

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

**Márcia Lopes de Figueiredo**

Ativação de Glia de Müller em cultura por catecolaminas e ATP:  
expressão de nestina como um possível passo na reprogramação  
celular

RIO DE JANEIRO

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Esta dissertação foi elaborada durante a vigência de auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

MÁRCIA LOPES DE FIGUEIREDO

Ativação de Glia de Müller em cultura por catecolaminas e  
ATP: expressão de nestina como um possível passo na  
reprogramação celular

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (Biofísica) Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre  
em Ciências biológicas (Biofísica)

Orientador: Ricardo Augusto de Melo Reis

RIO DE JANEIRO

2010

Figueiredo, Márcia Lopes

Ativação de Glia de Müller em cultura por catecolaminas e ATP : expressão de nestina como um possível passo na reprogramação celular. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2009.

x, 71 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Ricardo Augusto de Melo Reis.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2010.

Referências bibliográficas: f. 59-71.

1. Retina - citologia. 2. Neuroglia - citologia. 3. In vitro. 4. Catecolaminas - administração e dosagem. 5. Receptores catecolaminérgicos - metabolismo. 6. Trifosfato de adenosina - administração e dosagem. Receptores purinérgicos – metabolismo. 8. Proteínas de Filamentos Intermediários. 9. Desdiferenciação celular – efeito de drogas. 10. Animais. 11. Biofísica - Tese. I. Reis, Ricardo Augusto de Melo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD: adrenalina  
AC: adenilil-ciclase  
ADP: adenosina difosfato  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
ATP: adenosina trifosfato  
BBG: brilliant blue G  
BSA: albumina bovina sérica  
BzATP: benzoil-ATP  
Ca<sup>2+</sup>: cálcio  
CCG: camada de células ganglionares  
CFO: camada de fibras ópticas  
CNE: camada nuclear externa  
CNI: camada nuclear interna  
COMT: catecol-O metiltransferase  
CPE: camada plexiforme externa  
CPI: camada plexiforme interna  
CREB: proteína que se liga ao elemento de resposta ao AMPc  
DA: dopamina  
DAG: diacilglicerol  
DAPI: 4,6'-diamidino-2-phenylindole  
DAT: transportador de dopamina  
DBH: dopamina β-hidroxilase  
DDC: dopa-descarboxilase  
DMEM: meio de Dulbecco modificado por Eagle  
E9: nono dia de estágio de desenvolvimento embrionário  
EPR: epitélio pigmentado da retina  
GABA: ácido γ-amino butírico  
GFAP: proteína ácida fibrilar da glia  
GLAST: transportador glutamato/aspartato  
GS: glutamina sintetase  
HVA: ácido homovanílico  
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato  
MAO: monoamino oxidase  
MHPG: 3- metoxi-4-hidroxifenoglicol  
NA: noradrenalina  
NET: transportador de noradrenalina  
PACAP: polipeptídeo da pituitária ativador da adenilil ciclase  
P4: quarto dia após o nascimento  
PKA: proteína cinase A  
PNMT: feniletanolamina n-metiltransferase  
PROP: propranolol  
SCH: SCH 23390  
SNC: sistema nervoso central  
TH: Tirosina-Hidroxilase  
VMAT: transportadores vesiculares de monoaminas

## RESUMO

A retina é um tecido multilaminar composto de vários circuitos de neurotransmissores. As células gliais são elementos essenciais do sistema nervoso e as células de Müller são o tipo glial predominante da retina de vertebrados (mais de 90%). Várias funções são atribuídas a essas células como a homeostase extracelular, migração neuronal, sinaptogênese, entre outras. Em resposta ao dano ou fatores exógenos, a glia de Müller desdiferencia, prolifera e expressa marcadores expressos em progenitores, e produz novos neurônios e células da glia. Neste trabalho, Investigamos (i) se receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos estão expressos nas células de Müller, além de receptores dopaminérgicos  $D_1$  para mobilização de AMPc, (ii) se receptores purinérgicos  $P_2X_7$  são funcionais e induzem permeabilização celular nas células de Müller sob ativação por ATP, e (iii) e se essas vias de sinalização intracelular catecolaminérgica e purinérgica induzem a expressão de nestina, um conhecido marcador de células progenitoras. Com esse objetivo, retinas de embriões de aves de 8 dias ou retinas de camundongo pós-natal de 1-4 dias foram dissecadas e dissociadas para preparação de culturas mistas de neurônio-glia de baixa densidade. Culturas purificadas de células gliais de Müller foram obtidas após eliminação neuronal com 4 mM de tratamento com ácido ascórbico por 3 h. Dopamina ou noradrenalina (100  $\mu$ M) foram adicionadas a culturas de glia em meio DMEM. Experimentos de permeabilização foram realizados em culturas de glia purificadas tratadas com ATP ou Benzoyl- ATP (BzATP) para avaliar a ativação de receptores purinérgicos. Nós observamos que o receptor  $\beta$ -adrenérgico está presente na cultura de células de glia de aves. A produção de AMPc induzida por Noradrenalina na glia de Müller de camundongo é bloqueada por propranolol, um antagonista  $\beta_1$  enquanto que na glia de Müller de aves é inibida por SCH 23390, um antagonista  $D_1$ . A atividade dos receptores  $P_2X_7$  em células da glia de Müller de camundongo é também observada pela permeabilização celular com tratamento com ATP ou Bz-ATP. Esse efeito é bloqueado por BBG, um antagonista  $P_2X_7$ . Ambas as sinalizações (catecolaminérgica e purinérgica) induzem a expressão de nestina e isso poderia representar um passo inicial na transdiferenciação nas células de glia de Müller.

## ABSTRACT

The retina is a multi-layered tissue made by innumerable neurotransmitter circuitries. Glial cells are essential elements of the nervous system and Müller cells are the major glial cell of the retina of vertebrates (over 90%). Several functions are related to these cells such as extracellular homeostasis, neuronal migration, synaptogenesis, among others. In response to damage or exogenous factors, Müller glia dedifferentiate, proliferate, express markers normally present in progenitors and produce new neurons and glia. In this work, we investigated (i) if  $\beta_1$  adrenergic receptors are expressed in Müller cells in addition to  $D_1$  dopaminergic receptors for cAMP mobilization, (ii) if  $P_2X_7$  purinergic receptors are functional and induce cellular permeabilization in Müller cells upon ATP activation, and (iii) if these intracellular signaling pathways induce nestin expression, a well-known progenitor marker in the retina. For these purposes, retinas from 8-day old avian embryos or P1-P4 postnatal mice were dissected and dissociated for the preparation of low-density mixed neuronal-glia culture. Müller cells purified cultures were obtained after neuronal elimination upon 4 mM ascorbic acid treatment for 3 h. Dopamine or noradrenaline (100  $\mu$ M) were added in DMEM. Permeabilization experiments were performed in purified glial cultures treated with ATP or Benzoyl-ATP (BzATP). We observed that the  $\beta_1$  adrenergic receptor is present in avian glial cultures. However, cAMP production induced by noradrenaline Müller glia obtained from mice is blocked by propranolol, a  $\beta_1$  antagonist while in avian Müller cells it is inhibited by SCH 23390, a  $D_1$  antagonist.  $P_2X_7$  receptors activity in mice Müller cells in culture are also observed by cellular permeabilization upon ATP or BzATP treatment. This effect is blocked by BBG, a  $P_2X_7$  antagonist. Both pathways (catecholaminergic and purinergic) induced nestin expression and this might represent a step for transdifferentiation in Müller glia cells.

## SUMÁRIO

<b>Capa</b>	i
<b>Lombada</b>	ii
<b>Folha de rosto</b>	iii
<b>Ficha Catalográfica</b>	iv
<b>Lista de Abreviaturas</b>	v
<b>Resumo</b>	vi
<b>Abstract</b>	vii
<b>Sumário</b>	viii
<b>Agradecimentos</b>	x
<b>1. Introdução</b>	01
1.1. Apresentação do problema experimental	01
1.2. Retina	01
1.2.1. Retina como modelo de estudo do SNC	02
1.2.2. Estrutura e função	02
1.2.3. Desenvolvimento da retina	06
1.3. Glia de Muller	09
1.3.1. Funções	11
1.3.2. Papel na regeneração	11
1.4. Nestina e progenitores neurais	13
1.5. Definição dos sistemas neuroquímicos abordados	14
1.5.1. Sistema catecolaminérgico	14
1.5.1.1. Síntese e metabolismo	14
1.5.1.2. Receptores	16
1.5.1.3. Sinalização na retina e na glia de Muller	17
1.5.2. Sistema Purinérgico	19
1.5.2.1. Síntese e metabolismo	19
1.5.2.2. Receptores	20
1.5.2.3. Sinalização na retina e na glia de Muller	21
<b>2. Objetivos</b>	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24

<b>3. Materiais e Métodos</b>	25
3.1. Materiais	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Obtenção das culturas de glia de pinto	26
3.2.2. Obtenção das culturas de glia de camundongo	27
3.2.3. Determinação do AMPc	27
3.2.4. Imunocitoquímica	29
3.2.5. Imunodeteccção de proteínas ( <i>western Blot</i> )	30
3.2.6. Ensaio de permeabilidade induzidos por ATP	31
3.2.7. Análise Estatística	32
<b>4. Resultados</b>	33
4.1. Detecção de receptores $\beta_1$ em células de Muller	33
4.2. Acúmulo de AMPc por catecolaminas em Müller de pinto	34
4.3. Acúmulo de AMPc por catecolaminas em Müller de camundongos	35
4.4. Expressão de nestina induzida por catecolaminas	37
4.5. ATP ativa receptores $P_2X_7$ em culturas de glia de camundongo	45
4.6. Expressão de Nestina induzida por ATP	47
<b>5. Discussão</b>	50
<b>6. Conclusões</b>	58
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	59

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por esta conquista

Ao meu orientador Ricardo Reis por ter me apoiado sempre incondicionalmente.

Aos professores Fernando Mello, Maria Cristina e Patrícia Gardino por todas as sugestões e ajuda.

Ao meu marido Daniel e minha mãe Neli pelo apoio, compreensão e amor.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Neuroquímica e Neurobiologia: Renatinha, Bernardo, Clarissa, Nilson, Luís, Regina, Mário, Gi, Cristiano, Ellen, Silmara, Zetinha, Luciano e Livinha, mesmo não estando mais presente no lab.

Ao pesquisador Robson Faria (Fiocruz) e ao Pós-Doutor Victor Túlio Resende (IBCCF) que contribuíram na elaboração deste trabalho.

## **1. Introdução**

### **1.1- Apresentação do problema experimental**

A retina tem sido extensivamente utilizada como modelo experimental para se investigar as interações celulares e o efeito de neurotransmissores e neuromoduladores no SNC. A glia de Müller representa o principal tipo glial da retina e expressa enzimas e receptores de neurotransmissores (Kubrusly et al., 2005). Dentre as diferentes cascatas de sinalização presentes na glia de Müller, o sistema dopaminérgico e purinérgico vêm sendo estudados (Jabs et al., 2000; Pannicke et al., 2000; Kubrusly et al., 2007; de Melo Reis et al., 2008b). Foi demonstrado que a glia de Müller pode expressar marcadores de progenitores e proliferar após lesão retiniana ou ser ativada por neurotransmissores como o glutamato e outros sinalizadores produzindo novas células que poderão dar origem a neurônios e células gliais (Fischer e Reh, 2001; Fischer e Reh, 2003; Ramirez e Lamas, 2009).

Surge então o interesse em se verificar se outros neurotransmissores como as catecolaminas e ATP teriam um efeito semelhante em culturas de glia de Müller de aves e camundongos e se em resposta a estes neurotransmissores as células de Müller de camundongo em cultura seriam moduladas e alterariam seu fenótipo de células diferenciadas, retornando a um estágio progenitor. A análise dos resultados deste trabalho nos permitiu verificar que a glia de Müller responde à estimulação com dopamina (DA), noradrenalina (NA) e ATP, sendo o seu fenótipo modificado por estes neurotransmissores.

### **1. 2- A retina**

O sistema visual é um sistema sensorial que permite analisar as informações ao redor e integrar o indivíduo ao ambiente. A informação visual é captada na retina, onde o sinal luminoso é convertido em um sinal químico e após isso é levado aos centros superiores no encéfalo. A

percepção visual depende da correta integração entre os circuitos internos da retina e do córtex visual (Marquardt e Gruss, 2002).

### **1.2.1- A retina como um modelo de estudo do sistema nervoso central**

A retina tem sido amplamente utilizada como um modelo de estudo do desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso central (SNC) por se tratar de um tecido bastante acessível, podendo ser obtida sem a contaminação com outras estruturas. É uma estrutura com propriedades bem estudadas, muito se sabe sobre sua anatomia, fisiologia, metabolismo e desenvolvimento.

Originário do neuroectoderma, o tecido retiniano faz parte do SNC e por isto, pode ser considerado como modelo de estudo das interações dos neurônios centrais. Vários neurotransmissores estão presentes na retina. Entre eles, como no restante do SNC, ácido  $\gamma$ -amino-butírico e glutamato são os mais abundantes mediadores sinápticos tendo papel crucial no processamento e transmissão das informações visuais. Suas sinapses são bem estudadas e seus tipos celulares bem caracterizados (Cepko et al., 1996).

### **1.2.2- Estrutura e função da Retina**

A retina está presente na porção posterior do globo ocular, entre o humor vítreo, a coróide e a esclera (Figura 1). Ela possui uma organização laminar composta por três camadas de corpos celulares intercaladas por camadas de plexos, nas quais os axônios e prolongamentos dendríticos de seus neurônios fazem contatos sinápticos entre si. Externamente e adjacente ao epitélio pigmentado do olho, localizam-se os segmentos externos dos fotorreceptores que contém pigmentos visuais responsáveis pela detecção do estímulo luminoso que será transduzido em sinal neural. Seguem-se os segmentos internos dos fotorreceptores, onde se encontram os corpos celulares destes neurônios sensoriais, formando a camada nuclear externa (CNE). Os dois tipos

celulares encontrados nesta camada são os cones e os bastonetes que respondem pela visão fotóptica e escotóptica, respectivamente (McNaughton, 1991). A primeira refere-se a ambientes com alta intensidade luminosa e a segunda a ambientes com baixa luminosidade (penumbra). Justaposta a CNE, encontra-se a camada plexiforme externa (CPE), na qual ocorrem os contatos sinápticos entre cones e bastonetes com as células bipolares e a modulação da informação pelas células horizontais, ambos os tipos celulares localizados na camada nuclear interna (CNI). Além das células bipolares e horizontais, os corpos celulares que compõem esta camada nuclear são os das células amácrinas e da glia de Müller. Logo em seguida a CNI, encontra-se a camada plexiforme interna (CPI), a segunda etapa de processamento da informação visual na qual o sinal neural é transmitido através das células bipolares aos dendritos das células ganglionares (Dowling, 1999), cujos corpos celulares formam a camada de células ganglionares (CCG). Os axônios destas células se organizam em feixes formando a camada de fibras ópticas (CFO) e saem da retina para compor o nervo óptico, conduzindo a informação visual inicialmente processada no tecido retiniano até os centros encefálicos superiores (Dowling, 1999, Figura 2).

Além dos neurônios descritos acima, a retina possui células gliais como astrócitos, microglia e células denominadas de células de Müller, que se encontram radialmente dispostas ao longo de toda a sua espessura apresentando inúmeras funções, como suporte neuronal., controle do meio extracelular, liberação de fatores tróficos, além de uma dinâmica comunicação bidirecional com os neurônios retinianos. A luz atravessa toda a retina até chegar à camada onde se encontram os fotorreceptores, células que possuem moléculas fotossensíveis como as rodopsinas presentes nos bastonetes e as opsinas nos cones e encontrando-se numa posição privilegiada, na interface entre o mundo externo e no início de um circuito que permite o processamento neural. Neste sentido, um estudo recente propõe que as células de Müller

poderiam atuar como um cabo de fibras ópticas conduzindo a luz até os fotorreceptores, reduzindo a distorção do sinal visual (Franze et al., 2007).

Os fotorreceptores não respondem à estimulação com despolarização como outros tipos neuronais, mas se hiperpolarizam durante o período em que há a estimulação luminosa, fato descoberto há cerca de 50 anos com o uso de eletrodos ultrafinos na elaboração de potenciais receptores lentos na retina de anuros (revisado por Baylor, 1987). A fototransdução ocorre no segmento externo, localizado na porção distal da célula. Na região terminal, existe um processo diferenciado com acúmulo de vesículas sinápticas contendo glutamato como transmissor para células bipolares e horizontais (Baylor, 1987). No escuro há grande quantidade de um segundo mensageiro intracelular, o monofosfato de guanosina monocíclico (GMPc), que mantém abertos os canais iônicos dependentes desse segundo mensageiro. A energia luminosa leva a uma hidrólise do GMPc, diminuindo sua concentração e levando ao fechamento dos canais iônicos e a hiperpolarização da célula, inibindo dessa forma a liberação de neurotransmissores. Os fotorreceptores então se comunicam verticalmente com as células bipolares que podem ser do tipo ON que possuem receptores glutamatérgicos metabotrópicos e se hiperpolarizam na presença de glutamato (ou seja, na ausência de estímulo luminoso), ou do tipo OFF que possuem receptores glutamatérgicos ionotrópicos e se despolarizam na presença do neurotransmissor. As células ganglionares também podem ser do tipo ON e do tipo OFF, as do tipo ON são as células pós-sinápticas das células bipolares ON e se despolarizam quando a intensidade de luz aumenta (Werblin, 1991; Lagnado, 2000). Essa via fotorreceptor- bipolar- ganglionar é conhecida como via vertical e essa informação é modulada pelas células horizontais e amácrinas, que constituem a via horizontal ou modulatória (Kolb, 2003; Lagnado, 2000).

As células ganglionares emitem axônios que saem da retina e formam o nervo óptico, transmitindo os impulsos nervosos em forma de potenciais de ação a centros superiores para o

processamento da imagem (Kolb, 1994). Sabe-se que o neurotransmissor envolvido nessa via vertical ou principal é também o glutamato, enquanto que as células responsáveis pela passagem da informação pela via horizontal ou modulatória utilizam diversos tipos de mediadores, podendo ser inibitórios ou excitatórios, de diversas classes químicas: aminoácidos, catecolaminas, peptídeos e o óxido nítrico (Kolb, 2003).

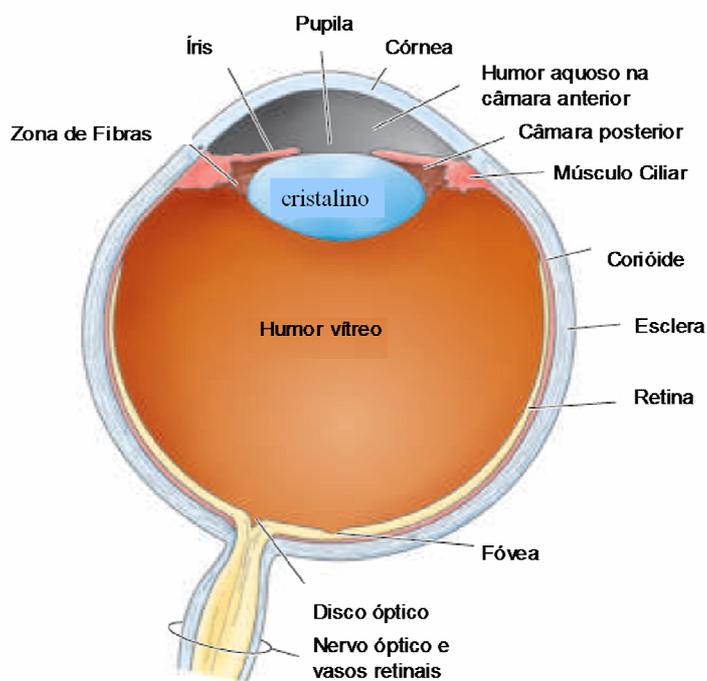


Figura 1. Estrutura do globo ocular e seus componentes. Nota-se a presença da retina na porção posterior do globo ocular em coloração clara e a fóvea, como sendo a região de maior acuidade visual. Modificado de Fitzpatrick, 2004.

