afetadas por ATP (Sanches et al., 2002). Com o objetivo de estudar qual seria o tipo celular responsável pelo efeito inibitório do MC sobre a incorporação de [³H]-timidina, resolvemos tratar as retinas com meio MC obtido de culturas purificadas de glia (figura 16). Após 4h do início do cultivo, o meio das culturas foi substituído por MC de culturas de glia obtidas como descrito anteriormente (Cossenza e Paes de Carvalho, 2000). Após 24h, este meio foi removido e as células cultivadas por mais 24 h em meio fresco. O tratamento com ATP 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. A retirada de MC seguida por cultivo de células em meio fresco reverteu a inibição na incorporação de [³H]-timidina causada pelo MC de glia somente nas culturas estimuladas com ATP. Incubação das células com MC durante as últimas 24 h ou durante 48 h, diminuiu a incorporação de [³H]-timidina induzida por ATP 0.1 mM ($85.1 \pm 5.45\%$ e $80.4 \pm 5.87\%$ dos níveis basais de culturas não tratadas, respectivamente). Entretanto, a incubação de células com MC no primeiro dia seguido por troca por meio fresco no segundo dia

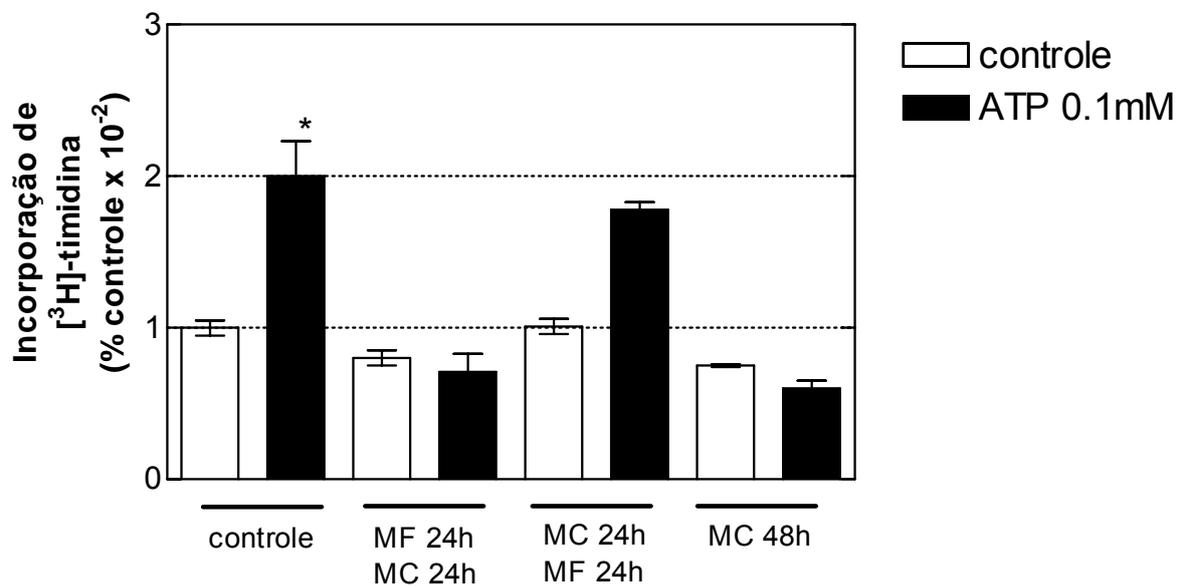


Figura 16- Efeito de MC de culturas purificadas de células glias sobre a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em culturas de células de retina de E7. Após 4h do início do cultivo, o meio das culturas foi substituído por MC de culturas de células glias obtidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 24h, este meio foi removido e as células cultivadas por mais 24 h em meio fresco. O tratamento com ATP 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. Os dados representam a média \pm EPM de 4 a 6 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.001$ comparado com os níveis controle sem tratamento com MC e ** $p < 0.01$ comparado com os níveis estimulados com ATP de culturas não tratadas com MC no segundo dia.

e cultivo resultou em um aumento tanto na incorporação basal de [³H]-timidina quanto na estimulada por ATP (controle= $1,00 \pm 0,05$; n= 6; ATP= $2,00 \pm 0,23$; n= 4, MF/MC= $0,80 \pm 0,05$; n= 4; MF/MC+ATP= $0,71 \pm 0,12$; n= 5; MC/MF= $1,01 \pm 0,05$; n= 3; MC/MF+ATP= $1,78 \pm 0,05$; n= 3; MC 48h= $0,75 \pm 0,01$; n= 3; MC+ATP 48h= $0,60 \pm 0,05$; n= 3. % estímulo comparados ao controle).

Sanches et al. (2002) utilizando retina de embriões de pinto com 8 dias demonstraram que a ativação de receptores P2 por ATP induzem o acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos ([³H]-InsPs) em cultura. Tendo em vista que a resposta proliferativa ao ATP diminuía com o tempo em cultura, um efeito que era mimetizado pela incubação de células proliferantes com MC de células mais diferenciadas, resolvemos analisar o efeito de MC sobre o acúmulo de [³H]-InsPs induzido por ATP nas culturas (figura 17). Culturas em E7C2 foram pré-incubadas com MC de culturas E8C8 por 24 h e estimuladas com ATP na ausência ou presença de PPADS 0.1 mM, um antagonista de receptores P2. A incubação de células com MC de E8C8 foi capaz de diminuir a formação de [³H]- InsPs induzida por ATP de 220 ± 27 % para 116 ± 26 % do acúmulo basal de [³H]-InsPs. Já a formação basal [³H]-InsPs não foi significativamente afetada (83 ± 14 % dos níveis basais). Além disso, o tratamento das culturas com o antagonista PPADS foi capaz de bloquear completamente o efeito inibitório do MC sobre o acúmulo de [³H]-InsPs induzido por ATP (226.0 ± 18 % dos níveis basais), sugerindo que o meio condicionado contenha moléculas capazes de modular a função dos receptores P2 em nossas culturas.

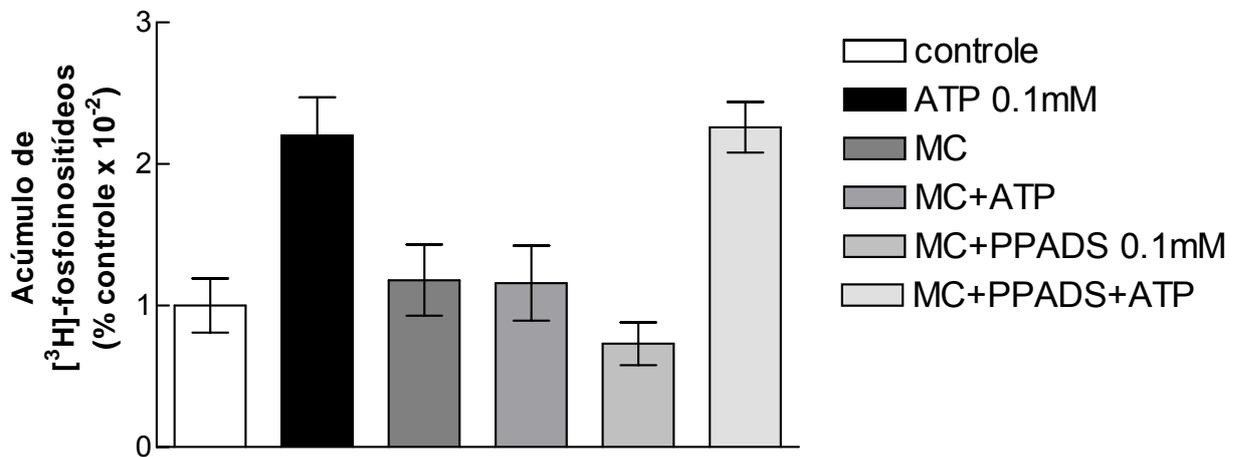


Figura 17- Efeito do MC sobre o acúmulo de [3H]-fosfoinosítídeos em culturas de células de retina em E7. As culturas foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 24h, o meio das culturas foi removido e MC de culturas em E8C8, contendo ou não PPADS 0.1 mM, foi adicionado. Após mais 24 h de cultivo, o MC foi retirado e as culturas estimuladas com ATP 0.1 mM e processadas para o acúmulo de [3H]-fosfoinosítídeos. Os dados representam a média \pm EPM de 3 a 4 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.01$ versus os níveis controle e os níveis estimulados com ATP de culturas tratadas com MC na ausência de PPADS. ** $p < 0.01$ comparado com culturas incubadas com ATP e tratadas com MC sem PPADS.