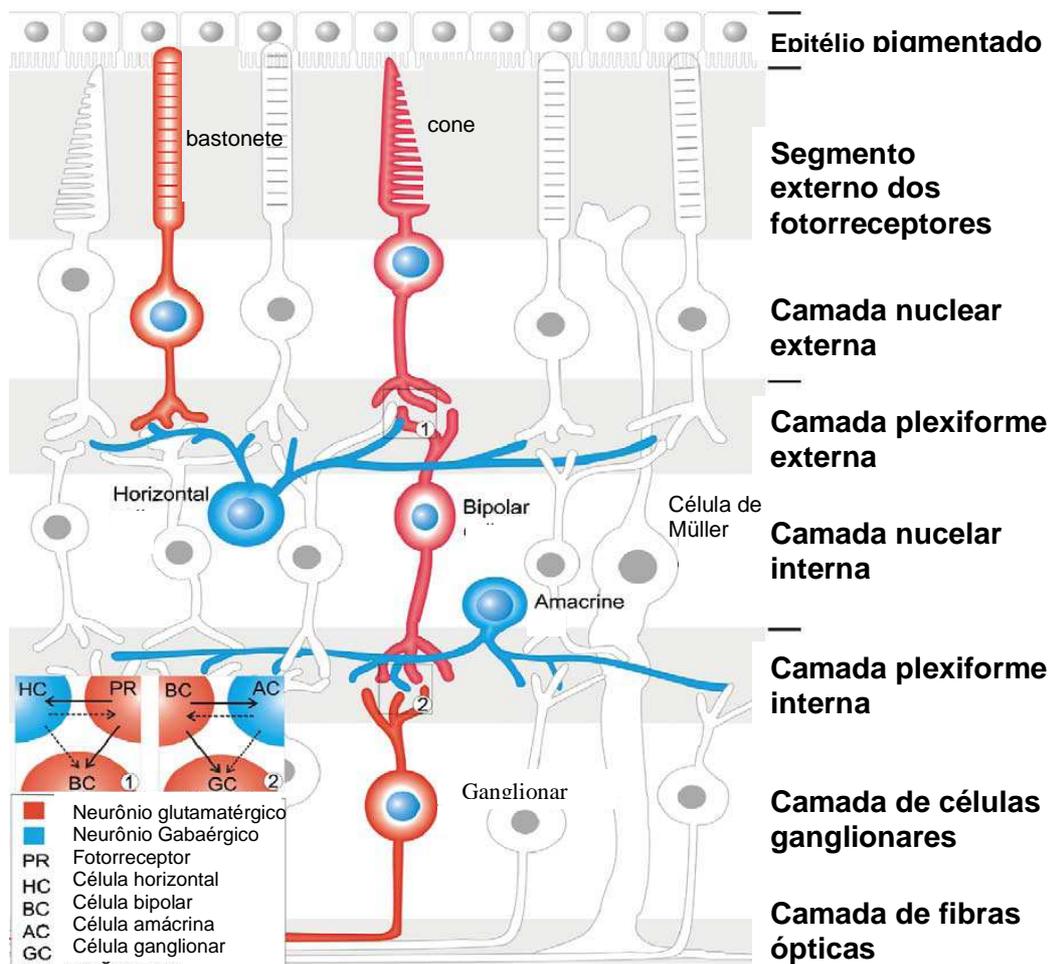


Figura 2. Esquema ilustrando os diversos tipos celulares da retina organizados em camadas. Os neurônios glutamatergicos estão representados em vermelho (fotorreceptores, bipolares e ganglionares), enquanto neurônios GABAérgicos estão representados em azul (horizontais e amácrinas). Células de Müller estão presentes em toda a extensão da retina (Modificado de Yang, 2004).

### 1.2.3- Desenvolvimento da Retina

A retina neural se origina da vesícula óptica primária, estrutura da qual também se origina a íris, o epitélio pigmentado da retina (EPR) e o epitélio do corpo ciliar (Moshiri e Reh, 2004). A invaginação da vesícula primária origina o cálice óptico ou vesícula óptica secundária, a camada mais interna dessa estrutura primitiva bilaminar que dará origem a retina neural., enquanto a

camada mais externa que está em contato com o mesênquima circundante originará o EPR (Mey e Thanos, 2000; Zhang et al., 2002).

As células progenitoras da retina são multipotentes e podem dar origem a diferentes tipos de células neuronais e a glia característica que é a célula de Müller. Estas células migram para suas posições específicas, se diferenciam e formam os circuitos da retina. (Cepko et al., 1996; Adler, 2000; Cayouette et al., 2006).

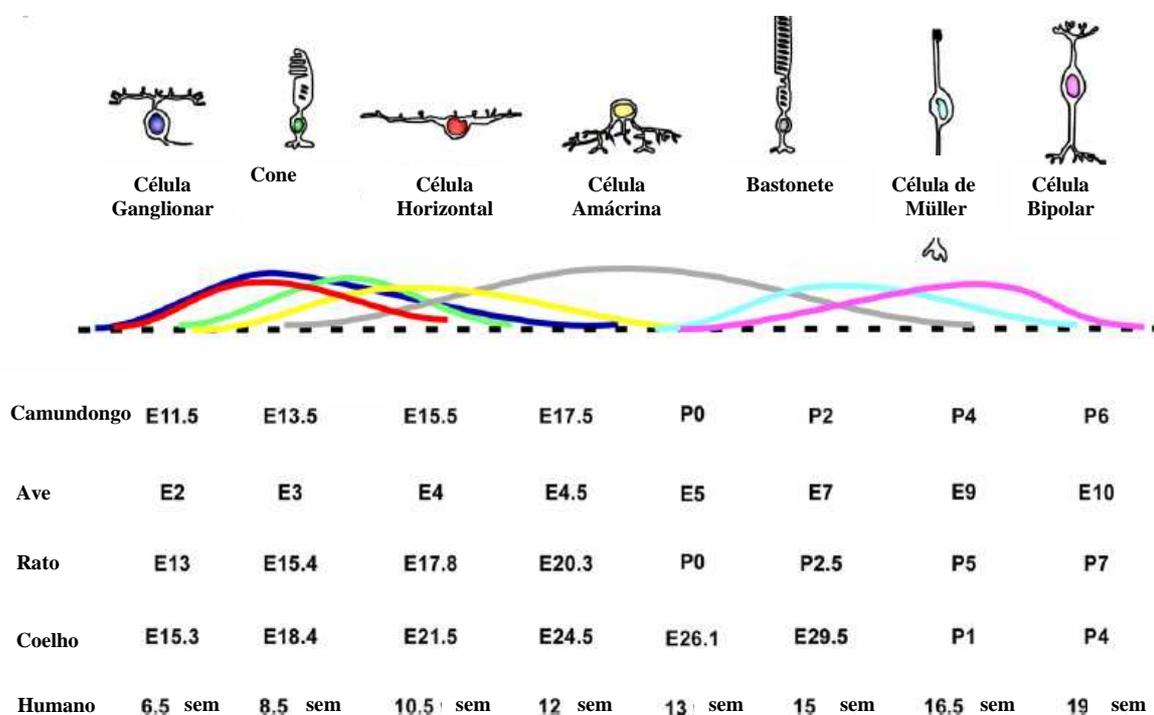


Figura 3. Histogênese da retina de diversas espécies. Observa-se a conservação na ordem de nascimento das células entre as espécies, com a emergência das células ganglionares, cones, horizontais, amácrinas, bastonetes, células de Müller e bipolares. Modificado de Martins e Pearson, 2007.

O desenvolvimento e a determinação do tipo celular que será gerado a partir dos progenitores da retina dependem de inúmeros fatores, dentre eles elementos extrínsecos secretados como os fatores de crescimento e hormônios, assim como fatores transcricionais que atuam intrinsecamente na determinação do fenótipo que a célula expressará (Figura 4) (Harris, 1997; Marquardt e Gruss, 2002; Hatekeyama e Kageyama, 2004).

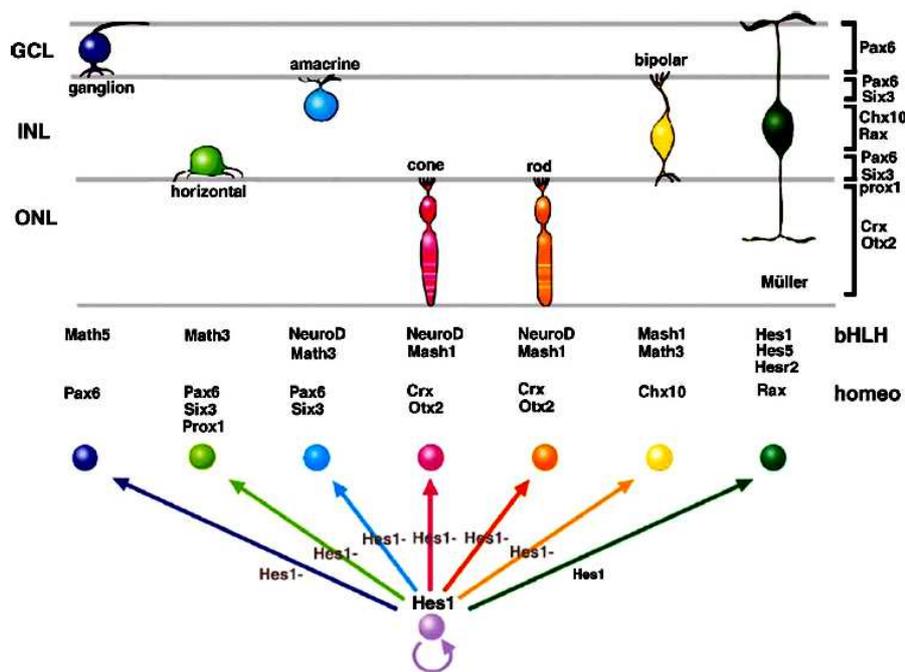


Fig 4 – Reguladores intrínsecos atuando na diferenciação de células da retina. Hes 1, um fator de transcrição encontrado nos progenitores, inibe a diferenciação neuronal e mantém o fenótipo progenitor, e com a perda desse fator as células começam a se diferenciar. As células que permanecem expressando Hes 1 irão se diferenciar em glia de Müller, as últimas células a saírem do ciclo celular. Modificado de Hatakeyama e Kageyama, 2004.

A neurogênese na retina segue um gradiente centro-periferia. Além disso, há uma ordem conservada de geração dos diferentes tipos celulares (Figura 3). As primeiras células a saírem do ciclo mitótico são as células ganglionares seguidas cones, células horizontais, amácrinas mais

tardamente são originadas as amácrinas remanescentes, e por último os bastonetes, as células de Müller e bipolares. (Para revisão Prada et al., 1991; Lamb et al., 2007, Martins e Pearson, 2007).

### **1.3- Glia de Müller**

A célula de Müller é o elemento glial predominante na retina de vertebrados, compreendendo 4-5% do total de células da retina e cerca de 90% da glia retiniana, interagindo com a maioria, senão todos os neurônios da retina (Jeon et al., 1998). A glia de Müller se expande por toda a retina (Sarthy e Hippias, 2001). Seu corpo celular se localiza na CNI e seus prolongamentos se estendem desde a borda interna da retina, adjacente ao humor vítreo até a camada de fotorreceptores (Newman e Reichenbach, 1996).

Tanto a glia de Müller madura quanto os progenitores retinianos têm uma morfologia radial, entretanto a posição do soma depende do estágio de maturação da célula. O soma da glia de Müller migra até atingir a CNI permanecendo nessa camada, enquanto as células progenitoras têm um perfil nuclear migratório constante dependendo da fase do ciclo celular (Jadhav et al., 2009).

A glia de Müller forma bainhas que envolvem os corpos celulares neuronais, dendritos e as fibras ópticas; em retinas avascularizadas como a de aves, esta célula é o único tipo de macroglia e assume funções desempenhadas por astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais (Giaume et al., 2007). Elas se distribuem por toda a extensão da retina envolvendo neurônios retinianos em todas as espécies de retina de vertebrados, formando pequenas unidades funcionais (Bringmann et al., 2006). Parte da interação neurônio-glia se dá através de fatores tróficos, neurotransmissores e elementos da matriz extracelular (de Melo Reis et al., 2008b). Nosso grupo tem estudado essa interação nos últimos anos (Reis et al., 2002). Estas células produzem fatores tróficos que mantêm diversas populações de neurônios periféricos (Cabral da Silva et al., 2003) e

centrais em cultura, além de induzir crescimento de neuritos, que é uma condição essencial na regeneração do sistema nervoso. (Araque et al., 2001, de Melo Reis et al., 2008a)

Evidências recentes têm revelado que as células gliais têm um papel ativo na fisiologia neuronal., atuando na comunicação celular em diversas áreas do SNC (Schwartz et al., 1994; Biedermann et al., 1995; Newman e Reichenbach, 1996; Puro et al., 1996; Lopez et al., 1997; Harada et al., 2000; Haydon, 2001; Fields and Stevens-Graham, 2002; Kubrusly et al., 2005; Lamas et al., 2005; Araque, 2006; de Melo Reis et al., 2008a). Além disso, transmissorres como o ATP, o glutamato e a D-serina podem ser liberados por células gliais, sendo denominados gliotransmissores, atuando nas interações neuro-gliais (Newman, 2003; Fellin et al., 2004; Gordon et al., 2005).

A glia de Müller expressa uma variedade de receptores de neurotransmissores como receptores gabaérgicos do tipo GABA-A e GABA-B (Malchow et al., 1989; Zhang et al., 1999), receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA-Kainato (Lamas et al., 2005), receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (Biedermann et al., 1995; Kubrusly et al., 2005), adrenérgico (Seki et al., 2005), receptores colinérgicos (Wakakura et al., 1998), receptores de peptídeos como o PACAP (Seki et al., 2006) e receptores purinérgicos (Jabs et al., 2000; Pannicke et al., 2000; Fries et al., 2005), dentre outros.

### **1.3.1- Funções**

Dentre as inúmeras funções da glia de Müller podemos destacar a remoção do excesso de glutamato do meio extracelular, através do transportador glutamato/aspartato (GLAST) encontrado nessas células e da participação no ciclo glutamato-glutamina pela conversão da enzima glutamina sintetase (GS), sendo essenciais para o ciclo de captação e metabolismo do glutamato. (Bringmann et al., 2006). A glia de Müller está igualmente envolvida no metabolismo da glicose, suprindo os neurônios com nutrientes, regulando o fluxo sanguíneo retiniano e contribuindo para a formação da barreira hemato-retinal., contribuindo na manutenção da homeostase do tecido retiniano como no controle do pH e na liberação de fatores que controlam a excitabilidade neuronal (para revisão, Bringmann et al., 2006; de Melo Reis et al., 2008b).

A glia de Müller de aves pode sofrer alteração em sua morfologia em resposta a lesões e a fatores exógenos podendo induzir a proliferação, desdiferenciação e expressão de fatores transcricionais expressos por progenitores retinianos embrionários, podendo produzir novos neurônios e glia. (Fischer et al., 2001; Fischer et al., 2003, Fischer et al., 2009).

### **1.3.2- Papel na regeneração**

Células gliais podem se tornar reativas em resposta à lesão, termo denominado gliose. Há alteração na morfologia da célula, com a superexpressão de marcadores como GFAP, podendo levar a proliferação e a desdiferenciação. (Jadhav et al., 2009). trabalhos recentes demonstram que a glia de Müller ao sofrer o processo de gliose, pode além de alterar a sua morfologia, ter o seu corpo celular migrado da CNI para a membrana limitante externa. A gliose pode gerar mudanças na glia de Müller que resultam em registros eletrofisiológicos similares aos observados em estágios imaturos, demonstrando que a glia de Müller pode se alterar em situações específicas. (para revisão, Jadhav et al., 2009).

A gliose reativa é similar em diversas regiões do SNC. A célula de Müller reativa tem um papel ambíguo, pois (i) protege o tecido lesado de sofrer mais dano através da liberação de fatores tróficos e de agentes antioxidantes, e (ii) reduz o efeito citotóxico através da captação do excesso de glutamato liberado, porém (iii) pode contribuir para a citotoxicidade através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e (iv) pode ainda promover a degeneração e impedir a regeneração do tecido pela formação da cicatriz glial (Bringmann et al., 2009).

Era demonstrado que o tratamento intra-vítreo com agentes tóxicos como o N-Metil-D-Aspartato (NMDA) ou o cainato, que produz degeneração de alguns tipos neuronais, gera uma proliferação de células da camada nuclear interna que têm uma morfologia e localização de células de Müller e que as células recém-geradas expressam marcadores de progenitores retinianos como Cash-1, Pax6 e Chx10, marcadores gliais ou de alguns tipos específicos de neurônios, como de células ganglionares que são as mais afetados pela injeção de NMDA. Isto sugere que as células de Müller, em resposta ao dano podem perder seu fenótipo glial., reentrar no ciclo celular e adquirir fenótipos de progenitores retinianos (Fischer e Reh, 2001; Fischer e Reh, 2003; Fischer, 2005).

Em um trabalho recente de 2009 foi avaliada a proliferação de neuroesferas derivadas da glia de Müller induzida por NMDA e glutamato e foi observado um aumento no número de células em proliferação e aumento na fosforilação do fator transcricional CREB (Ramirez e Lamas, 2009).

#### **1.4- Nestina e progenitores neurais**

Progenitores são células que possuem a capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em um ou vários tipos celulares, podendo ser células uni ou pluripotentes, respectivamente, tendo portanto uma capacidade limitada de proliferação, e incapacidade de formar tumores. Em contraste, as células tronco embrionárias são células que tem uma capacidade ilimitada de proliferação e podem originar todos os tipos celulares, porém com um alto potencial tumorigênico (Wiese et al., 2004).

A nestina foi identificada pela primeira vez em células neuroepiteliais, apresentando similaridades estruturais com as proteínas de filamento intermediário classe III (vimentina e desmina), mas devido a baixa homologia da seqüência de proteínas entre elas, a nestina foi classificada como proteína de filamento intermediário classe IV (Wiese et al., 2004).

Nestina é expressa em células progenitoras e com o início da diferenciação pode haver uma co-expressão de proteínas marcadoras de células diferenciadas e de nestina, mas a expressão de nestina é encontrada somente até as etapas que precedem a diferenciação (Wiese et al., 2004).

Em tecidos maduros, a expressão de nestina é restrita a células capazes de proliferar e se diferenciar. Após a lesão, algumas células podem re-expressar ou superexpressar nestina indicando a reversão da célula para um fenótipo mais imaturo (Wiese et al., 2004). Xue e colaboradores mostraram que a nestina pode ser co-expressa com GFAP em modelo de lesão retiniana podendo ser expressa na glia de Müller após glaucoma induzido (Xue et al., 2006). A glia de Müller pode expressar marcadores de progenitores revelando sua capacidade de se desdiferenciar retornando à um estágio mais indiferenciado e migrar após um dano tecidual (Tackenberg et al., 2009).

## **1.5- Definição dos sistemas neuroquímicos abordados**

### **1.5.1- Sistema catecolaminérgico**

#### **1.5.1.1. Síntese e metabolismo**

A dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (AD) são membros da classe das catecolaminas e são compostos que apresentam em sua estrutura um anel aromático catecol. As catecolaminas se originam a partir do aminoácido L-tirosina, através de uma série de reações enzimáticas. Na primeira etapa, o aminoácido L-tirosina é convertida em L-3-4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) pela enzima tirosina-hidroxilase (TH). A TH é a enzima limitante na via de síntese das catecolaminas. Na segunda etapa, a enzima dopa-descarboxilase (DDC) catalisa a reação de descarboxilação da L-DOPA que é transformada em DA. Na etapa seguinte, a DA é convertida em NA pela enzima dopamina  $\beta$ - hidroxilase (DBH) e por último a NA sofre a ação da enzima feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) dando origem a AD (Figura 5, Kuhar et al., 2006).

Após serem sintetizadas, as catecolaminas são estocadas em vesículas sinápticas para posterior liberação dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). A DA é sintetizada no citoplasma, enquanto a NA e a AD são sintetizadas dentro da vesícula, pois a enzima DBH se encontra na superfície da vesícula. As aminas são estocadas em vesículas pelos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) que se subdividem em VMAT<sub>1</sub> e VMAT<sub>2</sub>. O VMAT<sub>2</sub> está presente principalmente no sistema endócrino e o VMAT<sub>1</sub> é o tipo mais abundante no SNC (Masson et al., 1999). A liberação das catecolaminas depende de uma entrada prévia de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal pré-sináptico, que se dá pela abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem e que se abrem com a chegada de um potencial de ação no terminal. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  leva à ativação de diversas proteínas que

realizam a fusão da vesícula pré-sináptica com a membrana do neurônio, liberando, desta forma, o conteúdo na fenda sináptica.

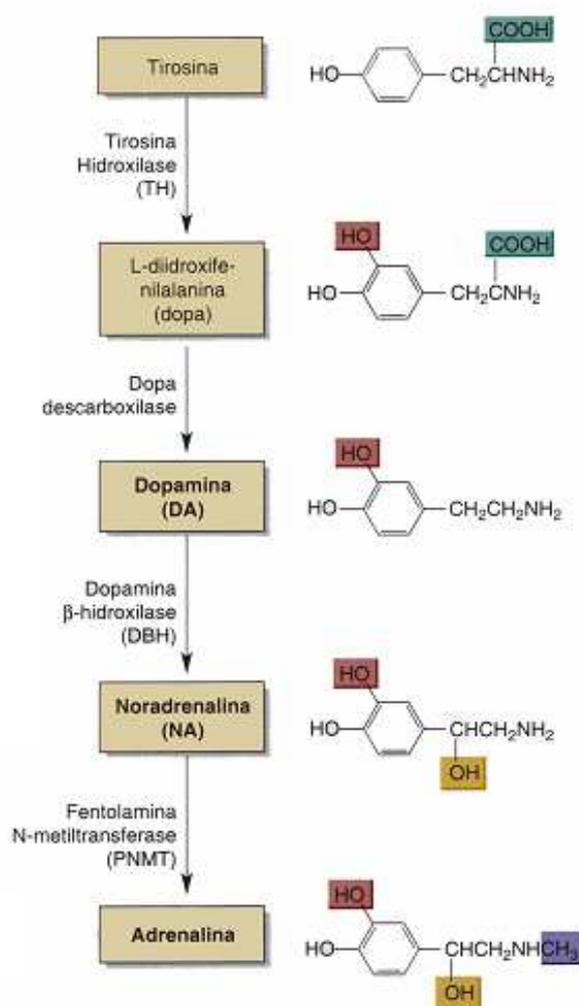


Figura 5. Biossíntese das catecolaminas DA, NA e AD a partir do aminoácido tirosina que sofre a ação da TH, enzima limitante na síntese das catecolaminas. Modificado de Kuhar et al., 2006).

Após serem liberadas, as catecolaminas são removidas da fenda sináptica, por degradação, captação ou difusão. A captação das aminas é realizada por transportadores específicos para dopamina (DAT) e noradrenalina (NET), apesar de ambas serem substratos para os dois transportadores; a captação é um processo importante que determinará a intensidade e duração da

sinalização catecolaminérgica na fenda sináptica (Torres et al., 2003). A degradação da DA e NA é realizada pelas enzimas monoamino oxidase (MAO) e a catecol-O metiltransferase (COMT) que convertem essas duas aminas em ácido homovanílico (HVA) e 3-metóxi-4-hidróxifenoglicol (MHPG), respectivamente (Hyland, 1999). As aminas que não forem recaptadas ou degradadas se difundem do sítio de liberação para outros locais onde poderão atuar em receptores ou ser transportadas de volta para o terminal onde poderão ser metabolizadas (Kuhar et al., 2006).

### 1.5.1.2. Receptores

Os receptores de DA e de NA pertencem a uma família de receptores acoplados a proteína G, uma proteína heterotrimérica com atividade GTPásica que se liga a nucleotídeos de guanina. Estes receptores disparam uma cascata de sinalização intracelular, que tem como característica a ação lenta desses transmissores. Os receptores de DA são divididos em duas famílias: Família D<sub>1</sub> composta pelos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> e a família D<sub>2</sub> com os receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> são mais prevalentes no SNC do que os receptores, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Os receptores da família D<sub>1</sub> são acoplados a uma proteína G estimulatória (G<sub>s</sub>) ativando a enzima AC (adenilil ciclase) que eleva os níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), um segundo mensageiro que possui entre outros alvos a proteína cinase A, responsável pela fosforilação de alvos biológicos (Greengard, 2001). A família de receptores D<sub>2</sub> ativa uma proteína G inibitória (G<sub>i/o</sub>) resultando na modulação de alguns canais iônicos e a inibição da proteína AC diminuindo os níveis de AMPc (Sibley, 1999; De Mei et al., 2009).

Os receptores adrenérgicos podem ser do tipo  $\alpha$ -adrenérgicos e do tipo  $\beta$ -adrenérgicos. Os receptores  $\alpha$  podem ser do tipo  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . O receptor  $\alpha_1$  está acoplado a uma proteína G<sub>q</sub> que realiza a hidrólise de lipídeos da membrana para formar dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) que ativa subtipos de proteína cinase C (PKC) e o inositol 1,4,5-trifosfato (ip<sub>3</sub>) que é

responsável pela liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . O receptor  $\alpha_2$  está acoplado a uma proteína  $G_{i/o}$  que inibe a AC reduzindo os níveis de AMPc assim como o receptor dopaminérgico  $D_2$  (Summers e McMartin, 1993).

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos podem ser do tipo  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  e todos eles sinalizam através da proteína  $G_s$ . (Summers e McMartin, 1993).

### **1.5.1.3. Sinalização na retina e na glia de Müller**

A DA é a principal catecolamina encontrada na retina de vertebrados (Kramer, 1971, Reis et al., 2007). A NA também é um neurotransmissor sináptico retiniano, entretanto a NA e AD na retina devem ser provenientes de fibras nervosas simpáticas (Osborne, 1981; Ehinger e Steinbusch, 1985). A DA é encontrada em um subtipo de célula amácrinas (Dowling and Ehinger, 1978; Gardino et al., 1993), baseado na marcação para TH, a enzima limitante na síntese da DA como um marcador de células dopaminérgicas. As enzimas necessárias para a síntese das catecolaminas, assim como seus receptores são encontrados na retina. A enzima DDC, que converte a L-dopa em DA é expressa na retina de aves em E8 (no 8º dia embrionário), antes da expressão da enzima TH, que precede a DDC na via de síntese das catecolaminas (Gardino et al., 1993). Além disso, a enzima DDC é capaz de converter a L-dopa em DA nesse tecido através do suprimento de L-dopa do epitélio pigmentado, onde a L-dopa é sintetizada pela enzima tirosinase (Kubrusly et al., 2003).

Os receptores dopaminérgicos são expressos precocemente na retina de aves, sendo que o receptor  $D_1$  é expresso por volta de E7 e nesse estágio não há sinapses na retina, que se iniciam na CPI em E11/E12, concomitantemente com a expressão do receptor  $D_2$  (De Mello, 1978; Ventura et al., 1984). É sabido que receptores dopaminérgicos na glia de Müller de aves são funcionais e sua ativação leva ao acúmulo de mensageiros secundários, como o AMP cíclico

(Kubrusly et al., 2005). Resultados prévios demonstraram que na retina de algumas espécies os receptores dopaminérgicos podem ser ativados por outras catecolaminas, como a NA (Vanderheyden et al., 1986; Robbins et al., 1988). O receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> é expresso em idades precoces durante o desenvolvimento da retina de aves, e nesse estágio o receptor não possui uma especificidade para a DA podendo ser ativado por NA com afinidade similar a DA (Kubrusly et al., 2007). Nesse trabalho foi descrito que na retina de pinto embrionária a DA e a NA aumentavam os níveis de AMPc e que a estimulação com NA observada era bloqueada com SCH 23390 (SCH, um inibidor do receptor D<sub>1</sub>), mas não com propranolol (um inibidor do receptor  $\beta_1$ ), mostrando que na retina embrionária o receptor D<sub>1</sub> atua de forma promíscua, sendo ativado também por NA de forma similar à DA. Neste estágio do desenvolvimento não há expressão do receptor  $\beta_1$ , apenas o D<sub>1</sub> está presente. Por outro lado, em estágios pós-eclosão os receptores D<sub>1</sub> e  $\beta_1$  estão presentes e são funcionais, sendo ativados especificamente por DA e NA, respectivamente. (Kubrusly et al., 2007)

Na glia de Müller embrionária em cultura *in vitro* já foi descrita a expressão de enzimas e receptores associados ao fenótipo catecolaminérgico como a: TH, DDC, DAT e os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (Kubrusly et al., 2005; revisado por Reis et al., 2007).

A DA assume diversas funções na retina, destacando-se o controle do sinal luminoso favorecendo os cones (Witkovsky, 2004), a inibição do desenvolvimento dos cones de crescimento e do crescimento neurítico em neurônios retinianos (Lankford et al., 1987) e o controle da morte celular programada levando à uma sobrevida de neurônios na retina em desenvolvimento (Varella et al., 1999). A DA participa ainda da atividade neural espontânea concomitante com um aumento nos níveis de AMPc e da atividade da PKA (Dunn et al., 2006; Reis et al., 2007).

## 1.5.2- Sistema Purinérgico

### 1.5.2.1. Síntese e metabolismo

A molécula de adenosina trifosfato (ATP) era descoberta por Lohman e Fiske e por Subbarow simultaneamente em 1929. Algumas décadas mais tarde, Holton observou que o ATP era co-liberado com a NA, e em 1972 era introduzido o conceito de transmissão purinérgica por Burnstock que demonstrou que o ATP preenchia todos os critérios para ser definido como um neurotransmissor (revisado por North e Vekhratsky, 2006).

O ATP pode ser acumulado em vesículas com outros neurotransmissores e estar sujeito a co-liberação no SN. O ATP é co-liberado com GABA e glutamato no SNC e com acetilcolina e NA no SN periférico. O ATP pode ainda ser estocado em vesículas próprias e ser liberado, ou pode ser liberado por um mecanismo não-vesicular, através de hemicanais de junções do tipo junção comunicante ou por receptores P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> dilatados (Fields e Burnstock, 2006; North e Vekhratsky, 2006). Dados recentes mostram que além de conexinas que formam as junções comunicantes, as panexinas podem participar ativamente dos poros formados por receptores P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> (Pelegriin e Surprenant, 2006; Locovei et al., 2007). Após ser liberado, o ATP é rapidamente hidrolisado e é convertido em adenosina por ectonucleotidases.

Os receptores P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> operam através de um canal catiônico não-seletivo ativado por baixas concentrações de ATP, enquanto altas concentrações induzem a formação de um poro que permite o fluxo de moléculas de até 900 Da, podendo levar inclusive ao processo de morte celular. Ainda é desconhecido o processo de associação e expressão do canal do receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> com poros com permeabilidade para células do sistema imune e nervoso, porém dados muito recentes sugerem duas entidades diferentes mediadas por aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Faria et al., 2009).

### **1.5.2.2.Receptores**

Os receptores purinérgicos são distinguidos em dois tipos, receptores  $P_1$  quando ativados por adenosina e receptores  $P_2$  quando sensíveis ao ATP e seus análogos. Os receptores  $P_2$  eram divididos em dois grupos: família de receptores  $P_2X$ , caracterizados por apresentarem um canal iônico na sua estrutura e que possui sete subtipos ( $P_2X_{1-7}$ ) e família de receptores  $P_2Y$ , de natureza metabotrópica e que possui no mínimo oito subtipos ( $P_2Y_1, P_2Y_2, P_2Y_4, P_2Y_6$  e  $P_2Y_{11-14}$ ) (revisado por Burnstock e Knight, 2004). Os receptores  $P_2Y$  são constituídos de proteínas com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, podendo ser  $G_q/11$ ,  $G_s$  e  $G_i$  (Fields e Burnstock, 2006; Burnstock, 2006).

Os receptores  $P_2X$  são constituídos de canais iônicos permeáveis a  $Ca^{2+}$  formados por homo ou hetero-oligômeros, sendo que  $P_2X_7$  é o subtipo mais divergente dessa família em termos farmacológicos, estruturais e funcionais (North, 2002; Faria et al., 2009).

### **1.5.2.3.Sinalização na retina e na glia de Müller**

Na retina, o ATP é um importante neurotransmissor, liberado no tecido através de um mecanismo dependente de  $Ca^{2+}$  e envolvido na modulação dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Perez et al., 1986; Newman, 2001). O ATP pode ainda atuar na regulação da proliferação celular (Sanches et al., 2002; Nunes et al., 2007). Na retina, existe a expressão de receptores purinérgicos  $P_2X$  e  $P_2Y$ .

O ATP é liberado na glia de Müller que expressa os receptores purinérgicos ionotrópicos  $P_2X_3, P_2X_4, P_2X_5, P_2X_7$  (Jabs et al., 2000; Pannicke et al., 2000) e os metabotrópicos  $P_2Y_1, P_2Y_2, P_2Y_4, P_2Y_6$  (Fries et al., 2005), sugerindo que as células de Müller respondem de forma diversa ao ATP.

Para analisar a sinalização purinérgica na retina, eram realizados estudos de imageamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do nosso grupo na Universidade de Coimbra, Portugal na presença de ATP. Culturas de glia de Müller eram tratadas com uma sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  (fura-2, Figura 6A). A aplicação de ATP aumenta a fluorescência nas células gliais, resultado da ativação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Era observado também a expressão do  $\text{P}_2\text{X}_7$  nas culturas de células de Müller de camundongos (Figura 6B), já que é sabido da presença destes receptores em células gliais humanas (Pannicke et al., 2000).

Era observado um efeito similar ao ATP na fluorescência de  $\text{Ca}^{2+}$  quando as células eram tratadas com um agonista seletivo de  $\text{P}_2\text{X}_7$ , Benzoil-ATP (BzATP). As respostas eram seletivamente bloqueadas pelo antagonista  $\text{P}_2\text{X}_7$  *brilliant blue G* (BBG) na faixa de  $1\mu\text{M}$  (Faria et al., 2009).

As células de Müller expressam inúmeros receptores e enzimas que sintetizam neurotransmissores (Kubrusly et al., 2005), porém nem todas essas moléculas estão ativas. Muito embora receptores glutamatérgicos e GABAérgicos sejam encontrados no nosso modelo, é fato que a sinalização que medeia respostas de  $\text{Ca}^{2+}$  é seletiva. Como observado na figura 7A, o aumento de fluorescência em culturas purificadas de Müller se dá quando ativadas por ATP  $1\text{ mM}$ , mas não por  $10\mu\text{M}$  AMPA,  $1\text{ mM}$  GABA ou  $40\text{ mM}$   $\text{K}^+$ , agentes capazes de aumentos significativos de fluorescência em culturas mistas, purificadas de neurônios ou de neuroesferas de retina (de Melo Reis et al. em preparação).

Outra evidência da participação dos receptores  $\text{P}_2\text{X}_7$  na sinalização neuro-gliar retiniana nas culturas de Müller seria na mediação da liberação de transmissores. Estudos do nosso grupo mostraram a liberação de [ $^{14}\text{C}$ ] glutamato por células de Müller quando ativadas por ATP, por um processo inibido por BBG (Figura 7B)..