Com a finalidade de investigar se uma dessensibilização de receptores P2 induzida por agonista seria a responsável pela ausência de efeito proliferativo induzido por ATP nas culturas tratadas com MC, resolvemos analisar o efeito de meios condicionados dialisados em membranas permeáveis somente à moléculas < do que 12 KDa sobre a incorporação de [³H]-timidina (figura 18). Nenhuma diferença significativa na diminuição da incorporação basal de [³H]-timidina induzida pelo MC foi observada devido à diálise do MC e uma diminuição de 57,15% (controle= 2387,33 ± 331,78 para MCD= 1023 ± 171,46 cpm/cultura) foi observada nesta condição. Além disto, a diálise do MC não foi capaz de restaurar a respostas das células ao ATP e uma diminuição de 66,79% (ATP= 4724,25 ± 443,64 para MCD+ATP= 1587,28 ± 254,5 cpm/cultura) na incorporação de [³H]-timidina foi observada quando as células foram tratadas com 0.1 mM de ATP.

Com base nos resultados acima, resolvemos investigar o efeito do antagonista PPADS sobre a diminuição da incorporação basal de [³H]-timidina induzida pelo tratamento com MC de culturas mais diferenciadas. Na figura 19 culturas de células de retinas de E7 foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 4h do início do cultivo, o meio das culturas foi substituído por MC de E8C8. Após 24h, este meio foi removido e as células cultivadas por mais 24 h em meio fresco. O tratamento com PPADS 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. A retirada de MC seguida por cultivo das células em meio fresco reverteu a inibição na incorporação de [³H]-timidina causada pelo MC tanto no controle quanto no tratado com PPADS, fazendo com que as células voltassem a incorporar [³H]-timidina. A síntese de DNA não foi alterada pelo uso de PPADS, nem no controle, nem nas

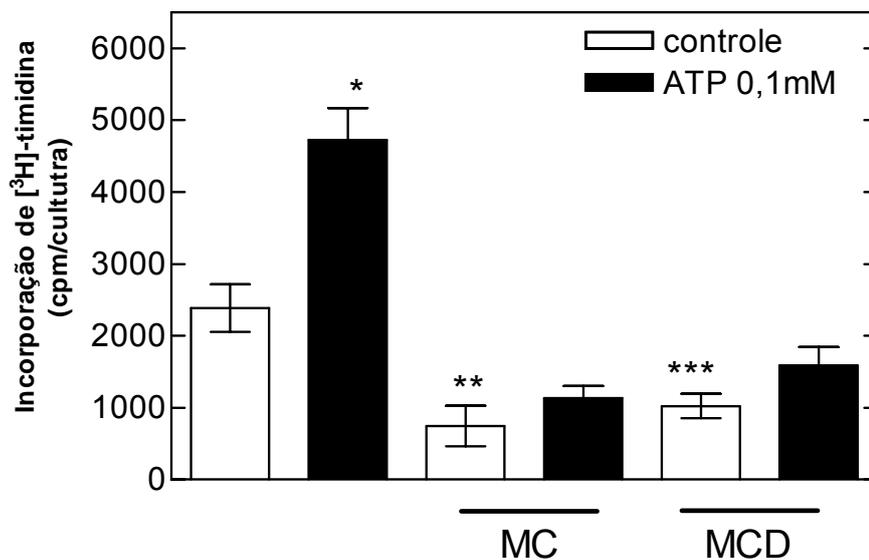


Figura 18- Efeito de MC previamente dializado sobre a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina em culturas de células de retina em E7. As culturas foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 24 h, o meio das culturas foi removido e MC de culturas em E8C8, dializado ou não em membranas permeáveis à moléculas menores do que 12 KDa foi adicionado. Após mais 24 h de cultivo, o MC foi retirado e as culturas processadas para a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. O tratamento com ATP 0.1 mM foi realizado durante o segundo dia de cultivo. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em duplicata ou triplicata * $p < 0.001$ versus os níveis controle ou estimulados com ATP de culturas tratadas com MC. ** $p < 0.05$ comparado com níveis controle de culturas tratadas com MC não dializado.

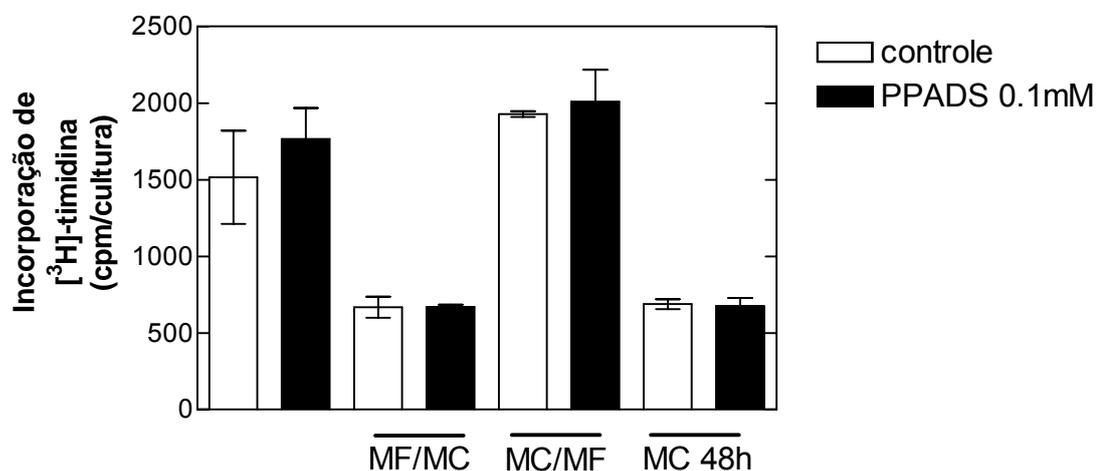


Figura 19- Efeito do antagonista PPADS sobre a diminuição da incorporação basal de $[^3\text{H}]$ -timidina induzida pelo tratamento com MC de culturas mais diferenciadas. Culturas de células de retinas de E7 foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 4 h, o meio foi retirado, MC de culturas de E8C8 foi adicionado e as células cultivadas por mais 24 h na presença ou não de PPADS 0.1 mM. Ao final deste período, as culturas foram processadas para a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina. Os dados representam a média \pm EPM de 1 experimento realizado em triplicata.

culturas tratadas com MC. Este resultado em conjunto com a redução no acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos sugere que o MC possui efeito na diminuição da incorporação de [³H]-timidina independente da ativação de receptores purinérgicos.

Com o objetivo de investigar uma possível via de transdução de sinal envolvida na inibição da incorporação de [³H]-timidina induzida pelo MC, analisamos preliminarmente o efeito dos antagonistas para receptores tirosina cinase genisteína e herbimicina A sobre a inibição do MC (figura 20). Culturas de células retinianas de E7 foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 24 h de cultivo, o meio de cultura foi substituído por MC de culturas de E8C8 e as células cultivadas por mais 24 h na presença ou não de ATP 0.1mM, Genisteína 10 μ M (A) ou Herbimicina A 1ng/mL (B). Ao final deste período, as culturas foram processadas para a incorporação de [³H]-timidina. Os inibidores utilizados não foram capazes de reverter o efeito inibitório do MC na incorporação de [³H]-timidina induzida ou não por ATP, sugerindo que o (s) fator (es) liberado (s) por células mais diferenciadas não utilizam vias de transdução de sinal envolvendo receptores tirosinas cinases.

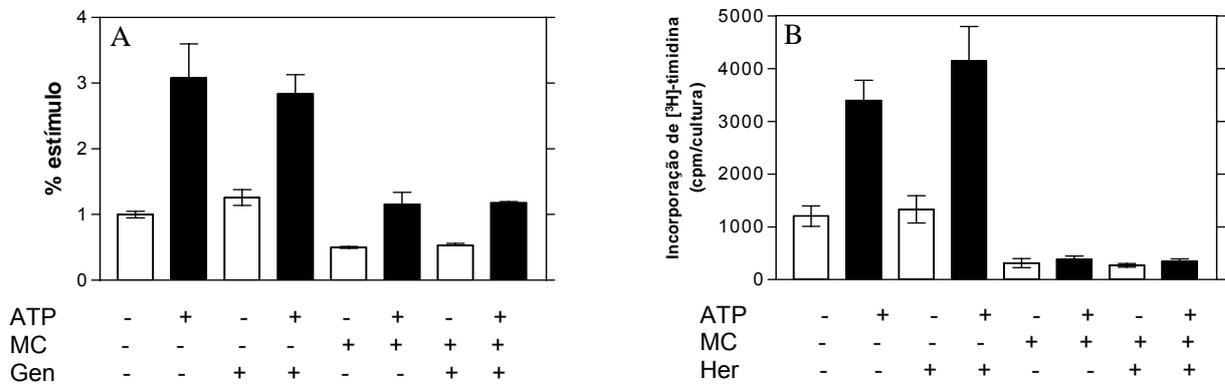


Figura 20- Efeito de inibidores de tirosina cinases sobre a diminuição na incorporação de [³H]-timidina induzida pelo tratamento das culturas com MC. Culturas de células de retinas de E7 foram estabelecidas como descrito nos Materiais e Métodos. Após 4 h, o meio foi retirado, MC de culturas de E8C8 foi adicionado e as células cultivadas por mais 24 h na presença ou não de ATP 0.1mM, Genistina 10 μ M (A) ou Herbimicina A 1ng/mL (B). Ao final deste período, as culturas foram processadas para a incorporação de [³H]-timidina. Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos realizado em duplicata (A) e 1 experimento realizado em duplicata (B).

Discussão

Neste trabalho, nós mostramos que a incorporação de [³H]-timidina diminui durante o desenvolvimento da retina embrionária de pinto “*in vitro*”, tanto em condições basais quanto estimuladas por ATP. A diminuição da atividade proliferativa da retina durante o desenvolvimento foi mostrada na retina intacta de roedores (Young, 1985; Alexiades e Cepko, 1996; Close *et al.*, 2005) e na retina embrionária de pinto (Prada *et al.*, 1991). Embora a proliferação celular seja observada na retina de pinto pós-eclosão, submetidas ou não a tratamento tóxico com NMDA (Fisher e Reh, 2001), nossos dados revelam que a retina de E7 cultivada por 4 dias não apresenta nenhuma resposta proliferativa ao ATP, sugerindo que este efeito esteja envolvido com mecanismos restritos a uma janela específica do desenvolvimento da retina em cultura. Este resultado está de acordo com dados recentemente publicados pelo nosso grupo, que mostram que o efeito mitogênico do ATP foi observado somente quando as retinas foram obtidas de embriões com idade compreendidas entre o 6^o e o 9^o dia de desenvolvimento (Sanchez *et al.*, 2002). Além disso, uma vez que na retina embrionária intacta mais de 80% das células já abandonaram o ciclo celular no 9^o dia de desenvolvimento (Prada *et al.*, 1991) e que nenhum efeito do ATP foi observado após 4 dias de cultivo, nossos resultados também sugerem que o tratamento das células com ATP esteja aumentando a incorporação de [³H]-timidina em células que estão no ciclo celular e não induzindo células quiescentes a re-entrar no ciclo celular.

Tendo em vista que os principais tipos celulares que proliferam no período compreendido entre o 7^o e o 8^o dia embrionário são células bipolares

e células gliais de Müller (Prada *et al.*, 1991), resolvemos estudar qual população celular da retina era estimulada pelo ATP. Utilizando microscopia confocal e anticorpos contra BrdU, um análogo químico da timidina, observamos que os núcleos das células marcadas com BrdU, tratadas ou não com ATP, apresentaram morfologia nuclear glial. Além disso, as culturas tratadas com ATP apresentaram mais núcleos marcados para BrdU. Este resultado está de acordo com dados recentemente publicados por Moll *et al.*, 2002 e Milenkovic *et al.*, 2003 que mostram que o ATP aumenta a síntese de DNA em células gliais da retina de hamster em cultura. Assim, nossos dados indicam que o ATP poderia estar estimulando a proliferação de células gliais da retina de pinto em cultura ou de seus precursores.

Nós mostramos também que embriões mais velhos, ou meios condicionados de culturas obtidas de retinas de embriões mais velhos, reduzem a proliferação celular na retina. Na figura 10, nós mostramos que quantidades crescentes de células mais velhas adicionadas a cultura foi capaz de diminuir a proliferação de células mais jovens. Porém, este resultado tornou-se inconclusivo, pois o efeito inibitório da proliferação poderia ser advindo de uma inibição de contato proporcionada pelo aumento na quantidade de células na cultura e não pelo contato com populações de células mais velhas que poderiam influenciar negativamente a síntese de DNA em células de estágios mais precoces do desenvolvimento. Assim, para descartar esta hipótese, resolvemos estudar o efeito de meios condicionados obtidos de culturas de células mais diferenciadas. Neste caso, nenhuma alteração na densidade de células da cultura seria produzida. Meios condicionados de culturas de retinas em E8 cultivadas por 2 ou mais dias

foram capazes de inibir a proliferação de células em estágio precoces do desenvolvimento (figura 11), sendo este efeito dependente da dose de MC adicionado (figura 12). Além disso, este efeito era reversível e a incorporação de [³H]-timidina em ambas as condições, controle e estimulada com ATP, eram aumentadas quando o MC era removido das culturas (figuras 15 e 16). Este resultado diminui a possibilidade de que o efeito do MC seja devido à morte de células em nossas culturas, sugerindo que elas permaneçam viáveis nos períodos analisados. Este resultado também diminui a possibilidade de que esteja ocorrendo indução de diferenciação celular durante as 24h de exposição ao MC, pois se essas células voltam a incorporar [³H]-timidina, provavelmente ainda não estão comprometidas a se tornar algum tipo celular específico, a ponto de interromper seu ciclo de mitoses. É possível que este tratamento provoque o arresto destas células no ciclo, que pode estar, por sua vez, ocasionando um acúmulo de células na fase G1. A retirada do meio condicionado poderia então, provocar o retorno das células à fase S do ciclo celular de forma sincronizada, o que poderia justificar o aumento da incorporação de [³H]-timidina acima dos níveis basais em células não estimuladas com ATP e que tiveram o MC retirado (figura 15).

O efeito do meio condicionado foi dependente do estágio do desenvolvimento da retina utilizada para a obtenção do meio condicionado. A diminuição da incorporação de [³H]-timidina atingiu níveis máximos utilizando MC de E8C2 (figura 14). Utilizando culturas de embriões mais velhos (E9C2) ou células cultivadas por períodos de tempo maiores (E8C8), a inibição da incorporação de [³H]-timidina permaneceu igualmente alta. Uma vez que, a maioria dos tipos de neurônios da retina já se tornaram pós-mitóticos em E9

(Prada *et al.*, 1991), torna-se razoável sugerir que fatores liberados de células pós-mitóticas sejam os responsáveis pelo arresto das células que estão proliferando em nossas culturas. Além disso, uma vez que a atenuação dos níveis basais da incorporação de [³H]-timidina foi observada com MC obtido de culturas mistas, ou seja, que continham tanto neurônios quanto células gliais, mas não com MC de culturas purificadas de glia, provavelmente o(s) fator(es) que causa(m) o arresto do ciclo celular em nossas culturas provém de neurônios ou de células gliais sob a influência de neurônios. Já um efeito inibitório pode ser obtido em culturas tratadas com ATP utilizando meios condicionados de ambas as culturas mistas ou purificadas de glia, indicando que células gliais possam liberar fatores que regulem apenas a resposta mitogênica induzida pelo ATP.