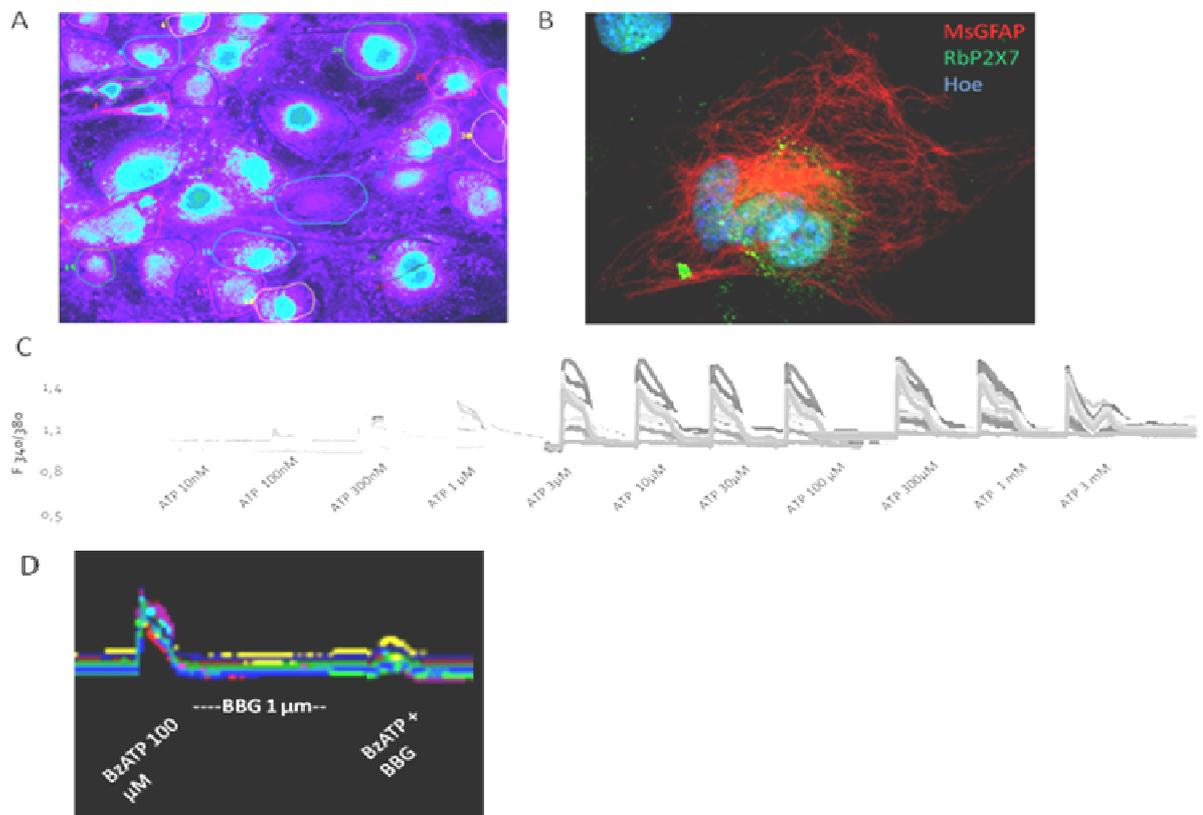


Figura 6. Sinalização por  $P_2X_7$  na glia de Müller. A. Fotomicrografia de células de Müller de camundongo em culturas tratadas com  $5 \mu\text{M}$  fura-2 para estudos de variação de fluorescência. B. Estas células fixadas reagem com o anticorpo anti-GFAP (vermelho) e com anticorpo contra  $P_2X_7$  (em verde). C. A aplicação de concentrações de ATP aumenta a fluorescência nas células gliais, resultado da ativação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

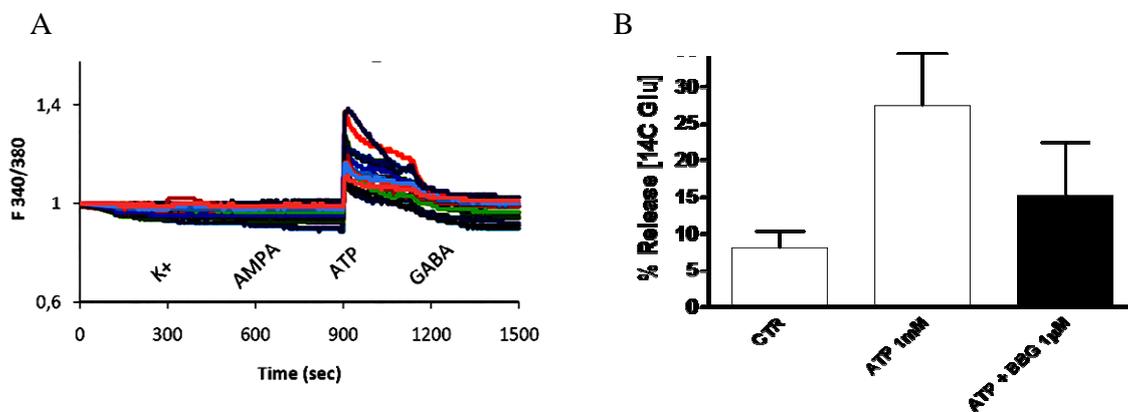


Figura 7. Respostas da ativação de receptores purinérgicos. A. As variações intracelulares de cálcio livre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) seletivamente ativada por ATP em células individuais de glia de Müller B. Liberação de  $[C^{14}]$  glutamato de células de glia de Müller por ATP é parcialmente inibida por  $1\mu M$  BBG.

## **2. Objetivos**

### **2.1- Objetivo geral:**

- Investigar a sinalização catecolaminérgica e purinérgica em culturas de células de Müller de aves e camundongos e avaliar seu efeito na modulação do fenótipo dessas células.

### **2.2- Objetivos específicos:**

- Verificar se o receptor beta-adrenérgico está expresso e funcional em cultura de células de Müller de aves e camundongos, e comparar com o padrão funcional de ativação do receptor D<sub>1</sub> dopaminérgico em termos de acúmulo de AMPc.
- Avaliar a sinalização purinérgica em culturas de glia de Müller de camundongos pós-natais através da permeabilização celular com o iodeto de propídeo
- Avaliar se a incubação de DA e NA e de ATP levaria a expressão de nestina em culturas de células de glia de Müller.

### 3- Matérias e Métodos

#### 3.1- Materiais

Ácido ascórbico, DAPI, poli-L-lisina, Dnase tipo I e II, laminina (Invitrogen), tripsina (Worthington Biochemical Corporation), Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco ou do Biocampo). Meio de cultura celular, meio basal de Eagle (MEM do inglês, *Basal Medium Eagle*) e Meio basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Invitrogen, SP). Placas de cultura (24 poços, 4 poços, 35mm, 60mm ou 90mm Nunc, Corning ou TPP). Albumina bovina sérica (BSA, do inglês, *Bovine Serum Albumin*; Hepes, L-Glutamato, Glicina, GABA, PPO, POPOP, KA, leupeptina, aprotinina, gelatina, PMSF, Tris base, DAB, NMDA (Sigma).

**Anticorpos:**  $\beta_1$  adrenérgico: Rabbit, SC568, 1:500, Santa cruz, SC568;  
Secundário: Anti-Rabbit: 1:10000, Sigma  
Nestina: Mouse mAb 353, 1: 200 chemicon, MAB353;  
GFAP: Rabbit, 20334 1:500, Dako, 20334;  
GS: Rabbit, 1:400, abcam.  
Alexa 488: Mouse, 1:400, Molecular Probes, A11029  
Alexa 555: Rabbit, 1:400 Molecular Probes, A21429

## 3.2- Métodos

### 3.2.1- Obtenção de Cultura de Glia de aves

Eram utilizados ovos de galinha da raça *White Leghorn* obtidos de uma granja local (Tolomei, Rio de Janeiro) em diferentes idades, e os embriões eram estagiados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Os protocolos experimentais de obtenção de retinas eram aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais (CCS), protocolo N° IBCCF-035.

Aves com idade embrionária de nove dias (E9) eram decapitados, seus olhos eram removidos, as retinas eram dissecadas em um meio livre de cálcio e magnésio (CMF: 131mM de cloreto de sódio, 4,09 mM de cloreto de potássio, 0,92 mM de fosfato dibásico de sódio, 0,45 mM de fosfato monobásico de potássio, 9,4 mM de bicarbonato de sódio e 12,2 mM de glicose).

Após a dissecação as retinas eram incubadas por 10 minutos a 37°C com tripsina 0,05%, e então o material era centrifugado, sendo o sobrenadante removido e as retinas eram dissociadas mecanicamente com DMEM contendo gentamicina (10µg/mL) e 10% soro fetal bovino (SFB). As células dissociadas eram adicionadas à uma placa de cultura e mantidas em uma estufa a 37° C sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. A primeira troca de meio era feita no dia seguinte ao plaqueamento (E9C1, idade embrionária de 9 dias, um dia de cultura) para remover as células não aderidas ou mortas, além de restos celulares oriundos da dissociação mecânica do tecido. A partir deste ponto o meio de cultura era trocado a cada dois dias. Após atingir a confluência as culturas eram tratadas com ácido ascórbico 4mM por 2 horas, método descrito por Reis e colaboradores (2002), e dessa forma os neurônios eram eliminados, obtendo-se assim uma cultura purificada de glia. As culturas eram lavadas uma vez com DMEM, eliminando os resíduos de

ácido ascórbico e os restos de membrana dos neurônios lesados, e incubada com DMEM + 10% SFB por pelo menos 12 horas. As culturas eram encaminhadas para imunocitoquímica, western-blot e dosagem de AMPc.

### **3.2.2- Obtenção de Cultura de Glia de camundongo**

Camundongos da raça C57/Black6 do biotério do Departamento de Anatomia Humana (UFRJ) e do biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho eram acasalados (1 macho jovem com pelo menos 4 fêmeas) que forneciam ninhadas semanalmente com 3-12 animais, que eram usados nos estágios determinados.

Camundongos P0-P4 eram sacrificados por decapitação e tiveram os olhos removidos e enucleados sob lupa, onde a retina era removida livre de epitélio pigmentado e humor vítreo. Inicialmente, eram feitas culturas diluídas (baixa densidade celular – cerca de  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) de retina total que permaneceram em estufa úmida a 37°C, até que a glia atingisse confluência. Após confluência, estas culturas eram submetidas a um tratamento com 4 mM de ácido ascórbico por aproximadamente 3 horas sendo observadas em intervalos de 30 minutos para monitoramento do grau de lesão neuronal. Após a retirada dos neurônios, a monocamada de glia de Müller presente era encaminhada para os ensaios de sinalização, imunocitoquímica, fluorescência baseadas em imagem por Ca<sup>2+</sup> e ensaios de permeabilização.

### **3.2.3- Determinação do AMPc**

As culturas purificadas de glia eram pré-incubadas por 15 min a 37°C em MEM (20 mM HEPES, pH 7,35) acrescido de 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), (um inibidor da fosfodiesterase), 100 µM de pargilina (inibidor da MAO/COMT) e 100 µM de ácido ascórbico. Posteriormente, as amostras eram incubadas com os agonistas (NA ou DA) e/ou antagonistas

(SCH ou propranolol), se necessários, por 15 min. A reação era interrompida com a adição de 100µl de ácido tricloroacético (TCA) a 100 %, além de 1mL de TCA a 5% (final 7,5%) e o material era congelado a -20°C para ser usado na próxima etapa.

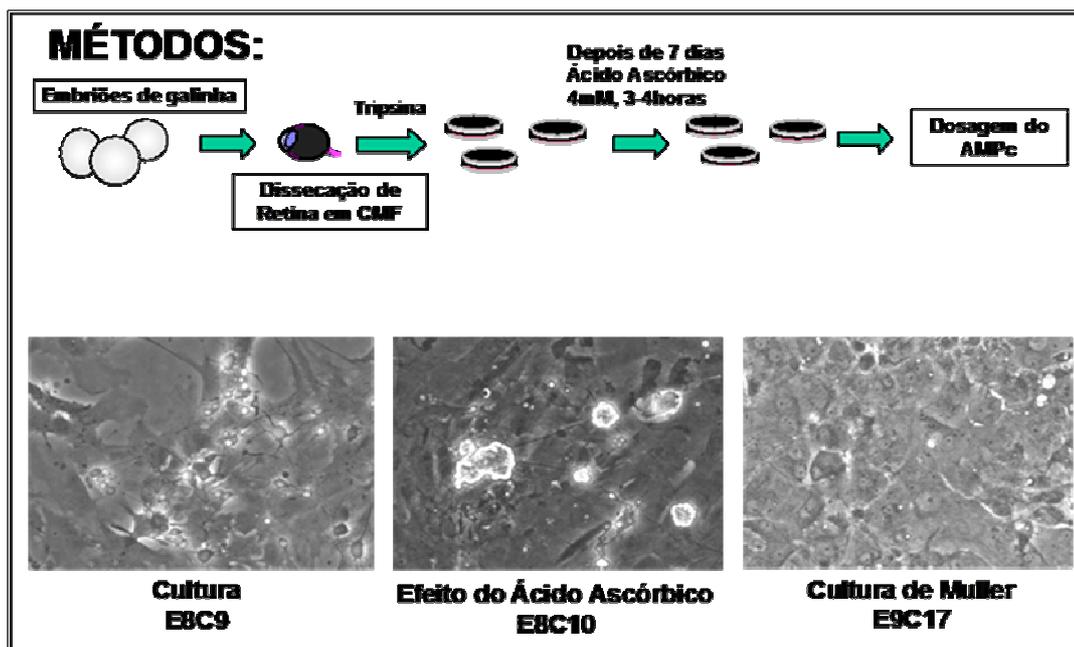


Figura 8. Preparação da cultura para dosagem de AMPc. Retinas E8 eram dissecadas, os neurônios eram eliminados no 8º dia. As culturas eram tratadas com DA ou NA por 15 min, após o tratamento as células eram raspadas e os níveis de AMPc eram quantificados. Fotos modificadas de Reis et al., 2002.

Após descongelamento das amostras, adicionou-se um padrão de AMPc ( $^3\text{H}$ - AMPc – 20 nCi) e após centrifugação (15000 rpm, Sorvall, rotor 5534), o sobrenadante era colocado em colunas contendo uma resina de troca iônica (Dowex AG50W-X4) para que o TCA fosse retirado, método descrito por Matsuzawa e Nirenberg (1975). O precipitado era então dissolvido em NaOH a 0,1 N e a concentração de proteína analisada pelo método de Lowry e colaboradores al., (1951). Nas colunas era adicionado um volume de 6 mL de água que era descartado, e em seguida eram feitas três eluições de 3 mL cada que eram coletadas e colocadas em um filtro

(Milipore), sendo a radioatividade mensurada em um contador de cintilação líquida. A fração que tivesse uma maior recuperação de AMPc era então utilizada para dosagem do nucleotídeo cíclico.

A alíquota selecionada na etapa anterior para avaliar o AMPc passou por um ensaio competitivo de ligação com a proteína cinase A (PKA) através do método descrito por de Mello (1978), adaptado de Gilman (1970).

As amostras eram adicionadas em um tubo contendo tampão acetato de sódio pH 4,0, [<sup>3</sup>H]AMPc e PKA. O material era mantido em gelo a 4°C por 90 min e a reação era interrompida com a adição de tampão fosfato de sódio pH 6,0. Após isso, as amostras eram colocadas em um filtro de nitrocelulose (Milipore) e estes eram secos em uma estufa a 100°C por 10 min. A radioatividade era medida em um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR).

### **3.2.4- Imunocitoquímica**

As culturas enriquecidas de glia preparadas em placas de 90 mm eram periodicamente repicadas para os diversos experimentos listados utilizando tripsina 0,05% (final) por 10 minutos à 37°C. O material era centrifugado, o sobrenadante removido e as células eram dissociadas mecanicamente com DMEM com 10% SFB. As células eram dissociadas e depositadas em placas de cultura contendo lamínulas, obtendo-se assim uma cultura de segunda passagem, e o meio era trocado no dia seguinte e após 3 dias as placas eram tratadas com os agonistas: DA, NA e ATP em diferentes condições experimentais.

As culturas eram então lavadas com PBS completo (136 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 8 mM de fosfato dibásico de sódio, 1,47 mM de fosfato monobásico de potássio, 0,68 mM de cloreto de cálcio e 0,49 mM de sulfato de magnésio, pH 7,4) e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min. Em seguida eram incubadas com uma solução de bloqueio contendo BSA a 3%, e detergente tween 20 a 0,01% por 30 min. Após isso as lamínulas eram

incubadas com o anticorpo primário *overnight*. Os anticorpos primários utilizados neste trabalho eram anti-nestina (mAb 353, 1:200 chemicon), anti-GFAP (Rb Dako, 1:500), e anti-GS (Rb abcam 1:450). No dia seguinte as amostras eram lavadas com tampão fosfato e incubadas com o anticorpo secundário por 2 h. Eram utilizados anticorpos secundários Alexa 555 e Alexa 488. Para visualização do núcleo as amostras eram coradas com DAPI, e após isso as amostras eram lavadas e as lâminas montadas na presença de n-propil-galato em PBS. As amostras eram analisadas em um microscópio Confocal LSM 510 Meta Zeiss ou Apotome, Zeiss utilizando o programa LSM Image Browser. As objetivas utilizadas eram de 20x ou 40x. O tempo de exposição ao laser era igual entre as amostras assim como nas modificações na imagem.

### **3.2.5- Imunodeteccção de Proteínas (*Western Blot*)**

Células de glia de pinto ou camundongo cultivadas em placas de 6 poços, ou mantidas em suspensão em tubos *ependorf*, eram lisadas com tampão apropriado adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (NP-40 1%; deoxicolato de sódio 0,25%; NaCl 15mM; PMSF 1 mM; aprotinina 5µg/mL; pepstatina 5µg/mL; leupeptina 5µg/mL; NaF 1mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM) e os extratos eram coletados. As concentrações de proteína de cada amostra eram calculadas através da construção da curva padrão pelo método descrito por Bradford. (Bradford, 1976). As amostras de cada condição eram diluídas em tampão de carregamento SDS 4x (0.25M Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 30% glicerol, 0,02% azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol) para uma concentração final de 2 µg/µL de proteína, fervidas por 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, contendo Tris 0,5M pH 8,8, acrilamida 30%, bisacrilamida 0,9%, persulfato de amônia APS10%, TEMED) numa concentração de 10% (p/v), utilizando Tampão de corrida SDS (Para 1L: 3,03g de Tris base, 14,4g de glicina, 1g de SDS).

As proteínas do gel eram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose em cuba *Semi dry Transfer Cell* (BioRad) sob voltagem de 10V por 40 minutos, utilizando tampão de transferência (para 1L: 25mM Tris pH 8,5, 0,2M glicina, 20% metanol).

A membrana de nitrocelulose era incubada em solução de vermelho de *Ponceau* para verificar a eficiência da transferência e logo após lavada com água deionizada. A membrana era bloqueada por 30 minutos com PBS contendo 1% caseína e após o bloqueio era então incubada por 12 h a 4°C com anticorpos contra o receptor  $\beta_1$  adrenérgico. A incubação com os anticorpos secundários era de uma hora a temperatura ambiente após lavagem com solução tamponada de TBS (Para 1L: 6,1g Tris, 9g NaCl, pH 7,6), adicionada de 0,1% Tween (TTBS do inglês, *Tween-Tris Buffered Saline*). Os anticorpos secundários eram conjugados à peroxidase (Sigma) e a revelação da membrana era com o Kit ECL-Plus (Amersham).

### **3.2.6- Ensaios de permeabilidade induzidos por ATP**

A permeabilidade induzida por ATP era avaliada em células de Müller mantidas em meio DMEM + 10% SFB em placas de 96 poços previamente transferidas de lotes realizados em placas de 90 mm. Um dia antes do experimento, o meio era trocado para DMEM, e no dia cada poço era lavado por 2 vezes com solução salina (PBS). ATP ou BzATP eram adicionados por 15 min na presença ou não do antagonista  $P_2X_7$  (BBG). A permeabilização era observada pela captação do corante iodeto de propídeo (2 $\mu$ g/mL). Este era preparado em solução PBS e adicionado nos 5 min finais de um total de 15 minutos de tratamento à 37°C. Após o período de tratamento, as culturas tinham a solução trocada por PBS, para serem observadas em microscopia de fluorescência (Nikon TE2000S, Nikon, Japão), onde fotos eram realizadas utilizando objetiva de 20x em campo claro e em fluorescência com o filtro de comprimento de onda de imersão da

rodamina(filtro de excitação 540-580nm). As fotografias eram tiradas com o mesmo tempo de exposição. Eram realizados dois experimentos em quadruplicata e três campos eram observados.

### **3.2.7- Análise estatística**

A maioria dos resultados era expressa como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata, caso contrário o número (N) está indicado nas legendas das figuras. Diferenças eram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

A análise estatística era realizada com o auxílio do programa Graphpad Prism aplicando-se o teste de análise de variância (*One-way ANOVA*), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni.

## 4- Resultados

### 4.1- Detecção do receptor $\beta_1$ adrenérgico em cultura de células de Müller.

Para a detecção do receptor  $\beta_1$  adrenérgico nas culturas de glia, estas eram lavadas e as proteínas analisadas por *Western Blot*. A análise feita nessas culturas enriquecidas de glia demonstrou através da utilização de um anticorpo específico policlonal anti-coelho a expressão de uma banda de aproximadamente 53 kDa que corresponde à descrição do receptor  $\beta_1$ -adrenérgico conforme mostrado na Figura 9. Como controle de carregamento, utilizamos um anticorpo anti-tubulina contra as amostras aplicadas (55 kDa).