Newman (2001) mostrou que células gliais liberam ATP em cultura e que esta liberação pode ativar ondas de cálcio nestas células. Além disso, Sugioka *et al.* (1999) mostraram que culturas de células da retina de pinto mantidas por 24h acumulam ATP no meio extracelular. Assim, um possível mecanismo para explicar a diminuição da incorporação [³H]-timidina induzida por ATP em culturas tratadas com MC seria o acúmulo de ATP no meio condicionado e a indução de dessensibilização de receptores P2 responsáveis pelo aumento de síntese de DNA em nossas culturas. De fato, nós observamos uma redução no acúmulo de [³H]-fosfoinositídeos induzido pela estimulação com ATP em culturas tratadas com MC, um efeito que foi bloqueado pelo antagonista de receptores P2 PPADS (figura 17). Porém, a diálise do MC utilizando uma membrana permeável apenas à moléculas menores do que 12 KDa, não proporcionou uma atenuação do efeito inibitório

do MC sobre a incorporação [³H]-timidina. Além disso, PPADS não foi capaz de reverter o efeito inibitório do meio condicionado na incorporação de [³H]-timidina em culturas não tratadas com ATP (figura 19), sugerindo que, embora a dessensibilização dos receptores P2 induzida pelo tratamento das culturas com MC ocorra em nossas culturas, o acúmulo de ATP no MC não deve ser o fator responsável ou único envolvido na redução da proliferação celular em nossas culturas.

Nossos dados mostraram que a diálise do MC não diminui a incorporação [³H]-timidina induzida pelo MC, descartando a possibilidade de que o acúmulo de ATP no meio induza a diminuição da incorporação de [³H]-timidina em células em estágios precoces do desenvolvimento. Porém, estas observações não excluem a possibilidade de que o MC tenha diminuído a incorporação [³H]-timidina pela liberação de fatores maiores do que 12 KDa que induzam a liberação de ATP e causem a dessensibilização de receptores P2 dependente do agonista observada em nosso estudo. Pearson *et al.* (2005) mostraram que o aumento espontâneo de Ca⁺⁺ podia induzir a liberação de ATP do epitélio pigmentar através de hemicanais de conexina-43. O ATP liberado então podia acelerar a divisão e proliferação celular na retina neural. Por outro lado, Cotrina *et al.*, 1998, mostraram que nucleotídeos induzem a liberação de ATP por hemicanais de conexina em culturas de astrócitos, uma resposta que promove a dessensibilização do receptor P₂Y e inibição da sinalização celular mediada por cálcio. Close *et al.*, (2005) propuseram que os níveis de proliferação na retina em desenvolvimento sejam determinados pelo balanço entre fatores pró-mitóticos e fatores anti-mitóticos. Neste estudo, este grupo mostrou que a liberação de TGFβ de

neurônios da retina de rato diminui a proliferação de progenitores e células gliais em cultura. Como alguns fatores de crescimento como TGF β e CNTF são capazes de aumentar a expressão de conexina-43 em células endoteliais e em astrócitos, respectivamente (Larson *et al.*, 1997; Ozog *et al.*, 2004) e que as células de Müller de vários animais, como peixe e coelho, expressam a conexina-43 (Ball e McReynolds, 1998; Johansson e Ehinger, 1999), seria plausível sugerir que células pós-mitóticas da retina de embrião de pinto possam liberar fatores que modulem a expressão de moléculas como a conexina-43 e aumentem a liberação de ATP nas culturas.

Na figura 20, nós mostramos que a genisteína e a herbimicina A, inibidores tirosina cinase, não inibiram o efeito do meio condicionado na proliferação, induzida ou não pelo ATP. Como a ativação de receptores para TGF β requer a fosforilação de resíduos serina/treonina, este resultado reforça a hipótese de que o TGF β poderia estar participando de fenômenos inibitórios para a proliferação celular durante o desenvolvimento da retina de pinto. Assim, estes resultados em conjunto com os dados recentemente publicados por Close *et al.*, (2005), sugerem que fatores anti-mitóticos como o TGF β , poderiam, além de inibir diretamente o ciclo celular de células proliferantes durante o desenvolvimento da retina, induzir a diminuição do efeito mitogênico de moléculas como o ATP através da dessensibilização de seus receptores, o que reforçaria a saída de células proliferantes do ciclo celular. A participação do TGF β (ou outros fatores) na dessensibilização de receptores purinérgicos P2 ou na diminuição da resposta mitogênica ao ATP em culturas de células de retina será investigada nas próximas etapas deste trabalho.

Conclusões

- ATP estimula a proliferação de células com morfologia glial da retina embrionária de pinto em cultura.
- Este efeito ocorre apenas até o quarto dia de cultivo, sugerindo que apenas células em estado proliferativo são responsivas ao ATP. Estas evidências também sugerem que células que abandonaram o ciclo celular não sejam capazes de retornar ao ciclo mitótico por estímulo do ATP.
- O cultivo de células jovens na presença de células de estágios mais avançados do desenvolvimento inibe, de maneira dependente da quantidade de células mais diferenciadas, a proliferação celular induzida por ATP.
- Células mais diferenciadas são capazes de diminuir a proliferação de células mais jovens em cultura através da liberação de fatores solúveis > 12 KDa. Este efeito é reversível, dependente da dose de meio condicionado utilizada e do estágio de maturação da retina utilizada para obtenção dos meios condicionados. Estas observações sugerem que a diferenciação das células da retina induza a liberação de fatores anti-mitóticos capazes de inibir a proliferação celular neste tecido.
- O meio condicionado de culturas mais diferenciadas é capaz de inibir o acúmulo de derivados fosforilados de [³H]-inositol induzido por ATP. Este efeito é revertido pelo antagonista purinérgico PPADS, sugerindo que este meio induza a dessensibilização de receptores purinérgicos P2 nas culturas.
- Meio condicionado obtido de culturas mistas é capaz de inibir a proliferação basal e estimulada por ATP. Porém, o meio condicionado obtido de culturas purificadas de células gliais inibe somente a proliferação celular induzida por ATP. Além disto, a incubação das células com o antagonista PPADS não

reverte o efeito inibitório do meio condicionado na proliferação basal. Estes dados em conjunto sugerem que os fatores responsáveis pela inibição da proliferação celular em células de retina em cultura sejam liberados de neurônios ou células gliais sob a influência de neurônios.

- O efeito inibitório do meio condicionado é independente da ativação de tirosina cinases, sugerindo que seja mediado por fatores que estimulem receptores distintos de receptores tirosina cinases.

Com base nos dados obtidos neste trabalho e nas conclusões listadas acima, resolvemos postular uma hipótese para a regulação da proliferação glial na retina embrionária de pinto (figura 21). Cabe ressaltar que a participação de alguns elementos citados ainda é especulativa e será investigada em experimentos futuros.

Nesta hipótese, postulamos que durante o desenvolvimento da retina, as células vão se comprometendo a se tornar um fenótipo celular específico. As células de Müller que já se tornaram pós-mitóticas estariam sendo influenciadas por neurônios a liberar fatores solúveis capazes de controlar a proliferação de células de Müller mais jovens. Assim, durante o período compreendido entre o 7° e o 9° dia de desenvolvimento embrionário, as células de Müller estariam respondendo ao ATP e aumentando sua população. Porém, durante o desenvolvimento, as células perderiam gradativamente a capacidade de responder ao estímulo mitogênico do ATP. Um possível fator inibitório que poderia estar sendo liberado das culturas de células mais diferenciadas e que poderia ser o responsável por esse efeito seria o TGF β . Neste cenário, este fator estaria inibindo o ciclo celular por induzir a ativação de vias de sinalização que favorecem a diferenciação

celular ou por inibir as vias de sinalização que favorecem a proliferação celular. Ao mesmo tempo, este fator poderia induzir a liberação de quantidades de ATP suficientes para causar a dessensibilização de receptores P2Y1 envolvidos na resposta mitogênica do ATP. Desta forma, o arresto do ciclo celular estaria sendo favorecido pela inativação da sinalização pró-mitótica em conjunto com o aumento da sinalização anti-mitótica.

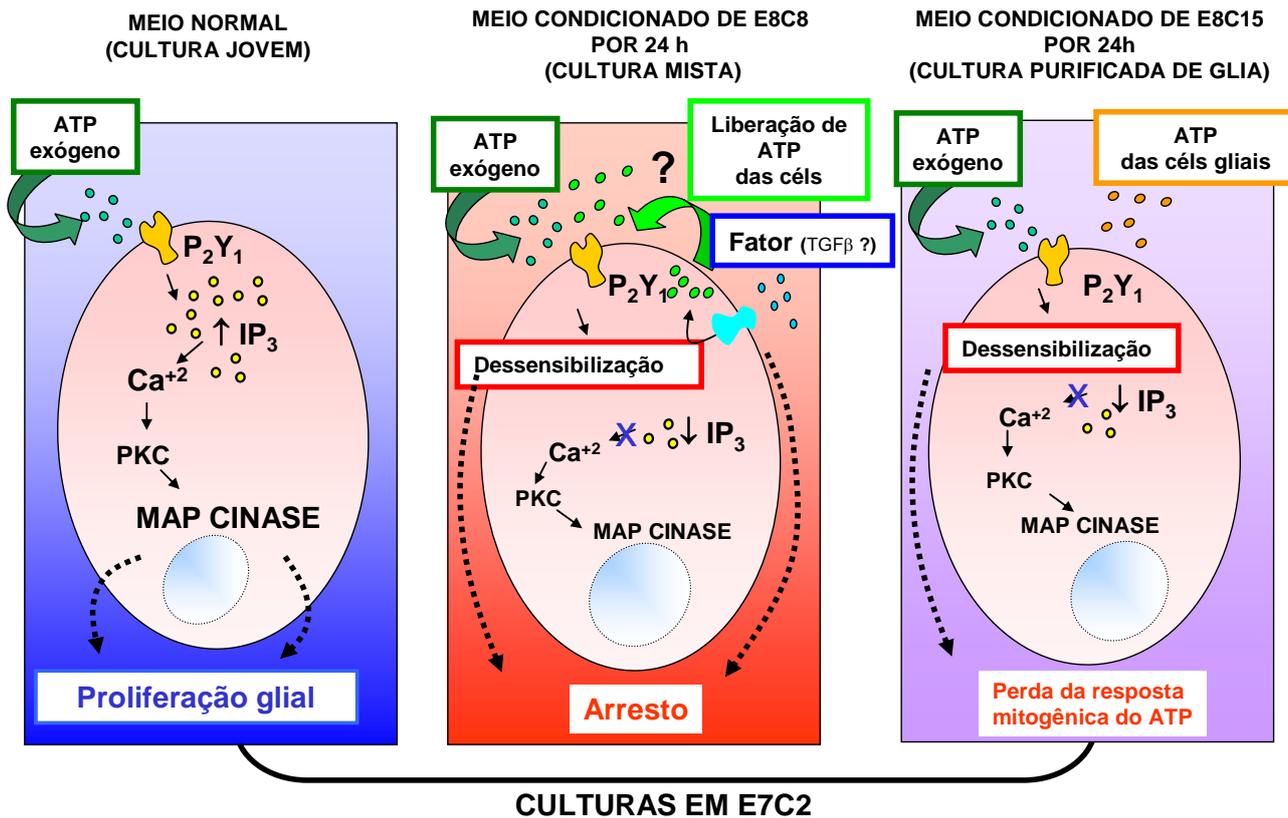


Figura 21- Hipótese de regulação da proliferação glial induzida por fatores solúveis durante o desenvolvimento "in vitro" da retina embrionária de pinto.

Bibliografia

- **ABBRACCHIO, M.P. AND BURNSTOCK, G.** (1994) Purinoceptores: are There Families of P2X and P2Y Purinoceptors? *Pharmacology and Therapeutics*. 64: 445-475.
- **ABBRACCHIO, M.P. AND BURNSTOCK, G.** (1998) Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 78: 113-145.
- **ABBRACCHIO, M.P, BRAMBILLA, R., CERUTI, S. AND CATTABENI, F.** (1999) Signalling Mechanisms involved in P2Y Receptor-Mediated Reactive Astrogliosis. *Program of Brain Research*. 120: 333, 342.
- **ABBRACCHIO, M. P., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., MIRAS-PORTUGA, M. T.** (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P₂Y₁₄ receptor) adds diversity to the P₂Y receptor family. *Trends in Pharmacological Science*. 24(2), 52–55.
- **ABDIPRANOTO, A., LIU, G. J., WERRY, E. L., AND BENNETT, M. R.** (2003) Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *NeuroReport* 14(17), 2177– 2181.
- **ALBERTE'S, A., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WALTER, P.** (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 983-1027.
- **ALEXIXADES M. R. and CEPKO C.** (1996) Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Developmental Dynamics*. 205, 293-307.

- **ALTSULER, D. M., TURNER, D. L. AND CEPKO, C. L.** (1991) Specification of cell type in the vertebrate retina. In *Development of the visual system*, (ed. D. M. K. Lam and C. J. Shatz). pp 37-58. Cambridge: MIT Press.
- **ALVAREZ-BUYLLA, A., GARCIA-VERDUGO, J. M., TRAMONTIN, A. D.** (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews of Neuroscience*. 2: 287–293.
- **ANCHAN, R. M., REH, T. A., ANGELL, J., BALLIET, A. AND WALKER, M.** (1991) EGF and TGF- α stimulate retina neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron* 6: 923-936.
- **BALL, A. K. AND McREYNOLDS, J. S.** (1998) Localization of gap junctions and tracer coupling in retinal Müller cells. *The Journal of Comparative Neurology* 30: 48-57.
- **BALLERINI, P., CICCARELLI, R., Di IORIO, P., GIULIAN, P. AND CACIAGLI F.** (1995) Influence of Ca²⁺ channel modulators on [³H]-purin release from rat cultured glial cells. *Neurochemistry Research*. 20: 627-634.
- **BALLERINI, P., RATHBONE, M. P., Di IORIO, P., RENZETTI, A., GIULIAN P., D'ALIMONTE, I., TRUBIANI, O., CACIAGLI, F. AND CICCARELLI, R.** (1996) Rat astroglial P2Z receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7, 2533-2537.
- **BALLERINI, P., Di IORIO, P., CICCARELLI, R., NARGI, E., D'ALIMONTE, TRAVERSA, U.** (2002) Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *NeuroReport* 13(14), 1789–1792.
- **BARBACID, M.** (1994) The trk family of neurotrophins receptors. *The Journal of Neurobiology*. 25: 1386-1403.
- **BELLIVEAU, M., CEPKO, C.** (1999) Extrinsic and Intrinsic Factors Control the Genesis of Amacrine Cells in the Rat Retina. *Development*. 126: 555-566.

- **BENDER, A. S., NEARY, J. T., Blicharska, J., NORENBURG, L. O. B. AND NORENBURG, M. D.** (1990) The role of phosphoinositide hydrolysis in volume regulation in astrocytes. *Society for Neuroscience*. 16, 667, (No. 279.17).
- **BENNETT, C. G., FORD, A. P., SMITH, J. A., WEBB, T. E., AND BOARDER, M. R.** (2003) P2Y receptor regulation of cultured rat cerebral cortical cells: calcium responses and mRNA expression in neurons and glia. *British Journal of Pharmacology*. 139(2), 279– 288.
- **BERRIDGE, M. J., DAWSON, R. M., DOWNES, C. P., HESLOP, J. P., IRVINE, R. F.** (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochemistry Journal*. 212(2): 473-82.
- **BLASCHKE, A. J., WEINER, J. A. and CHUN, J.** (1998) Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*. 396: 1. 39 – 50.
- **BRAMBILLA, R., NEARY, J. T., CATTABENNI, F., COTTINI, L., D'IPPOLITO, G., AND SCHILLER, P. C.** (2002) Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *The Journal of Neurochemistry*. 83(6), 1285– 1296.
- **BRENNEMAN, D. E. AND FOSTER, G. A.** (1987) Structural Specificity of Peptides Influencing Neuronal Survival During Development. *Peptides* 8 (4): 687-694.
- **BURNSTOCK, G.** (1972) Purinergic nerves. *Pharmacology Reviews*. 24, 509-581.
- **BURNSTOCK, G.** (1976) Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology*. 62: 491-503.