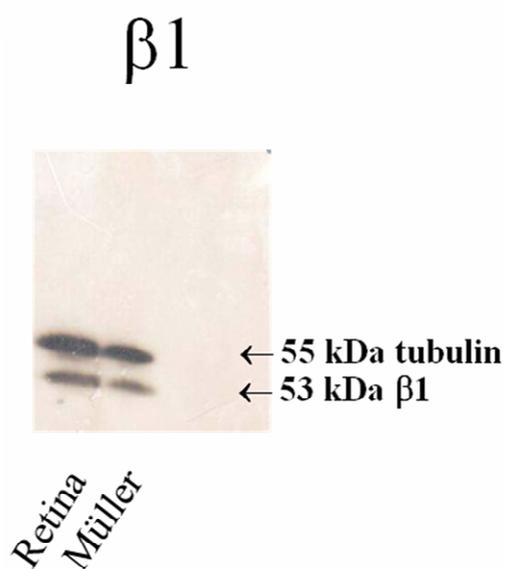


Figura 9. Expressão do receptor  $\beta_1$  adrenérgico (53 kDa) em culturas de células de Müller de aves e de retina pós-eclosão de aves (esquerda). Observar controle de carregamento–tubulina, 55 kDa. N=2.

#### **4.2- Acúmulo de AMPc por catecolaminas em cultura de células Müller de aves**

Resolvemos avaliar se a adição de 100  $\mu\text{M}$  de NA ativaria os receptores  $\beta_1$ - adrenérgicos expressos em culturas de glia de Müller de pinto através da via clássica (ou seja, bloqueado por um antagonista  $\beta_1$ , como o alprenolol ou propranolol, e não bloqueado por um antagonista  $D_1$ , como o SCH 23390). Essa seria a resposta observada para retinas pós-natais de aves (Kubrusly et al., 2007). Por outro lado, a resposta poderia ser semelhante à observada em retinas imaturas (tal qual a observada no tecido embrionário de aves), onde a NA se liga ao receptor  $D_1$  dopaminérgico de forma promíscua. Para isso, era utilizado um protocolo experimental onde a interação de um ligante com seu receptor era avaliada através da mobilização de AMPc via ativação de receptor acoplado à proteína  $G_s$  e da AC.

A administração aguda de 100  $\mu\text{M}$  DA (15 min) em culturas de Müller E9C14 purificadas de embriões de aves promoveu um aumento nos níveis intracelulares de AMPc em cerca de 2,5 vezes( Figura 10) e esse efeito era totalmente bloqueado por SCH 23390, um antagonista do receptor  $D_1$ , como demonstrado por Kubrusly e colaboradores (Kubrusly et al., 2005). A adição de 100  $\mu\text{M}$  NA também induziu um aumento nos níveis de AMPc, semelhante ao observado com a adição de DA. O efeito da NA não era alterado por 10  $\mu\text{M}$  propranolol, um inibidor do receptor  $\beta_1$ - adrenérgico, entretanto a aplicação de SCH 23390 inibiu parcialmente a ação da NA, evidenciando que nesse tecido a NA atua através do receptor  $D_1$  (Figura 10).

Esses resultados sugerem que na glia de Müller de pinto o receptor  $\beta_1$ - adrenérgico está presente, e parece não ser funcional para o aumento clássico de AMPc nas culturas de forma semelhante ao encontrado na retina embrionária de aves.

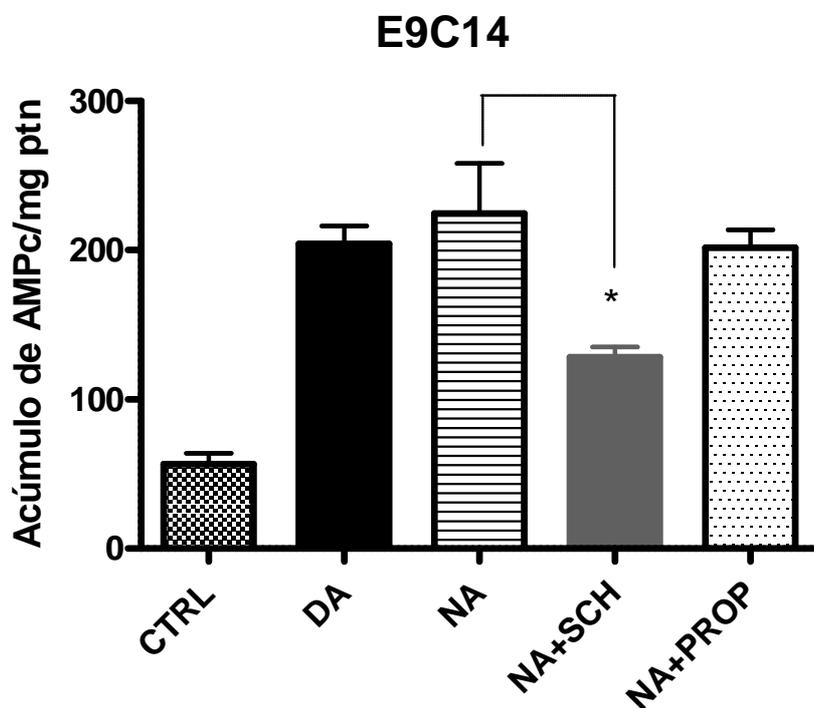


Figura 10. Sinalização por DA e NA na glia de Müller de aves. Acúmulo de AMPc em culturas de células de glia de Müller de aves de 9 dias embrionários mantidas 14 dias em cultura após a estimulação de 15 minutos com DA ou NA (100  $\mu$ M) na presença ou ausência de inibidores de seus receptores SCH 23390 (2 $\mu$ M) e propranolol (10  $\mu$ M), respectivamente. N=3 em duplicata. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3- Acúmulo de AMPc por catecolaminas em cultura de células de Müller de camundongos

A adição de 100  $\mu$ M DA em culturas P1C17 derivadas de retina pós-natal de camundongos promoveu um aumento em cerca de 10 vezes de AMPc através do receptor  $D_1$ , visto que esse efeito totalmente bloqueado por 2  $\mu$ M SCH 23390 (Figura 11). De forma semelhante, a adição de 100  $\mu$ M NA induziu acúmulo nos níveis intracelulares de AMPc (Figura 11) e este efeito era totalmente bloqueado com 10  $\mu$ M propranolol e não modificado na presença de 2  $\mu$ M SCH 23390. Esses dados demonstram que na glia de Müller de camundongo, diferente

do observado para as culturas de glia de Müller obtidas de embriões de pinto, a ativação de AMPc por NA segue a via clássica, ou seja, através do receptor  $\beta_1$ , e o receptor  $D_1$  não é ativado por NA, somente por DA especificamente.

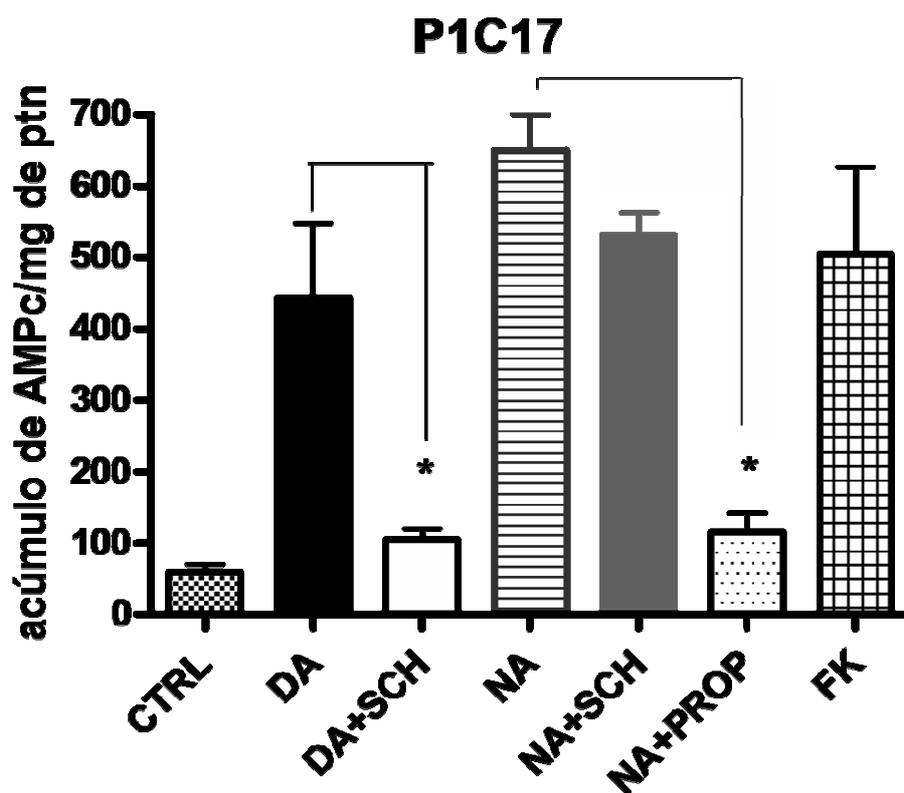


Figura 11. Sinalização por DA e NA (100 $\mu$ M) na glia de Müller de camundongo em cultura. Acúmulo de AMPc em culturas de células de camundongo pós natal (P1) mantidas 17 dias em *in vitro*. As células eram estimuladas por 10 minutos com DA e NA (100 $\mu$ M) na presença ou ausência de inibidores de seus receptores, SCH (2 $\mu$ M) e propranolol (10 $\mu$ M), respectivamente. N=2 em triplicata. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.4- Expressão de Nestina induzida por catecolaminas

Era descrito recentemente a ativação de glia de Müller *in vitro* e *in vivo* por neurotransmissores, como o glutamato ou NMDA. Neste estudo, o glutamato e agonistas glutamatérgicos promoveriam a proliferação e a fosforilação da proteína ligadora de AMPc (CREB) como requisitos iniciais para um possível processo de desdiferenciação da glia (Ramírez e Lamas, 2009). Com o intuito de verificar se catecolaminas exerceriam um efeito nessa desdiferenciação através da análise da expressão de nestina, tratamos culturas de células de Müller purificadas com 100  $\mu$ M DA e NA por 12 h ou 24 h. As Figuras 12 e 15 ilustram culturas de glia que expressam GS, um marcador de células de glia de Müller (imunoreagidas com o anticorpo secundário alexia 594nm - vermelho) tanto em culturas controle quanto em células que receberam os agonistas por 12 h. Podem ser observadas células de Müller marcadas em verde (imunoreagidas com o anticorpo secundário alexa 488nm) revelando a expressão de nestina, um marcador de progenitor quando desafiadas com 100  $\mu$ M DA. Utilizamos também o microscópio confocal para analisar a indução da expressão de nestina e de GFAP, um marcador de glia reativa induzidos por DA e NA por 24 h (Figura 13 e 16). Para verificar se o tratamento com DA era específico e via receptor D<sub>1</sub>, utilizamos o inibidor SCH 23390. Como observado, enquanto culturas controle apresentam células gliais positivas para GS e poucas células positivas para nestina, a adição de 100  $\mu$ M DA induz um aumento no número de células nestina positivas, efeito totalmente inibido pela co-adição do antagonista D<sub>1</sub> dopaminérgico SCH 23390 (Figura 14). De forma análoga, a adição de 100  $\mu$ M NA por 12h induz a expressão de nestina em células duplamente marcadas com GS (Figura 15), e o efeito da expressão de nestina é totalmente inibido na presença do antagonista  $\beta$ -adrenérgico propanolol em culturas de glia (Figura 17). A quantificação desses experimentos está representada na Figura 18 (n=2 em triplicata).

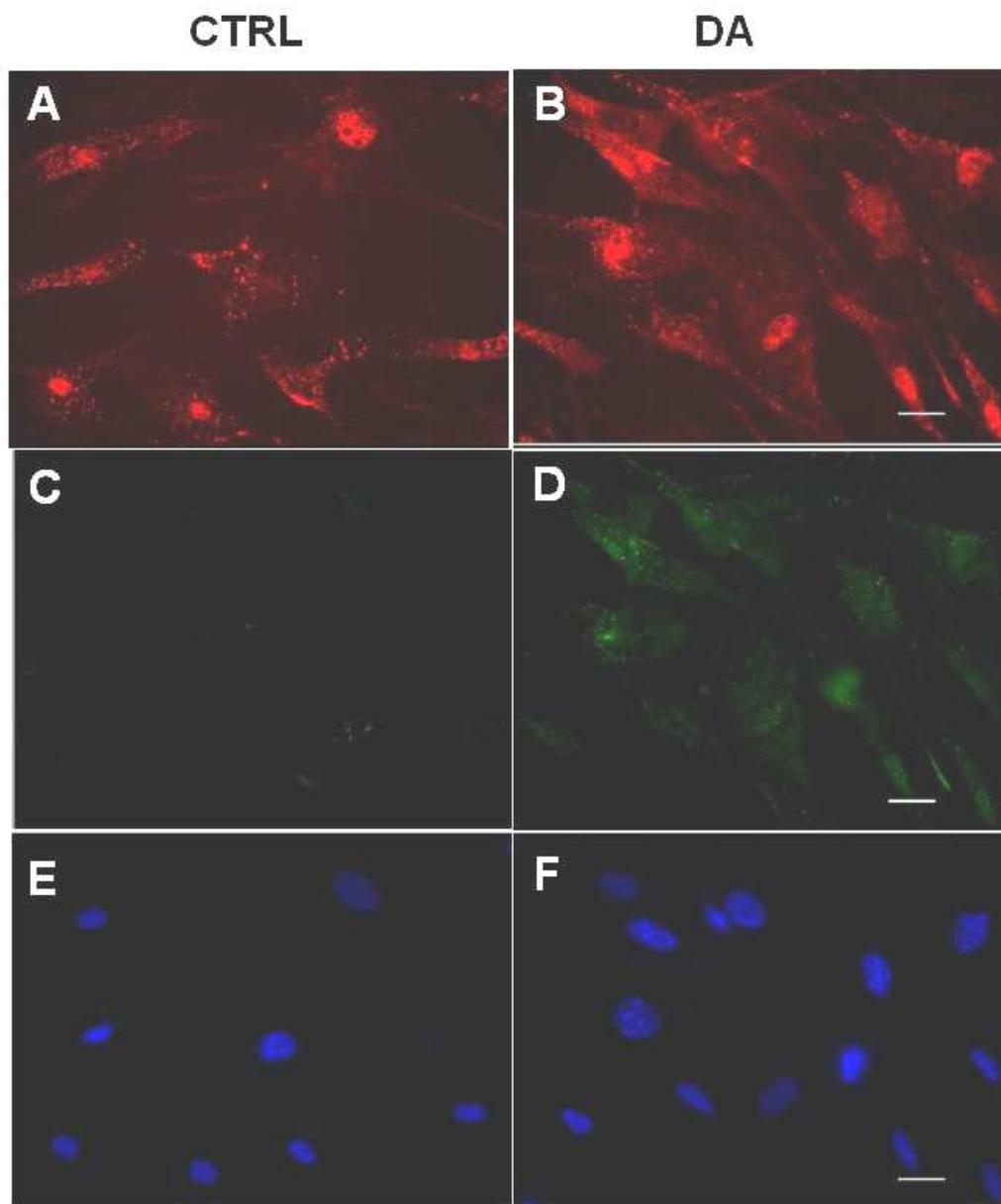


Figura 12: Expressão de nestina em células de Müller em culturas tratadas com DA por 24 h. (A, C, E) Fotomicrografia de células de Müller em condições controle (CTRL); ou (B, D, F) tratadas com 100  $\mu$ M DA. (A, B) Marcação para GS em vermelho, (B, C) nestina em verde e (E, F) marcação nuclear em azul (DAPI). Barra de calibração 20 $\mu$ m.

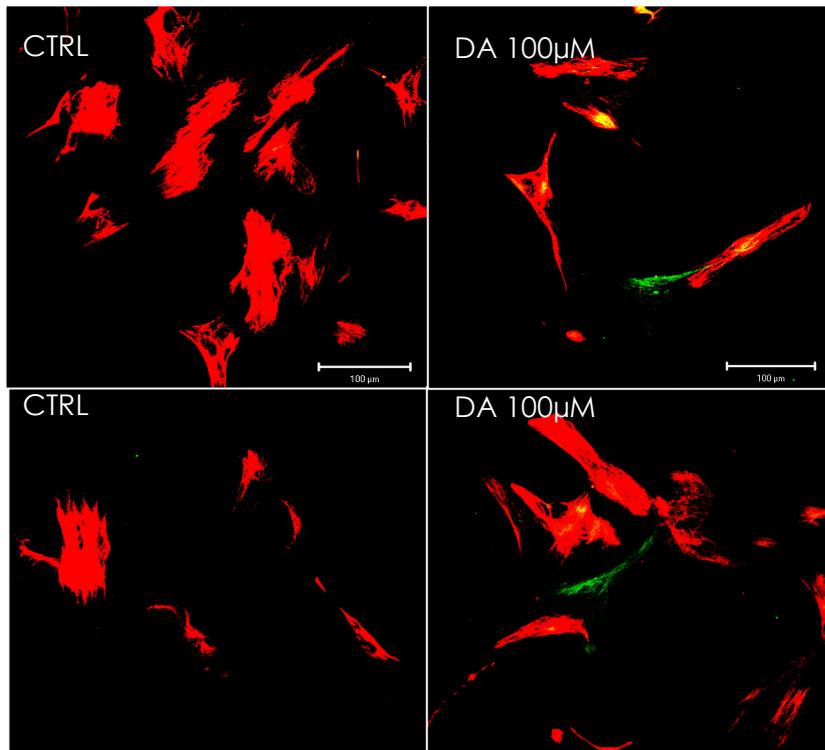


Figura 13: Coexpressão de nestina (verde) e GFAP (vermelho) em células gliais em cultura tratadas com 100  $\mu$ M DA. Imagens colocalizadas obtidas no Microscópio Confocal de células de glia de Müller de camundongos controle e tratadas por 24 h com DA. Barra de calibração 100 $\mu$ m.

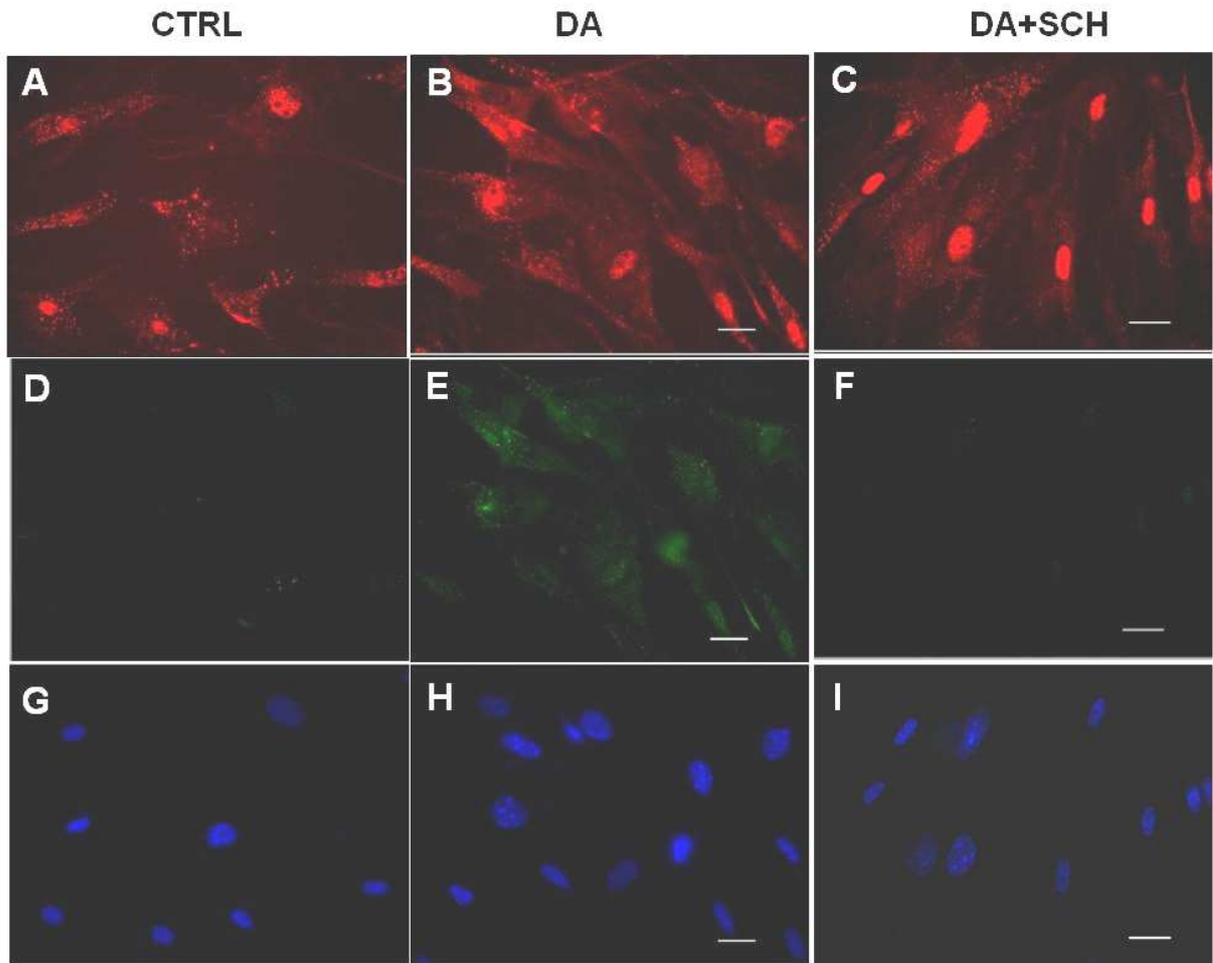


Figura 14: Expressão de nestina induzida por 100  $\mu$ M DA e bloqueada por 2  $\mu$ M SCH. (A, D, G) Fotomicrografias de células de Müller em condições controle (CTRL); (B, E, H) tratadas com DA, ou (C, F, I) tratadas com DA + SCH. (A, B, C) Marcação para GS em vermelho, (D, E, F) para nestina em verde e (G, H, I) marcação nuclear em azul (DAPI). Barra de calibração 20 $\mu$ m.

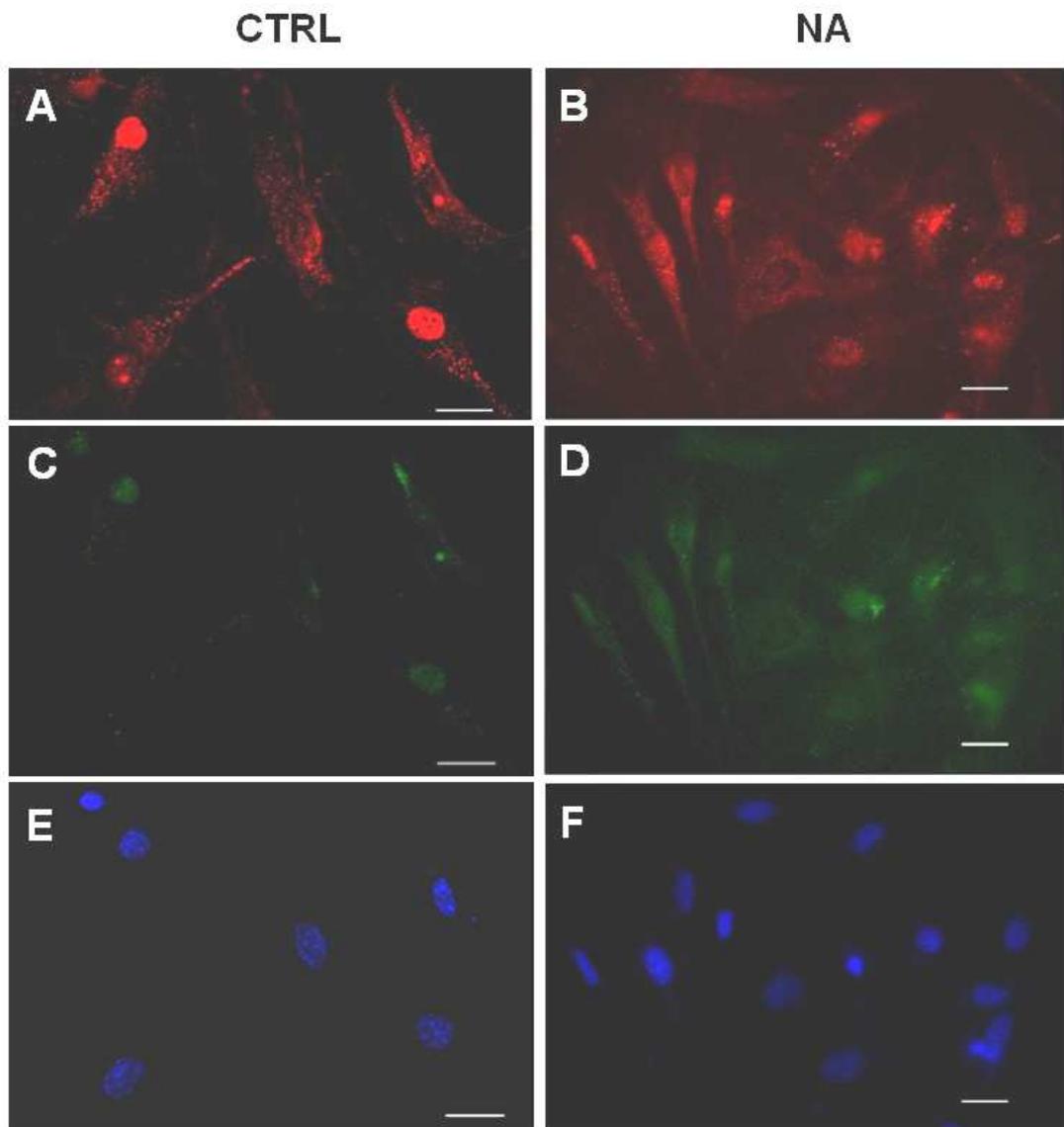


Figura 15: Expressão de nestina induzida por 100  $\mu$ M NA por 12 h em células de Müller em cultura.. (A C, E) Fotomicrografia de células de Müller em condições controle (CTRL); (B, D, F) ou tratadas com NA. (A, B) Marcação para GS em vermelho, (B, C) nestina em verde (E, F) ou marcação nuclear em azul (DAPI). Barra de calibração 20 $\mu$ m.

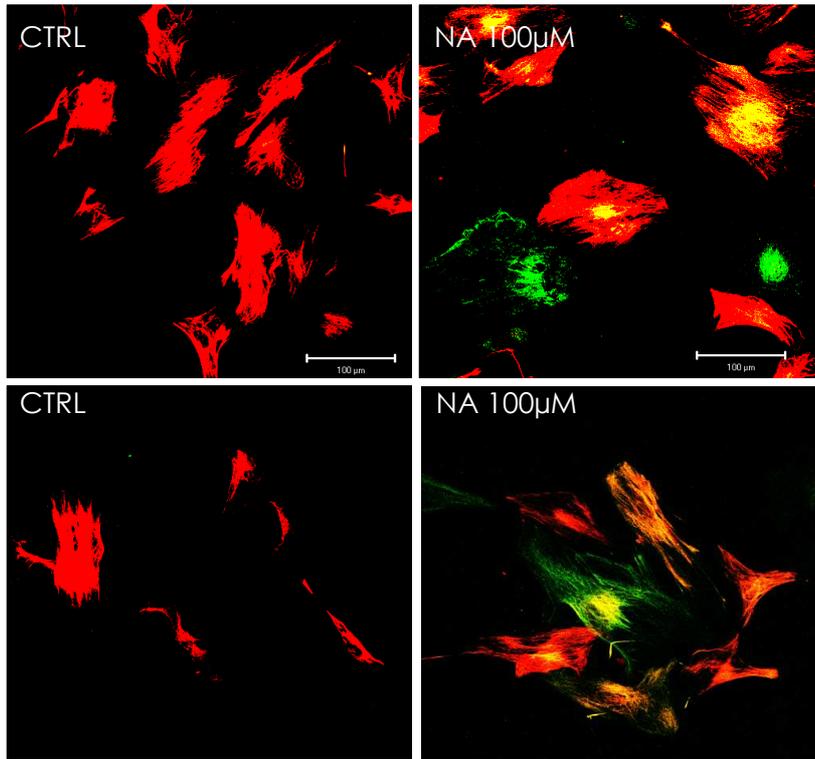


Figura 16: Coexpressão de nestina e GFAP em células de Müller em cultura tratadas com 100  $\mu\text{M}$  NA. Imagens obtidas no microscópio confocal de células de glia de Müller de camundongos controle e tratadas por 24 h com NA. Barra de calibração 20 $\mu\text{m}$ .

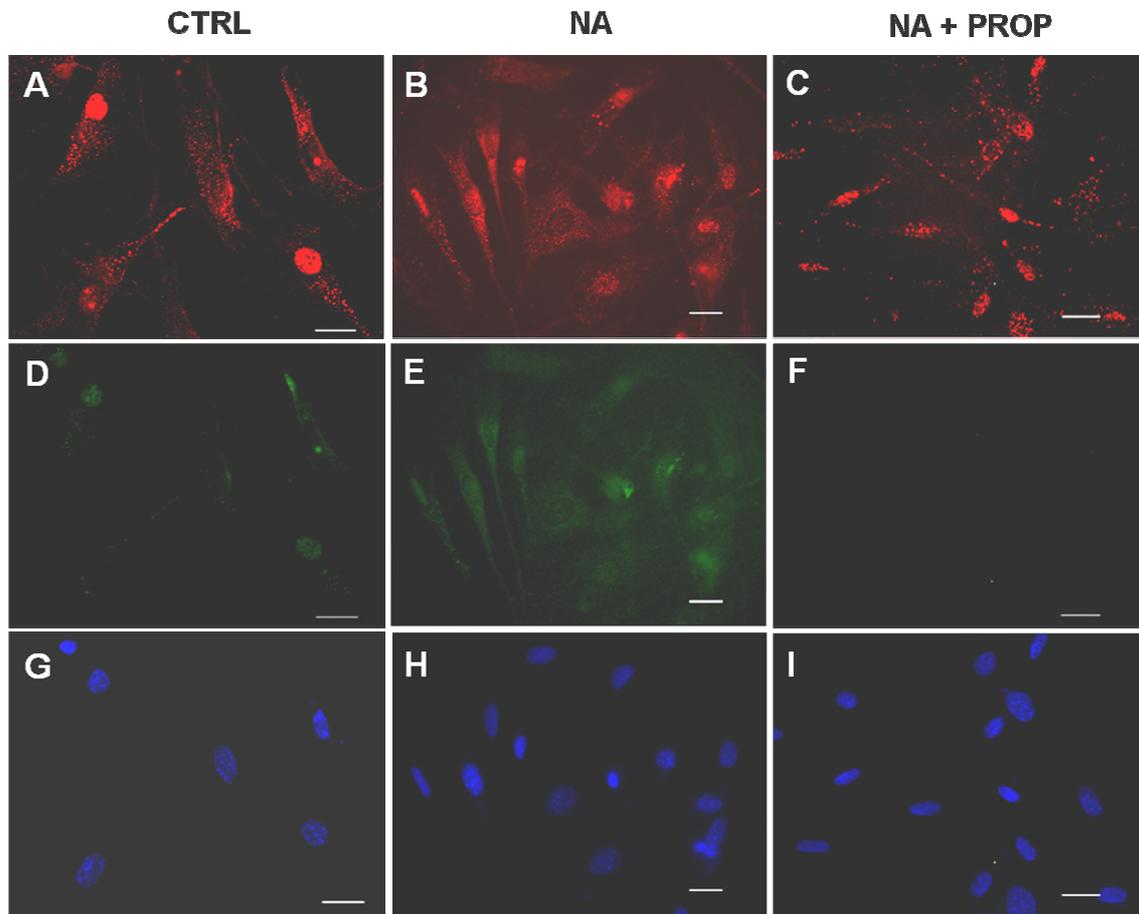


Figura 17: Expressão de nestina em células de Müller em cultura induzida por 100  $\mu\text{M}$  NA e bloqueada na presença de 10  $\mu\text{M}$  propranolol (PROP). (A, D, G) Fotomicrografias de células de Müller em condições controle (CTRL); (B, E, H) tratadas com NA, (C, F, I) ou tratadas com NA + PROP. (A, B, C) Marcação para GS em vermelho, (D, E, F) verde para nestina (G, H, I) e marcação nuclear em azul (DAPI). Barra de calibração 20 $\mu\text{m}$ .

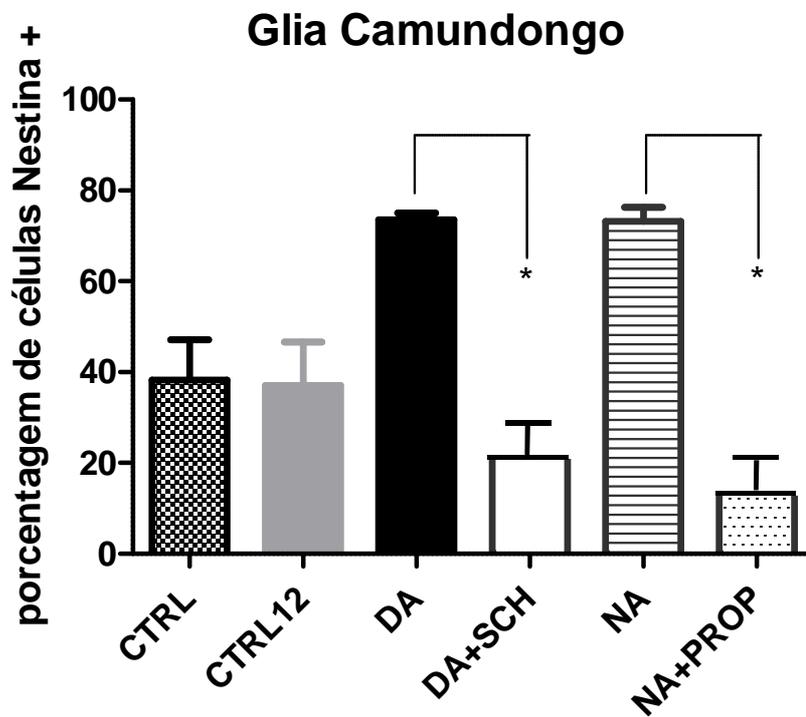


Figura 18. Quantificação das células nestina positivas em culturas de Müller tratadas com catecolaminas. Cada lamínula preparada era observada com uma cerca de 20-30 células/campo, e eram analisados seis campos de cada condição experimental. O número de células positivas para nestina era significativamente maior quando as células eram estimuladas com 100  $\mu$ M DA, efeito bloqueado quando na presença de 2  $\mu$ M SCH. A estimulação com 100  $\mu$ M NA também elevou o número de células positivas a nestina, efeito inibido quando na presença de 10  $\mu$ M propranolol. N=3 em duplicata. \*  $p < 0,05$

#### **4.5- ATP, um gliotransmissor, ativa receptores $P_2X_7$ em culturas de glia de camundongo**

Em consonância com experimentos em andamento do nosso grupo (de Melo Reis et al. em preparação), estudamos o fenômeno de permeabilização em culturas gliais de Müller de camundongos induzida pela exposição ao ATP. Culturas na presença de solução salina (Figura 19) (em campo claro, A, ou em fluorescência A') ou em concentrações nanomolares de ATP (100 nM, 15min, Figura B') não apresentam permeabilização da membrana ao iodeto de propídeo (adicionado por 30min), pois não eram observados pontos de fluorescência nas células. A adição de 5 mM de ATP induz um grande aumento desses pontos (Figura 19C'), efeito parcialmente inibido quando a solução era incubada com 10  $\mu$ M BBG (Figura 19D'). Como esperado, para a permeabilização celular mediada pelo receptor  $P_2X_7$ , a adição de 100  $\mu$ M BzATP induziu aumento de permeabilidade nas culturas (Figura 19E'), efeito totalmente inibido quando adicionado com 10  $\mu$ M BBG (Figura 19F').

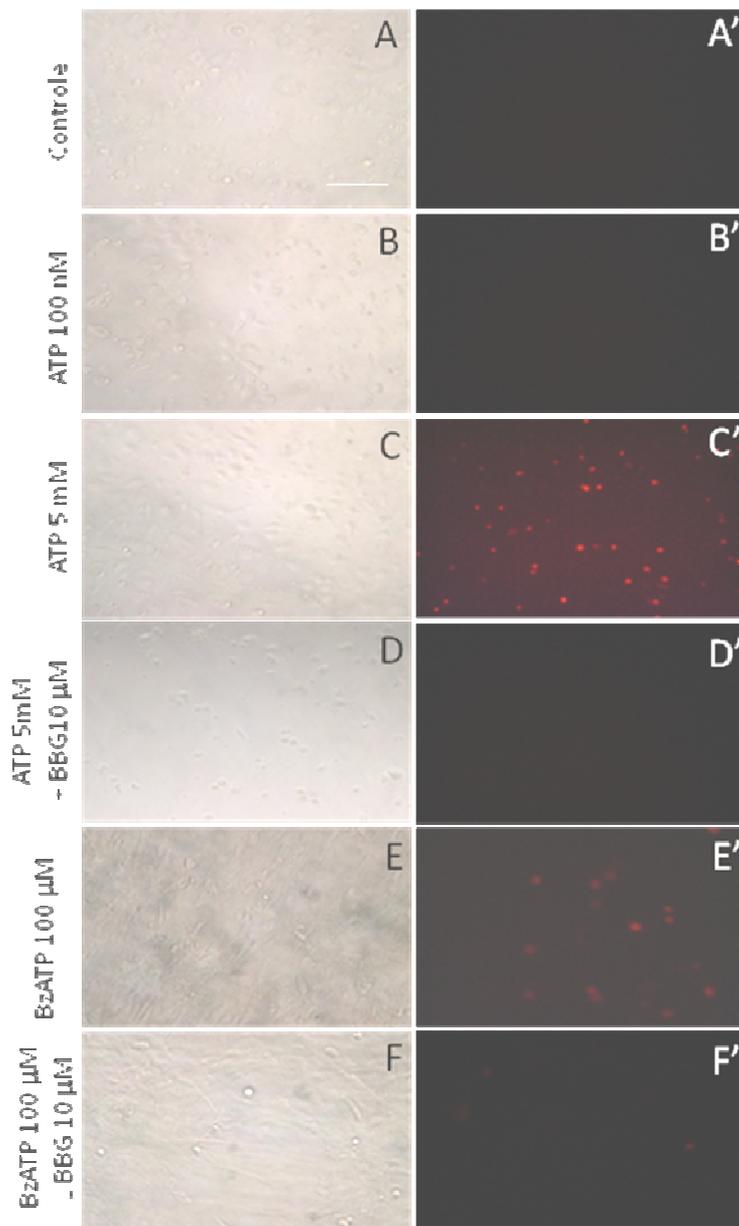


Figura 19. Ensaio de permeabilização em culturas gliais de Müller de camundongos. Culturas na presença de PBS (em campo claro, A, ou em fluorescência A') ou em concentrações submicromolares de ATP (100 nM, 15min, Figura B') não são permeáveis ao iodeto de propídeo (adicionados por 30 min). A adição de 5 mM de ATP induz um grande aumento desses pontos (Figura 19C'), efeito parcialmente inibido quando a solução era incubada com 10  $\mu$ M BBG (Figura 19D'). Como esperado, a adição de 100  $\mu$ M BzATP induziu aumento de permeabilidade nas culturas (Figura 19E'), efeito totalmente inibido quando pré-incubado com 10  $\mu$ M BBG (Figura 19F'). N=2 em quadruplicata. Barra de calibração 200  $\mu$ m.