- **BURNSTOCK, G.** (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones, 107-118. Eds L. Bolis and R. W. Straub. Raven, New York.
- **BURNSTOCK, G.** (1991) Distribution and roles of purinoceptor subtypes. *Nucleosides and Nucleotides*. 10: 917-930.
- **BURNSTOCK, G.** (1993) Physiological and pathological roles of purines: an update. *Drug Development Research*. 28: 195-206.
- **BURNSTOCK, G.** (1996). Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. *Drug Development Research*. 39(3– 4), 204– 242.
- **BURNSTOCK, G.** (2004). Introduction: P2 receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 4(8), 793– 803.
- **CAMPOS, C. B. L., BÉDARD, P. A. AND LINDEN, R.** (2002) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during normal mitosis in the developing retina. *Neuroscience*. 112 (3): 583-591
- **CEBALLOS, G., TUTTLE, J. B. AND RUBIO, R.** (1994) Differential. distribution of purine metabolizing enzymes between glia and neurons. *The Journal of Neurochemistry*. 62: 1144-1153.
- **CHANG, K., HANAOKA, K., KUMADA, M., AND TAKUWA, Y.** (1995) Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(44), 26152– 26158.
- **CHAO, M.V.** (1994) The p75 neurotrophin receptor. *Journal of Neurobiology*. 25: 1373-1385.
- **CHEN, C. C. AND CHEN, W. C.** (1996) ATP-evoked inositol phosphates formation through activation of P2U purinergic receptors in cultured astrocytes: Regulation by PKC subtypes α , δ and η . *GLIA* 17: 63-71.

- **CHEUNG, K. K., RYTEN, M., AND BURNSTOCK, G.** (2003) Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Developmental Dynamics* 228(2), 254– 266.
- **CICCARELLI, R., Di LORIO, P., BALLERINI, P., AMBROSINI, G., GIULIANI, P., TIBONI, G. M. AND CACIAGLI, F.** (1994) Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *The Journal of Neuroscience. Res.* 39: 556-566.
- **CICCARELLI, R., Di LORIO, P., MIDDLEMISS, P. J., BALLERINI, P., D'ALIMONTE, J., RATHBONE, M. P. and CACIAGLI, F.** (1997) Potential neuroprotective effects of guanine-based purines released from rat cultured astrocytes. In: *Proceedings of the 11° International EPHAR Meeting, Drug Targets in Heart and Brain Ischemia*, p. 39.
- **CLOSE, J. L., GUMUSCU, B. AND REH, T. A.** (2005) Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF β signaling. *Development.* 132, 3015-3026.
- **CLOUES, R.** (1995) Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn ions. *The Journal of Neurochemistry.* 73: 312-319.
- **COGAN, D.** (1966) *Neurology of Visual System* (Thomas C.C. ed) Springfield, Illinois, USA.
- **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. *The Journal of Neurochemistry.* May;74(5):1885-94.
- **COLLIS, M. G. AND HOUANI, S. M. O.** (1993) Adenosine receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences.* 14: 360-366.

- **COMMUNI, D., PARMENTIER, M., AND BOEYNAEMS, J. M.** (1996) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P₂Y₆ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 222(2), 303–308.
- **COTRINA, M.L., LIN, J. H.-C., LÓPEZ-GARCÍA, J. C., NAUS, C. C. G., AND NEDERGAARD, M.** (2000) ATP-Mediated Glia Signaling. *The Journal of Neuroscience*. 20(8):2835-2844
- **COTRINA, M. L., LIN, J. H. -C, RODRIGUES, A. A-, LIU, S., LI, J., GHADIMI, H. A., KANG, J., NAUS, C. C. G. AND NEDERGAARD, M.** (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *The National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Neurobiology*. 95(26): 15735–15740.
- **CUNHA, R.H.** (2001) Adenosine as a Neuromodulator and as a Homeostatic Regulator in the Nervous System: Different Roles, Different Sources and Different Receptors. *Neurochemistry International*. 38:107-125.
- **DARBY, M., KUZMISKI, J. B., PANENKA, W., FEIGHAN, D., AND MacVICAR, B. A.** (2003) ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *The Journal of Neurophysiology* 89: 1870–1877.
- **DE SAMPAIO E SPOHR, T. C., MARTINEZ, R., DA SILVA, E. F., NETO, V. M. AND GOMES, F. C.** (2002). Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *European Journal of Neuroscience*. 16, 2059-2069.
- **DHAVAN, R., GREER, P. L., MORABITO, M. A., ORLANDO, L. R. AND TSAI, L. H.** (2002) The cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 interact with the alpha-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and alpha-actinin-1 in a calcium-dependent manner. *The Journal of Neuroscience*. 15;22(18):7879-91

- **DI VIRGILLIO, F., CHIOZZI P., FERRARI, D., FALZONI, S., SANZ, J. M. AND MORELLI, A.** (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 97(3): 587-600.
- **DRURY, A. N. AND SZENT-GYORGYI, A.** (1929) The physiological action of adenine compounds with special reference to their action on the mammalian heart. *The Journal of Physiology*. 68: 214-237.
- **DYER, M., CEPKO, C.** (2001a) p27^{Kip1} and p57^{Kip2} regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *The Journal of Neuroscience*, June 15, 2001, 21(12): 4259-4271
- **DYER, M., CEPKO, C.** (2001b) Regulating Proliferation During Retinal Development. *Nature Neuroscience Reviews*. 2: 333-342.
- **DUBYAK, G. R., EI-MOATASSIM, C.** (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Journal of Physiology*. 265: C577-C606.
- **FISHER, A. J. AND REH, T. A.** (2001) Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature*. 4 (3), 247-252.
- **FISHER, A. J. AND REH, T. A.** (2003). Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*. 43: 70–76.
- **FRADE, J. M., BOVILENTA, P., MARTINEZ-MORALES, J. R., ARRIBAS, A., BARBAS, J.A. AND RODRÍGUES-TÉBAR, A.** (1997) Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development* 124: 3313-3320
- **FRADE, J. M., RODRÍGUES-TÉBAR, A. AND BARD, Y. A.** (1996) Induction of cell death by endogenous nerve factor growth thought its p75 receptor. *Nature* 383, 166-168

- **FRANKE, H., ILLES, P.** (2005) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & Therapeutics*. In press.
- **FREDHOLM, B. AND DUNWIDDIE, T. V.** (1988) How does adenosine inhibit neurotransmitter release? *Trends in Pharmacological Sciences*. 9, 130-134.
- **FRIES, J. E., WHEELER-SCHILLING, T. H., KOHLER, K. AND GUENTHER E.** (2004) Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study. *Molecular Brain Research*. 130, 1-6.
- **FUJITA, S. AND HORII, M.** (1963) Analysis of cytotogenesis in chick retina by thymidine autoradiography. *Archivum Histologicum Japonicum*. 23: 359-366.
- **GAILLY, P., BOLAND, B., PAQUES, C., HIMPENS, B., CASTEELS, R. AND GILLIS, J. M.** (1993) Post-receptor pathways of the ATP-induced relaxation in smooth muscle of the mouse vas deferens. *British Journal of Pharmacology*. 110, 326-330.
- **GOMES, F. C., GARCIA-ABREU, J., GALOU, M., PAULIN, D., MOURA NETO, V.** (1999) Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia*. 1999 Apr;26(2):97-108
- **GYSBERS, J. W. AND RATHBONE, M. P.** (1996) GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 14: 19-34.
- **HARDEN, T. K., BOYER, J. L. AND NICHOLAS, R. A.** (1995) P2-Purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *American Reviews of Pharmacology and Toxicology*. 35: 541-579.

- **HARRIS, W. A.** (1991) Neurogenesis and determination in the *Xenopus* retina. In *Development of the visual system*, (ed. D. M. K. Lam and C. J. Shatz). 95-108. Cambridge: MIT Press.
- **HEINS, N., MALATESTA, P., CECCONI, F., NAKAFUKU, M., TUCKER, K.L., HACK, M.A., CHAPOUTON, P., BARDE, Y.A., GOTZ, M.** (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nature Neuroscience*. 5, 308–315.
- **HO, C., HICKS, J. AND SALTER, M. W.** (1996) A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 116, 2909±2918.
- **HOLLOPETER, G., JANTZEN, H. M., VINCENT, D., LI, G., ENGLAND, L., RAMAKRISHNAN, V.** (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 409(6817), 202–207.
- **HYNES, M., PORTER, J.A., CHIANG, C., CHANG, D.T., TESSIER-LAVIGNE, M., BEACHY, P.A. AND ROSENTHAL, A.** (1995) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*. 15: 35-44.
- **ILLES P., KLOTZ K.N. AND LOHSE M.J.** (2000) Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 362(4-5): 295-298.
- **IKEDA, T. AND PURO, D.G.** (1995) Regulation of retinal glial cell proliferation by antiproliferative molecules. *Experimental Eye Research*. 60, 435-444.
- **JACKMAN, M. R. AND PINES, J. N.** (1997) Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surveys*. 29:47-73.
- **JAKOBSON.** (1978) *Developmental Neurobiology*. New York: Plenum.

- **JIN, X.** (1997) Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *The Journal of Clinical Investigation*. 100, 2849–2857.
- **JOHANSSON, K., BRUUN A. AND EHINGER B.** (1999) Gap junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*. 10, 395-403.
- **KHAKH, B. S., BAO, X. R., LABARCA, C., AND LESTER, H. A.** (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature Neuroscience*. 2(4), 322–330.
- **KHAKH, B. S.** (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature Reviews of Neuroscience*. 2(3), 165– 174.
- **KANH, A. J.** (1974) An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Developmental Biology*. 38: 30-40.
- **KASTRITSIS, C. H., SALM, A. K. AND McCARTHY, K.** (1992) Stimulation of the P2Y purinergic receptor on type 1 astroglia results in inositol phosphate formation and calcium mobilization. *The Journal of Neurochem*. 58: 1277-1284.
- **KLEIN, R.** (1994) Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB Journal*. 8: 738-744
- **KORSHING, S.** (1993) The neurotrophic factor concept: A reexamination. *The Journal of Neurobiology*. 13: 2739-2748.
- **LAASBERG, T.** (1990). Ca^{2+} - mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97(1):9-12.
- **LANKFORD, K.L., DE MELLO, F. G. AND KLEIN, N. L.** (1988) D-1 type dopamine receptors inhibit growth cone motility in culture retina neurons: Evidence that neurotransmitters acts as morphogenetic growth regulators in the developing nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 85: 2839-2843.

- **LARSON D. M., WROBLESKI M. J., SAGAR G. D., WESTPHALE E. M. AND BEYER E. C.** (1997) Differential regulation of connexin-43 and connexin-37 in endothelial cells by cell density, growth and TGF-beta1. *American Journal of Physiology*. 272, 405-415.

- **LAYWELL, E.D., RAKIC, P., KUKEKOV, V.G., HOLAND, E.C., STEINDLER, D.A.** (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 97, 13883–13888.

- **LAZAROWISKI, E. R. AND HARDEN, T. K.** (1994) Identification of a uridine nucleotide-selective G-protein-linked receptor that activates phospholipase C. *The Journal of Biological Chem.* 269, 11830±11836.

- **LILLIEN, L. AND CEPKO, C.** (1992) Control of proliferation in the retina: Temporal changes in responsiveness to FGF and TGF- α . *Development* 115: 253-266.

- **LIU, R., GUTIÉRREZ, A M., RING A. V. I., PERSSON, A. E. G.** (2002) Nitric Oxide Induces Resensitization of P2Y Nucleotide Receptors in Cultured Rat Mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 313–321.

- **LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. AND RANDALL, R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

- **LUSTING, K. D., SHIAU, A. K., BRAKE, A. J., AND JULIUS, D.** (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A* 90(11), 5113–5117.

- **MALATESTA, P., HARTFUSS, E., GOTZ, M.** (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253–5263.
- **MARTI, E., BUMCROT, D., TAKADA, R. AND McMAHON, A.P.** (1995) Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature*. 375: 322-324.
- **MAYORDOMO, R., VALENCIANO, A.I., DE LA ROSA, E.J. AND HALLBÖÖK, F.** (2003) Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *European Journal of Neuroscience*. 18(7):1744-50.
- **McCABE, K. L., GUNTHER, E. C. AND REH, T. A.** (1999) The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* 126: 5713-5724.
- **MEYER, M. P., CLARKE, J. D., PATEL, K., TOWNSEND-NICHOLSON, A., AND BURNSTOCK, G.** (1999) Selective expression of purinoceptor cP2Y1 suggests a role for nucleotide signalling in development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. 214(2): 152–158.
- **MILENKOVIC, I., WEICK, M., WIEDEMANN, P., REICHENBACH, A. AND BRINGMANN, A.** (2003) P2Y Receptor-Mediated Stimulation of Müller Glial Cell DNA Synthesis: Dependence on EGF and PDGF Receptor Transactivation *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2003;44:1211-1220.)
- **MOLL, V., WEICK, M., MILENKOVICK, I., KODAL, H., REICHENBACH, A., BRINGMANN, A.** (2002) P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial DNA synthesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2002 Mar;43(3):766-73
- **MORRIS, V. B.** (1973) Time differences in the formation of the receptor types in the developing chick retina. *The Journal of Comparative Neurology* 151: 323-330.

- **NEAL, M. J. AND CUNNINGHAM, J.** (1994) Modulation by endogenous ATP of the light –evoked release of Ach from retina cholinergic neurons. *British Journal Pharmacology.* 113: 1085-1087.
- **NEAL, M. J., CUNNINGHAM, J. AND DENT, Z.** (1998) Modulation of extracellular GABA levels in the retina by activation of glial P2X-purinoreceptors. *British Journal Pharmacology.* 124: 317-322.
- **NEARY, J. T., BREEMEN, C., van FOSTER, E., NOREMBERG, L. O. B. AND NOREMBERG, M. D.** (1988) ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochemical and biophysical Research Communications.* 157: 1410-1416.
- **NEARY, J. T. AND ZHU, Q.** (1994) Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport* 5: 1617-1620.
- **NEARY, J.T., ZHU, Q., KANG, Y. AND DASH, P.K.** (1996) Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. *Neuroreport.* 7(18): 2893-6.
- **NEARY, J. T, RATHBONE, M.P., CATTABENI, F., ABBRACCHIO, M.P. AND BURNSTOCK, G.** (1998) Trophic Actions of Extracellular Nucleotides and Nucleosides on Glial and Neuronal Cells. *Trends in neuroscience.* 19, 13-18.
- **NEARY, J. T., KANG, Y., BU, Y., AKONG, K., AND PETERS, C. S.** (1999) Mitogenic signaling by ATP/P2Ypurinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *The Journal of Neuroscience* 19(11), 4211 –4220.
- **NEARY, J. T. AND ABBRACCHIO, M.P.** (2000) Trophic roles of purines and pyrimidines. In: WILLIAMS, M., ABBRACCHIO, M. P. (Eds), *Handbook of experimental Pharmacology: Purinergic and pyrimidergic signalling*, Springer-Verlag, New York.

- **NEWMAN, E.A.** (2001) Propagation of Intracellular Calcium Waves in Retinal Astrocytes and Müller Cells. *The Journal of Neuroscience*. 21: 2215-2223.
- **NOCTOR, S. C., FLINT, A. C., WEISSMAN, T. A., DAMMERMAN, R. S., KRIEGSTEIN, A. R.** (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 409: 714–720.
- **NORTH, R. A.** (1996) P2X Purinoceptor Plethora. *Semin. Neuroscience*. 8, 187-194.
- **OLAH, M. E. AND STILES, G. L.** (1990) Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annual Review in Pharmacology. Toxic.* 35: 581-606.
- **OZOG M. A., BERNIER S. M., BATES D. C., CHATERJEE B., LO C. W. AND NAUS C. C.** (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Molecular Biology of the Cell* 15, 4761-4774.
- **PAES DE CARVALHO, R. AND DE MELLO.** (1982) Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. *The Journal of Neurochemistry*. 38 (2): 493-500.
- **PAREKH, A. B. AND PENNER, R.** (1995) Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 15;92(17):7907-11.
- **PEARSON, R., CATISCAS, M., BACKER, D. AND MOBBS, P.** (2002) Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *The Journal of Neuroscience*. 22(17): 7569-7579.