#### **4.6- Expressão de Nestina induzida por ATP**

O ATP pode agir como um transmissor (Newman, 2003) e já era documentado que a glia de Müller expressa diversos receptores purinérgicos ionotrópicos e metabotrópicos (Bringmann et al., 2009). Portanto, investigamos se o ATP agiria como um gliotransmissor no nosso modelo e induziria a expressão de nestina na glia de Müller.

A figura 20 mostra a expressão de GS (vermelho) em culturas tratadas e não tratadas com 1 mM ATP por 24 h, uma proteína expressa em células da glia de Muller de camundongo. A marcação em verde revela a expressão de nestina em células tratadas com ATP, e podemos observar que a quantidade de células que expressa nestina após o tratamento com ATP é maior quando comparada com a condição controle, efeito observado a partir de 5 minutos de tratamento com ATP (Figura 21).

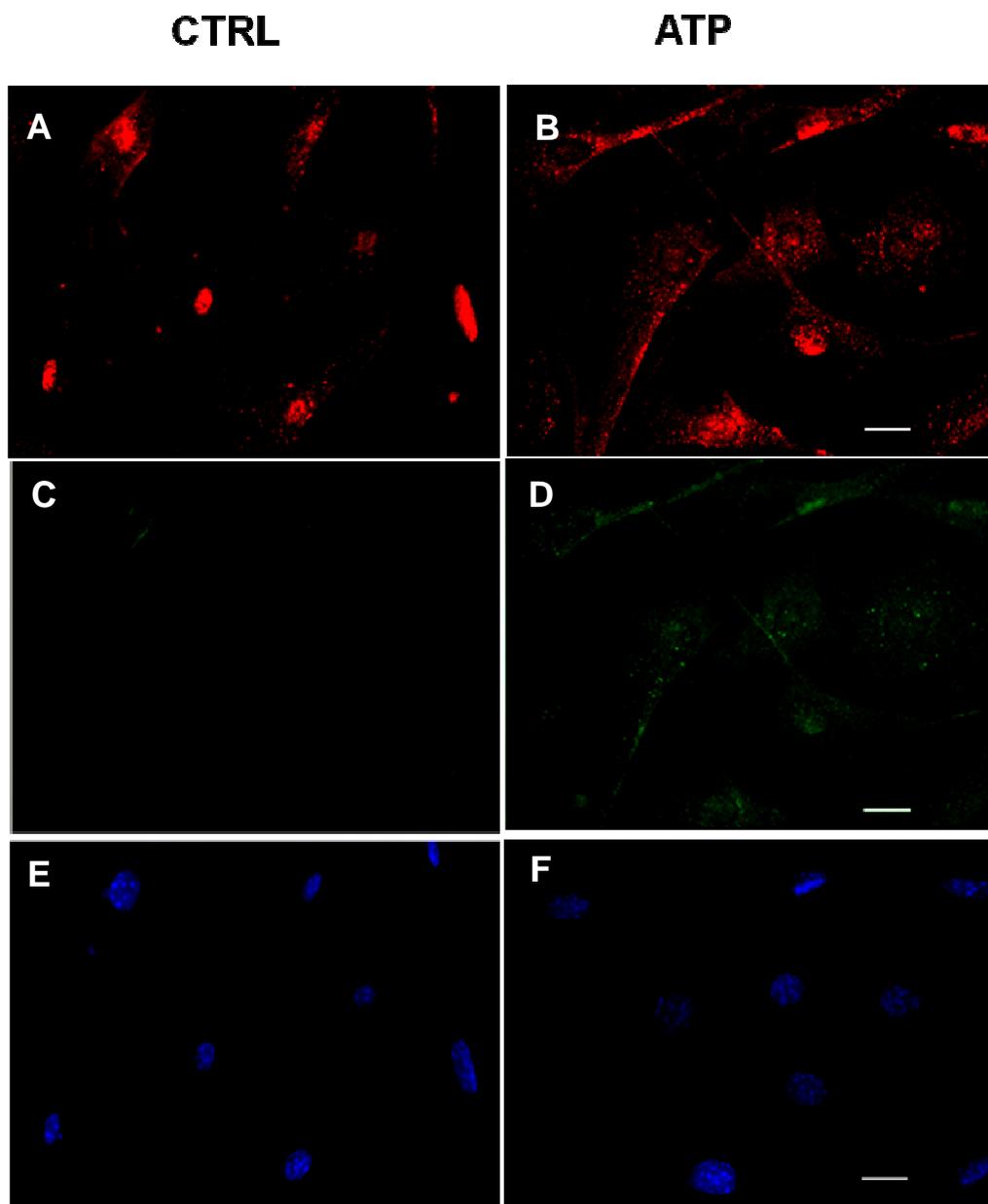


Figura 20. Expressão de nestina induzida por 1mM ATP em células de Müller em cultura após 24 h. Fotomicrografias de células de Müller em condições controle (CTRL – A, C, E) ou tratadas com ATP (B, D, F). (A, B) Marcação para GS em vermelho, (B, C) nestina em verde (E, F) e marcação nuclear em azul (DAPI). Barra de calibração 20 $\mu$ m.

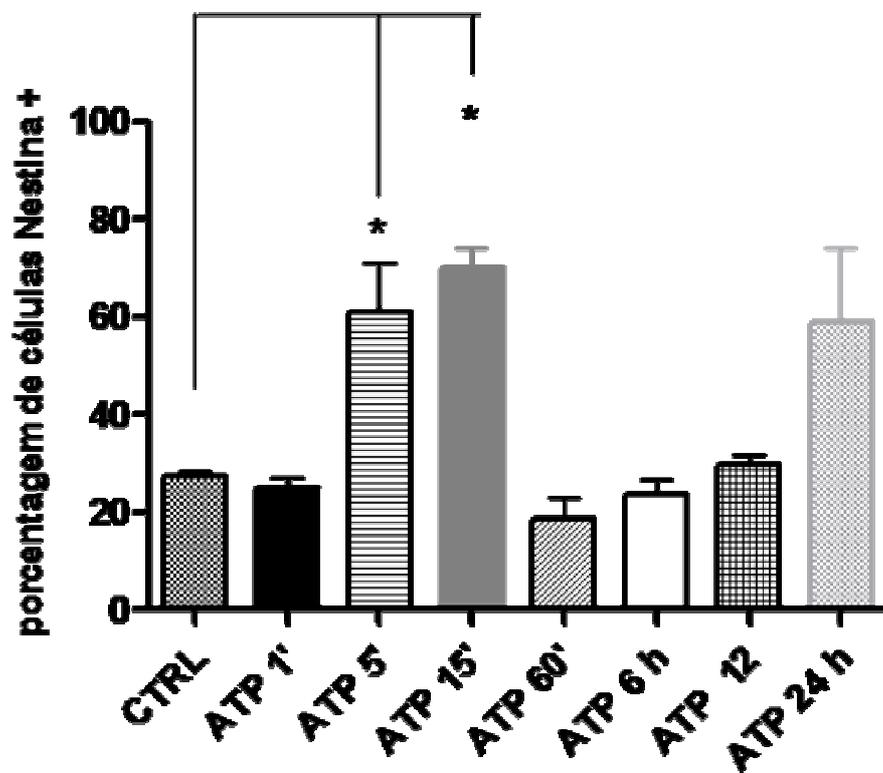


Figura 21. Curva temporal do efeito do ATP (1 mM) na expressão de nestina em células de Müller em cultura. Cada condição representa a porcentagem de células positivas a nestina sobre o número de células totais, representadas pelo marcador nuclear DAPI. N=2 experimentos realizados em duplicata.\* p<0,05.

## 5- Discussão

A glia de Müller tem sido alvo de estudo em diversas linhas de pesquisa em nosso laboratório nos últimos 10 anos, focando em múltiplos sistemas interdependentes de neurotransmissores como o catecolaminérgico (Kubrusly et al., 2005; 2007; 2008), o GABAérgico (de Sampaio Schitine et al., 2007), ação de fatores tróficos na interação neurônio-glia em termos de sobrevivência e diferenciação (Reis et al., 2002; Cabral-da-Silva et al., 2003; de Melo Reis et al., 2007; 2008a; 2008b), além de outras linhas envolvendo transportadores glias de glutamato (Stutz, 2007 – Tese de Mestrado) e o papel do fator de transcrição *nurr-1* nos efeitos de dopamina (Stutz – resultados não publicados), a maioria avaliando o papel a glia de Müller livre de neurônios em cultura. Diversos outros grupos também têm investigado o papel da glia de Müller como elemento essencial na sinalização e metabolismo de diversos neurotransmissores como glutamato, L-arginina, ATP, óxido nítrico e síntese de proteínas (Cossenza e Paes de Carvalho, 2000), proliferação glial e receptores purinérgicos em progenitores e na glia de aves (Sanches et al., 2002; França et al., 2007, Nunes et al., 2007) e de camundongos (Sholl-Franco et al., 2009), expressão de receptores purinérgicos ionotrópicos e metabotrópicos funcionais (Jabs et al., 2000; Fries et al., 2005). A glia de Müller também pode liberar glutatona e atuar na neuroproteção (Oliveira et al., 2009). Além disso, revisões recentes têm analisado mecanismos homeostáticos regulatórios envolvendo trocas iônicas e a distribuição de canais de  $K^+$ , transportadores na regulação da pressão osmótica (Bringmann et al., 2006, Reichenbach et al., 2007; Bringmann et al., 2009) envolvendo a glia de Müller e os neurônios retinianos. Outros estudos têm avaliado o papel da glia de Müller na degeneração e o conceito de gliose reativa e seus aspectos positivos e negativos na fisiopatologia da retina, por exemplo na degeneração macular e na retinose pigmentar, para citar apenas dois exemplos (Bringmann et al., 2006,

Bringmann et al., 2009), demonstrando a importância dessas células na fisiologia do sistema visual.

Além de todos esses temas importantes, nos últimos anos um novo conceito emergiu envolvendo a glia de Müller como foco de terapia e regeneração das vias visuais, em função da re-entrada destas células no ciclo celular quando o tecido sofre trauma ou lesão e secreta fatores diversos inflamatórios que induzem as condições necessárias para geração de novos neurônios e que modificam a diferenciação dessas células. (Fischer e Reh, 2003) Esse processo seria responsável pela reprogramação celular nas células gliais de Müller com re-expressão de inúmeros fatores de transcrição normalmente encontrados em células tronco e em progenitores, e também em glias radiais do córtex (Bonfanti e Peretto, 2007). Desta forma, dependendo da ativação seletiva por fatores extrínsecos secretados (fatores tróficos, citocinas inflamatórias e transmissores – revisado na retina por Martins e Pearson, 2008), a célula de Müller, em circunstâncias particulares, poderia gerar tipos retinianos de interesse, como as células ganglionares da retina e fotorreceptores, o que representaria uma mudança crucial para reverter patologias visuais que hoje são tidas como incuráveis (Para revisão, Baker e Brown, 2009). A pesquisa com células tronco/progenitoras tem alimentado grandes possibilidades no tratamento de doenças retinianas que surgem de processos como glaucoma, diabetes, degeneração macular e retinose pigmentar, entre outras, e que diminuem a qualidade de vida de centenas de milhões de pacientes no mundo (Enzmann et al., 2009).

Trabalhos pioneiros da década de 90 já apontavam para a possibilidade da glia de Müller ter um papel central e seletivo em transplantes realizados na câmara óptica (Small et al., 1993), quando comparadas ao transplante de astrócitos em termos de migração, invasibilidade e integração, propriedades que necessariamente devem ser consideradas.

Foi descrito em 2000 pelo grupo do Iqbal Ahmad (Nebraska, EUA) que mostrou que progenitores retinianos nestina positivos na forma de neuroesferas e introduzidos no olho de roedores expressavam marcadores de fotoreceptores após 14 dias, quando integrados ao tecido retiniano (Chacko et al., 2000). Na mesma época, o grupo de Thomas Reh mostrou que a retina de aves pós-natais apresenta uma zona mitoticamente ativa na margem periférica da retina, chamada de zona ciliar marginal (ZCM) com uma quantidade considerável de progenitores capazes de reentrar no ciclo mitótico mediante lesão induzida por injeção de neurotoxinas, como o ácido caínico ou NMDA diretamente no vítreo (Fisher e Reh, 2000). As células que proliferam no animal adulto são geradas a partir dessa população de células neuroepiteliais germinativas da ZCM, que embora apresente uma propriedade proliferativa limitada em aves e em mamíferos, em peixes e nos anfíbios é dotada de uma grande capacidade proliferativa (revisado em Lamba et al., 2008), o que induziria a geração de milhares de fotoreceptores por dia após lesão da retina por laser no modelo do peixe dourado (Wu et al., 2001). Durante o desenvolvimento normal da retina, esse tecido se estabelece de acordo com um gradiente de formação celular centro-periferia, e nos anfíbios e em peixes a formação é relativamente mais rápida na porção mais central da retina.

Em 2003, Fischer e Reh propuseram que a glia de Müller da retina de aves funcionaria como uma fonte de progenitores proliferantes capazes de gerar neurônios. Estas glias após cerca de 48-72 h na presença de um ambiente propício induzido por lesão retiniana por injeção de NMDA ou com fatores tróficos adequados como a insulina, o fator de crescimento básico de fibroblastos ( $b$ FGF) e o fator de crescimento similar a insulina (IGF), entram em proliferação, desdiferenciam, e expressam uma combinação de fatores intrínsecos normalmente presentes nos progenitores retinianos sendo produzidos novos neurônios e glia.

A nestina representa um desses marcadores fenotípicos dos progenitores, comumente associados a reprogramação e a possibilidade de geração de múltiplos tipos celulares via divisão assimétrica estimulados por agentes extrínsecos. Recentemente, o grupo de Mônica Lamas no México (Lamas et al., 2007; Ramirez e Lamas, 2009) mostraram que o neurotransmissor glutamato, através da ativação do receptor de NMDA, aumenta a taxa de proliferação dos progenitores retinianos derivados da células gliais, que por sua vez formam neuroesferas. Um dos passos que intermediariam esse processo é a fosforilação do fator de transcrição CREB (proteína que se liga ao elemento de resposta a AMPc) que centraliza inúmeros papéis de plasticidade envolvendo o AMPc no SN, desde a liberação de neurotransmissores à consolidação de memória (Bailey et al., 1996) e a proliferação celular (Peltier et al., 2007).

Nossos resultados revelam que as catecolaminas DA e NA ativam receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos (Kubrusly et al., 2005) e  $\beta_1$  adrenérgicos expressos em culturas de glia de Müller através do aumento de AMPc. Em culturas de retina de camundongos pós-natais, as respostas catecolaminérgicas são clássicas, ou seja, bloqueadas por seus respectivos antagonistas farmacológicos (D<sub>1</sub> por SCH 23390 e  $\beta_1$  por alprenolol/propranolol, não ocorrendo interferência cruzada). Já nas culturas obtidas de retina de aves, embora a expressão de ambos os receptores esteja presente na glia purificada, a estimulação via DA ou NA ocorre via sinalização de receptores D<sub>1</sub>, tal qual o observado na retina embrionária de aves (Kubrusly et al., 2007). É comum em alguns circuitos nervosos ocorrer promiscuidade das catecolaminas com as respostas de sinalização seja por falta de acoplamento entre os receptores e as proteínas G, ou pela proximidade da afinidade de ambas as catecolaminas em receptores imaturos. Como a DA é a principal catecolamina funcional da retina, e apenas traços de NA e de AD são encontrados nesse tecido oriundos de uma estimulação do sistema nervoso autônomo, via divisão simpática,

(Osborne, 1981; Ehinger e Steinbusch, 1985) o receptor D<sub>1</sub> tem um papel fundamental em estágios precoces da retina, e especificamente na glia de Müller de aves. Nossos resultados reforçam outros dados da literatura que demonstraram que na retina de algumas espécies os receptores dopaminérgicos podem ser ativados por outras catecolaminas, como a noradrenalina (Vanderheyden et al., 1986; Robbins et al., 1988). Assim, o receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> é expresso em idades precoces do desenvolvimento da retina de aves, e nesse estágio o receptor não possui uma especificidade para a DA podendo ser ativado por NA (Kubrusly et al., 2007). Independente do tipo de receptor catecolaminérgico D<sub>1</sub> ou β<sub>1</sub>, em diferentes estágios da cultura, estas sinalizam via AMPc. Esta sinalização poderia levar a fosforilação de CREB como mediador intermediário em eventos de diferenciação e reprogramação celular. Como mostrado por Ramirez e Lamas (2009), existe uma relação entre o fator de transcrição CREB e a proliferação de progenitores retinianos, sendo provável que a ativação desta via tenha um papel central na expressão do marcador nestina por células gliais em cultura, já que há aumento de AMPc na glia de Müller e/ou na retina em poucos minutos de incubação com DA, NA (Figuras 10 e 11 desta tese; Ventura e De Mello, 1990; Kubrusly et al., 2007) ou PACAP (Kubrusly et al., 2005).