- **PEARSON, R.A., DALE, N., LLAUDET, E. AND MOBBS P.** (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46, 731-744.
- **PERALTA, A. AND PINTOR, J.** (1998) Purinergic transmission in the retina. *Neuroscience Research Communications*. 23: 129-138.
- **PINCUS, D.W, DICICCO-BLOOM, E.M. AND BLACK, I.B.** (1990) Vasoactive intestinal Peptides Regulates Mitosis, Diferenciacion and Survival of Cultural Sympathetic Neuroblast. *Nature*. 8, 343 (6258): 564-567.
- **PINTOR, J., DIAZ-REY, M. A., TORRES, M. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T.** (1992) Presence of diadenosine polyphosphates-Ap4A and Ap5A-in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neuroscience Letters*. 136,141-144.
- **POLYAK, S.** (1957) The Vertebrate Visual System. In Kluwer (Ed), University of Chicago, press. Chicago (1ed, pp 207-287).
- **PRADA, C., PUGA, J., PÉREZ-MÉNDEZ, L., LOPEZ, R. AND RAMÍREZ, G.** (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *European Journal of Neuroscience*. 3, 559-569.
- **PURVES, D.** (1988) *Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections.* Oxford University Press, Oxford.
- **RALEVICK, V. AND BURNSTOCK, G.** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Ver.* 50: 415-475.
- **RATHBONE, M. P., MIDDLEMISS, P. J. AND KIM, J.-K.** (1990) Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of serum starved astrocytes in tissue culture. In: Abstracts of the 4th Canadian Neuro-Oncology Meeting, p. 16 (No. 5).

- **RATHBONE, M. P., HINDLEY, S., GYSBERS, J. W. AND GABEL, B.** (1991) Purine nucleosides and nucleotides stimulate astrocyte proliferation in vitro and astrogliosis in vivo. *Abstr. Soc. Neurosci.* 17, 550, (No. 221.3).
- **RATHBONE, M. P., DeFORGE, S., DeLUCA, B., GABEL, B., LAURENSSEN, C., MIDDLEMISS, P. AND PARKINSON, S.** (1992) Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. *Med. Hypotheses* 37: 213-219.
- **RATHBONE, M.P., PAMELA J. M., GYSBERS, J. W., ANDREW, C., HERMAN, M. A. R., REED, J. K., CICCARELLI, R., PATRIZIA DI IORIO, P. AND CACIAGLI, F.** (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progress in Neurobiology* Vol. 59: 663-690.
- **REED, S. I.** (1997) Control of the G1/S transition. *Cancer Surveys.* 29:7-23.
- **REH, T. A.** (1991) Determination of cell fate during retinal histogenesis: Intrinsic and extrinsic mechanisms. In *Development of the visual system*, (ed. D. M. K. Lam and C. J. Shatz). pp 79-94. Cambridge: MIT Press.
- **RICHARDSON, P. J. AND BROWN, S. J.** (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *The Journal of Neurochemistry.* 48, 622-630.
- **RODIECK, R. W.** 1998. *The first steps in seeing.* Sunderland, M A: Sinauer.
Sanchez I, Dynlacht BD (1996) Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology.* 8: 318-324.
- **ROELINK, H., PORTER, J.A., CHIANG, C., TANABE, Y., CHANG, D.T., BEACHY, P.A. AND JESSELL, T.M.** 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell.* 81: 445-455.

- **SAKAKI, Y., SUGIOKA, M., FUKUTA, Y. AND YAMASHITA, M.** 1997. Capacitive Ca²⁺ influx in the neural retina of chick embryo. *The Journal of Neurobiology*. 32: 66-68.
- **SALTER, M. W. AND HICKS, J. L.** (1995) ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *The Journal of Neuroscience*. 15: 2961-2971.
- **SANCHES, G., ALENCAR, L., VENTURA, A.** 2002. ATP induces proliferation of retinal cells in cultura via ativation of PKC and extracelular signal-regulated kinase cascade. *The Journal of Devlopmental Neuroscience*. 20: 21-27.
- **SANTOS P. F., CAMELO O. L., CARVALHO A. P. AND DUARTE C. B.** (1999) Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons. *The Journal of Neurobiology* 41, 340-348.
- **SASAKI, Y., HOSHI, M., AKAZAWA, C., NAKAUAMURA, Y., TSUZUKI, H., INOUE, K.** (2003) Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44(3), 242– 250.
- **SCHEIMANN, W. P. AND HICKS, J. L.** (1991) ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phosphoinositide metabolism in pregnant guinea pig myometrium. *American Journal of Physiology*. 261: 665-E672.
- **SELLERS, L. A., SIMON, J., LUNDAHL, T. S., COUSENS, D. J., HUMPHREY, P. P., AND BARNARD, E. A.** (2001) Adenine nucleotides acting at the human P₂Y₁ receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(19), 16379–16390.
- **SERI, B., GARCIA-VERUGO, J.M., McEWEN, B.S., ALVAREZ-BUYLLA, A.** (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 21: 7153–7160.

- **SHERR, C. AND ROBERTS, J.** (1999) CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G1-phase Progression. *Genes and Development*, 13: 1501-1512.
- **SLACK, J. M. W.** (1991) *From egg to embryo*. Cambridge University press, Cambridge, MA. 2nd Ed.
- **SNIDER, W. D.** (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell (Cambridge, Mass.)* 77: 627-638
- **SPENCE, S. G. AND ROBSON, J. A.** (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 12: 801-812.
- **SUGIOKA, M., FUKUTA, Y. AND YAMASHITA, M.** (1996) Ca²⁺ responses to ATP via purinoreceptors in the early embryonic chick retina. *The Journal of Physiology*. 493: 855-863.
- **SUGIOKA, M., ZHOU, W. L., HOFFMANN, H. D., YAMASHITA, M.** (1999a) Ca²⁺ mobilization and capacitive Ca²⁺ entry regulate DNA synthesis in cultured chick retinal neuroepithelial cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 17(3), 163-172.
- **SUGIOKA, M., ZHOU, W. L., HOFFMANN, H. D., YAMASHITA, M.** (1999b) Involvement of P2 purinoreceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick retina. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 17: 135-144.
- **SUGIOKA, M. AND YAMASHITA, M.** (2003) Calcium signaling to nucleus via store-operated system during cell cycle in retinal neuroepithelium. *Neuroscience Research*. 2003 Apr;45(4):447-58

- **TRUSSEL, L.O., JACKSON, M.B.** (1985) Adenosine Activated Potassium Conductance in Culture Striatal Neurons. Proceeding in the National Academy of Sciences. USA. 82: 4857-4861.
- **VISCOMI, M. T., FLORENZANO, F., CONVERSI, D., BERNARDI, G., AND MOLINARI, M.** (2004) Axotomy dependent purinergic and nitrenergic co-expression. Neuroscience 123(2), 393– 404.
- **von BARTHELD, C.S., BYERS, M.R., WILLIAMS, R. AND BOTHWELL, M.** (1996) Anterograde transport and axodendritic transfer of neurotrophins in developing visual system. Nature (London) 379: 830-833.
- **von KÜGELGEN, I. AND WETTER, A.** (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology 362(4–5), 310– 323.
- **WANG, Z., HAYDON, P.G. AND YEUNG, E.S.** (2000) Direct Observation of Calcium-Independent Intracellular ATP Signaling in Astrocytes. Analytical Chemistry. 72: 2001-2007.
- **YAMASHITA M., YOSHIMOTO, Y. AND FUKUDA Y.** (1994) Muscarinic acetylcholine responses in the early embryonic chick retina. Journal of Neurobiology 25: 1144-1153.
- **YAMASHITA, M. AND SUGIOKA M.** (1998) Calcium mobilization systems during neurogenesis. News in Physiological Sciences 13, 75-79.
- **YOUNG R. W.** (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. Brain Research. 353, 229-239.
- **ZIMMERMANN, H.** (1994) Signaling via ATP in the nervous system. Trends in Neuroscience. 17: 420-426.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)