Por outro lado, o ATP é um nucleotídeo pleiotrópico com muitos papéis no SN e, mais recentemente, tem sido descrito como importante gliotransmissor envolvido na interação neurônio-glia no sistema nervoso periférico (Fields and Stevens-Graham, 2002) e no SNC, (Perez et al., 1986; North e Verkhratsky, 2006). De fato, tem sido documentado que progenitores retinianos de aves (França et al., 2007; Nunes et al., 2007) e de roedores (Sholl-Franco et al., 2009) assim como a glia de Müller (Sanches et al., 2002) possuem receptores purinérgicos ionotrópicos e metabotrópicos funcionais (Jabs et al., 2000; Fries et al., 2005). O ATP seria liberado pela glia de Müller e astrócitos retinianos e ativaria receptores neuronais e gliais potenciando ondas de Ca<sup>2+</sup> (Newman, 2003). Diferente das respostas catecolaminérgicas que

envolvem normalmente a via AMPc-PKA-pCREB, os receptores dos nucleotídeos estão primariamente envolvidos com a modulação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e formação de fosforosítios na retina (Sugioka et al., 1996; Newman, 2003), assim como na geração de ondas de cálcio intercelulares como fenômenos de sincronização neuro-gliial (Newman, 2003), coexistindo ou não com proteínas das famílias das conexinas e panexinas em sinapses elétricas (Contreras et al., 2002). Essas interações envolvendo a comunicação bidirecional de várias outras moléculas, além do ATP e das catecolaminas na retina, implicariam em diferentes efeitos como sobrevivência, diferenciação, neuroproteção e morte de neurônios retinianos (revisado em de Melo Reis et al., 2008b). Em resumo, a glia de Müller realiza contato com a maioria, senão com todos os neurônios presentes na retina, e essa comunicação pode se dar inclusive pela ação de transmissores.

Nesse trabalho avançamos com a investigação de propriedades da glia de Müller em relação ao comportamento *in vitro* quando na ausência de neurônios. É sabido que fatores neuronais retinianos modificam a atividade de enzimas e de transportadores gliais, como o GAT-3 (de Sampaio Schitine et al., 2007) na glia de Müller em cultura e o GLAST, transportador glutamatérgico no tecido hipocampal (Schlag et al., 1998). Além disso, resultados do nosso laboratório mostram que na falta da influência neuronal, a glia de Müller expressa a enzima para a síntese de GABA (GAD), porém sem atividade funcional, além de subunidades de receptores nicotínicos e receptores para o PACAP ativos (Kubrusly et al., 2005).

Em continuidade com os resultados obtidos demonstrando a expressão de nestina em células de Müller na condição controle (cerca de 30%) e seu aumento mediante estímulos com catecolaminas e ATP, pretendemos realizar experimentos que verifiquem a funcionalidade das respostas de sinalização quando culturas forem tratadas desde o começo com antagonistas de catecolaminas e ATP. Esse tratamento poderia reduzir o nível de expressão da nestina em

condições basais e ter implicações em relação a mudanças no fenótipo. É fato que a glia de Müller sem a influência neuronal passa a expressar moléculas normalmente associadas a neurônios e passa a ser modulada por neurotransmissores alterando seu fenótipo. Assim poderemos verificar (i) se há influência no fenótipo dopaminérgico; e (ii) se a expressão de marcadores tidos como neuronais (GAD, receptor de PACAP, subunidade do receptor nicotínico) continuarão presentes sem essa modulação por catecolaminas e ATP endógenos e (iii) se neuroesferas poderão ser obtidas de células de Müller com a expressão de nestina reduzida, já que este é um marcador de progenitores. Além disso, será avaliada a expressão de outros marcadores de células progenitoras como CASH-1, Pax6 e Chx10.

Recentemente, o nosso grupo começou a preparar neuroesferas derivadas de progenitores retinianos, assim como derivadas de glia de Müller. Experimentos futuros serão realizados para tentar definir uma estratégia de diferenciar células neuronais a partir de glia de Müller em cultura. Já começamos a utilizar ferramentas moleculares para avaliar possíveis fatores que interferem no aparecimento de nestina e a possível regulação pelos neurotransmissores investigados nesse trabalho, assim como a influência de fatores tróficos como o CNTF, o BDNF e frações ativas da glia de Müller (colaboração com o Dr. Rodrigo Martins, UFRJ) na (des)diferenciação da glia. Dito isto, as direções futuras apontam para que possamos (i) implementar um modelo de caracterização funcional dos tipos celulares retinianos a partir de neuroesferas retinianas de camundongos que permita incrementar tipos celulares de interesse (fotoreceptores e células ganglionares), (ii) transplantar células de Müller e progenitores retinianos que expressam a proteína GFP em retinas previamente lesadas e posteriormente em modelos de degeneração visual (glaucoma e diabetes) e (iii) identificar fatores da glia de Müller que tem atividade trófica em neurônios periféricos e centrais. Estes temas e objetivos estão definidos nos projetos Pronex

2010 (coordenador FG de Mello) e Pensa-Rio 2010 (coordenador R Linden) e serão realizados em colaboração com diversos pesquisadores do Programa de Neurobiologia da UFRJ e da UFF.

## 6- Conclusões

- O receptor  $\beta_1$ -adrenérgico está presente na glia de Müller de retina de aves.
- Em culturas de glia de Müller de aves, a estimulação de NA ocorre via sinalização de receptores  $D_1$ , tal qual o observado na retina embrionária de aves.
- Em culturas derivadas de retina de camundongos pós-natais, as respostas catecolaminérgicas são clássicas, ou seja, bloqueados por seus respectivos antagonistas farmacológicos ( $D_1$  por SCH 23390 e  $\beta_1$  por alprenolol/propranolol, não ocorrendo interferência cruzada).
- Existe uma sinalização purinérgica na glia de Muller de camundongos, como pode ser observado pela permeabilização das células ao iodeto de propídeo quando tratadas com ATP.
- A sinalização catecolaminérgica e purinérgica induzem a expressão de nestina, um marcador fenotípico normalmente encontrado em progenitores relacionado com a mudança na programação das células.

## 7 – Referências

ADLER, R. (2000) A Model of Retinal Cell Differentiation in the Chick Embryo. **Progress in Retinal and Eye Research** 19: 529 -557.

ARAQUE, A. (2006) Astrocyte-neuron signaling in the brain implications for disease. **Curr Opin Investig Drugs** 7: 619–624.

ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. **Annu Rev Physiol.** 63:795-813.

BAILEY, C.H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci.** 93: 13445-13452.

BAKER, P.S.; BROWN, G.C. (2009) Stem-cell therapy in retinal disease. **Curr Opin Ophthalmol.** 20: 175-181.

BAYLOR, D.A. (1987) Photoreceptor signals and vision **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 28: 34-49.

BIEDERMANN, B.; FROHLICH, E.; GROSCHE, J.; WAGNER, H.J.; REICHENBACH, A. (1995) Mammalian Müller (glial) cells express functional D<sub>2</sub> dopamine receptors. **Neuroreport** 6: 609–612.

BONFANTI, L.; PERETTO, P. (2007) Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. **Prog. Neurobiol.** 83: 24-36.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-54.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Retinal and Eye Research** 25: 397–424.

BRINGMANN, A.; IANDIEV, I.; PANNICKE, T.; WURM, A.; HOLBORN, M.; WIDEMANN, P.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. **Progress in Retinal and Eye Research** 28: 423–451.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Intl. Rev. Cytol.** 240: 31-304.

BURNSTOCK, G. (2006). Purinergic Signaling. **British Journal of Pharmacology** 147: S172–S181.

CABRAL-DA-SILVA, M.C.; DOS SANTOS, N.E.; DE MELLO, F.G.; TAYLOR, J.S.; TOLKOVSKY, A.M.; LINDEN, R.; REIS, R.A. (2003) Herbimycin A induces sympathetic neuron survival and protects against hypoxia. **Neuroreport** 14: 2397-401.

CAYOUE, M.; POGGI, L.; HARRIS, W.A. (2006). Lineage in the vertebrate retina. **Trends Neurosci.** 29: 563-570.

CEPKO, C.L.; AUSTIN, C.P.; YANG, X.; ALEXIADES, M.; EZZEDDINE, D. (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 589-595.

CHACKO, D.M.; ROGERS, J.A.; TURNER, J.E.; AHMAD, I. (2000) Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 268: 842-846.

CONTRERAS, J.E.; SÁNCHEZ, H.A.; EUGENIN, E.A.; SPEIDEL, D.; THEIS, M.; WILLECKE, K.; BUKAUSKAS, F.F.; BENNETT, M.V.; SÁEZ, J.C. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 99: 495-500.

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

DE MEI C, RAMOS M, IITAKA C, BORRELLI E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D<sub>2</sub> receptors. **Curr Opin Pharmacol.** 9: 53-58.

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

DE MELO REIS, R.A.; CABRAL-DA-SILVA, M.E.; DE MELLO, F.G.; TAYLOR, J.S.; (2008a). Müller glia factors induce survival and neuritogenesis of peripheral and central neurons. **Brain Res.** 1205: 1-11.

DE MELO REIS, R.A.; VENTURA, A.L.V.; SCHITINE, C.S; DE MELLO, M.C.F; DE MELLO, F.G. (2008b) Müller Glia as an Active Compartment Modulating Nervous Activity in the Vertebrate Retina: Neurotransmitters and Trophic Factors. **Neurochem. Res.** 33: 1466-1474.

DE SAMPAIO SCHITINE, C.; KUBRUSLY, R.C.; REIS, R.A.M.; YAMASAKI, E.N.; DE MELLO, M.C.; DE MELLO, F.G. (2007) GABA uptake by purified avian Müller glia cells in culture. **Neurotox Res.** 12: 145–153.

DOWLING, J.E.; EHINGER, B. (1978) Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. **J Comp Neurol.** 80: 203-220.

DOWLING, J.E. (1999) Retinal processing of visual information. **Brain Res Bull.** 50: 317.

DUNN, T.A; WANG, C. T.; COLICOS, M.A.; ZACCOLO, M.; DIPILATO, L.M.; ZHANG, J.; TSIEN, R. Y.; FELLER, M.B. (2006) Imaging of cAMP Levels and Protein Kinase A Activity Reveals That Retinal Waves Drive Oscillations in Second-Messenger Cascades. **J. Neurosci.** 26: 12807–12815.

EHINGER, B., STEINBUSCH, H.W. (1985). Quantitation and immunohistochemistry of catecholamines in the posterior segment of the eye. **Histochemistry** 82: 435–439.

ENZMANN, V.; YOLCU, E.; KAPLAN, H.J.; ILDSTAD, S.T. (2009) Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. **Arch. Ophthalmol.** 127: 563-71.

FARIA, R.X., REIS, R.A.M. CASCABULHO, C.M., ALBERTO, A, DE FARIAS, F.P. HENRIQUES-PONS, A, ALVES L.A. (2009). Pharmacological properties of a pore induced by raising intracellular Ca<sup>2+</sup>. **Am J Physiol Cell Physiol** 297: C28-42.

FELLIN, T., PASCUAL, O., GOBBO, S., POZZAN, T., HAYDON, P.G., CARMIGNOTO, G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. **Neuron** 43: 729–743.

FIELDS, R.D., STEVENS-GRAHAM, B., (2002) New insights into neuron–glia communication. **Science** 298: 556–562.

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia Interactions. **Nat. Rev. Neurosci.** 7: 423-436.

FISCHER, A.J.; REH, T.A. (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. **Nat. Neurosci.** 4: 247-252.

FISCHER, A.J.; MCGUIRE, C.R.; DIERKS, B.D.; REH, T.A. (2002) Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. **J Neurosci** 22: 9387-9398.

FISCHER, A. J. REH, T. A. (2003) Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. **Glia** 43:70–76.

FISCHER, A.J. (2005) Neural regeneration in the chick retina. **Progress in Retinal and Eye Research** 24: 161–182.

FISCHER, A.J.; SCOTT, M.A.; RITCHEY, E.R.; SHERWOOD, P. (2009) Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. **Glia.** 57: 1538-52.

FITZPATRICK D. (2004) In: PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LA MANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M.; Neuroscience. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A. 229-231.

FRANÇA, G.R.; FREITAS, R.C.; VENTURA, A.L. (2007) ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. **Int. J. Dev. Neurosci.** 25: 283-291.

FRANZE, K.; GROSCHE, J.; SKATCHKOV, S.N.; SCHINKINGER, S.; FOJA, C.; SCHILD, D.; UCKERMANN, O.; TRAVIS, K.; REICHENBACH, A.; GUCK, J. (2007) Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. **Proc Natl Acad Sci** 104: 8287–8292.

FRIES, J.E.; GOCZALIK, I.M.; WHEELER-SCHILLING, T.H.; KOHLER, K.; GUENTHER, E.; WOLF, S.; WIEDEMANN, P.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A.; FRANCKE, M.; PANNICKE, T.; (2005) Identification of P2Y receptor subtypes in human Müller glial cells by physiology, single cell RT-PCR, and immunohistochemistry. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 46: 3000–3007.

GARDINO, P.F., DOS SANTOS, R.M., HOKOC, J.N (1993) Histogenesis and topographical distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells in the developing chick retina. **Dev. Brain Res.** 72: 226–236.

GIAUME, C.; KIRCHHOFF, F.; MATUTE, C.; REICHENBACH, A.; VERKHRATSKY, A. (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. **Cell Death Differ.** 14: 1324-1335.

GILMAN, A.J. (1970) Protein binding assay for adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 67: 305–312.

GORDON, G.R., BAIMOUKHAMETOVA, D.V., HEWITT, S.A., (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. **Nat. Neurosci.** 8: 1078–1086.

GREENGARD, P (2001). The neurobiology of dopamine signaling. Nobel Lecture. **Biosci Rep.** 21: 247-269.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of chick embryo. **J. Morphol.** 88: 49–92.

HARADA, T.; HARADA, C.; NAKAYAMA, N.; OKUYAMA, S.; YOSHIDA, K.; KOHSAKA, S.; MATSUDA, H.; WADA, K.; (2000) Modification of glial–neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration.. **Neuron** 26: 533–541.

HARRIS, W. (1997) Cellular diversification in the vertebrate retina. **Current Opinion in Genetics & Development.** 7: 651-658.

HATAKEYAMA, J.; KAGEYAMA, R. (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 15: 83–89.

HAYDON, P.G. (2001) Glia: Listening and talking to the synapse. **Nat. Rev. Neurosci.** 2: 185–193.

HYLAND, K. (1999). Neurochemistry and defects of biogenic amine neurotransmitter metabolism. **J. Inher. Metab. Dis.** 22: 353-363.

JABS, R.; GUENTHER, E.; MARQUORDT, K.; WHEELER-SCHILLING, T.H. (2000). Evidence for P<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>X<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>X<sub>5</sub> but not for P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> containing purinergic receptors in Müller cells of the rat retina. **Molecular Brain Research**. 76: 205-210.

JADHAV, A.P.; ROESCH, K.; CEPKO, C.L. (2009) Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. **Progress in Retinal and Eye Research**. 28: 249–262.

JEON, C.J.; STRETTOI E.; MASLAND, R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. **J. Neurosci.** 18: 8936-8946.

KOLB, H. 1994. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.** 35: 2385-2404.

KOLB, H. (2003) How the retina works. **American Scientist**. 91: 28-35.

KRAMER, S.G. (1971) Dopamine: A retinal neurotransmitter. I. Retinal uptake, storage, and light-stimulated release of H<sup>3</sup>-dopamine in vivo. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.** 10: 438-452.

KUBRUSLY, R.C., GUIMARAES, M.Z., VIEIRA, A.P., HOKOC, J.N., CASARINI, D.E., DE MELLO, M.C., DE MELLO, F.G. (2003) L-DOPA supply to the neuro retina activates dopaminergic communication at the early stages of embryonic development. **J. Neurochem.** 86: 45-54.

KUBRUSLY, R.C.C.; CUNHA, M.C.C; REIS, R.A.M.; SOARES, H.; VENTURA, A.L.M.; KURTENBACH, H.; DE MELLO, M.C.F.; DE MELLO, F.G. (2005). Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Müller cells. **Brain Research**. 1038: 141– 149.

KUBRUSLY, R.C., VENTURA, A.L., REIS, R.A., SERRA, G.C.F., YAMASAKI, E.N., GARDINO, P.F., DE MELLO, M.C., DE MELLO, F.G. (2007). Norepinephrine acts as D<sub>1</sub>-dopaminergic agonist in the embryonic avian retina: late expression of  $\beta$ 1-adrenergic receptor shifts norepinephrine specificity in the adult tissue. **Neurochem. Int.** 50: 211–218.

KUBRUSLY, R.C.C.; PANIZZUTTI, R.; GARDINO, P.F.; STUTZ, B.; REIS, R.A.M.; VENTURA, A.L.M.; DE MELLO, M.C., DE MELLO, F.G. (2008) Expression of functional dopaminergic phenotype in purified cultured Müller cells from vertebrate retina. **Neurochem Internation.** 53: 63–70.

KUHAR, M.J., MINNEMAN, K., MULY, E.C. (2006) IN: SIEGEL, J.G., ALBERS, R.W., BRADY, S.T., PRICE, D.L. (Eds) Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects. Seventh edition. Elsevier, pp: 211-225.

LAGNADO, L. (2000) Visual signals in the retina: from photons to synapses. **Experimental Physiology.** 85: 1-16.

LAMAS, M.; LEE-RIVERA, I.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. (2005) Cell-specific expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in Müller glia and neurons from the chick retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 46: 3570–3577.

LAMAS, M.; LEE-RIVERA, I.; RAMIREZ, M.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. (2007) D-serine regulates CREB phosphorylation induced by NMDA receptor activation in Müller glia from the retina. **Neurosci Lett.** 427: 55-60.

LAMB, T.D.; COLLIN, S.P.; PUGH, E.N. (2007) Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. **Nat. Rev. Neurosci.** 8: 960-975.

LAMBA, D.; KARL, M.; REH, T. (2008) Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. **Cell Stem Cell.** 2: 538-49.

LANKFORD, K., DE MELLO, F.G., KLEIN, W.L. (1987) A transient embryonic dopamine receptor inhibits growth cone motility and neurite outgrowth in a subset of avian retina neurons. **Neurosci. Lett.** 75: 169–174.

LOCOVEI, S.; SCEMES, E.; QIU, F.; SPRAY, D.C.; DAHL, G. (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. **FEBS Lett.** 581: 483–488.

- LÓPEZ T, LÓPEZ-COLOMÉ A.M.; ORTEGA, A. (1997) NMDA receptors in cultured radial glia. **FEBS Lett.** 405: 245–248
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. AND RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- MALCHOW, R.P.; QIAN, H.; RIPPS, H. (1989) c-Aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Müller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABAA receptors. **Proc Natl Acad Sci.** 86: 4326–4330.
- MARQUARDT, T.; GRUSS, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. **Trends in Neurosci.** 25: 32-38.
- MARTINS, R.A.; PEARSON, R. A. (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. **Brain Res.** 1142: 37-60.
- MASSON, J.; SAGNE, C.; HAMON, M.; EL MESTIKAWY, S. (1999) Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System. **Pharm. Rev.** 51: 439-464.
- MATSUZAWA, H., NIRENBERG, M. (1975) Receptor-mediated shifts in cGMP and cAMP levels in neuroblastoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 72: 3472– 3476.
- MCNAUGHTON, P. A. (1991). Light response of vertebrate photoreceptors. **Physiological Reviews.** 70: 847-883.
- MEY, J.; THANOS, S. (2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. **Brain Res. Rev.** 32: 343-379.
- MOSHIRI, A.; REH, T.A. (2004) Persistent progenitors at the retinal margin of *ptc*<sup>+/-</sup> mice. **J Neurosci.** 24: 229-237.
- NEWMAN, E.; REICHENBACH, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina, **Trends Neurosci.** 19: 307-312.
- NEWMAN, E.A (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. **J Neurosci** 21: 2215–2223.

NEWMAN, E.A. (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. **J Neurosci** 23: 1659–1666.

NORTH, R.A. (2002). Molecular Physiology of P<sub>2</sub>X Receptors. **Physiol Rev** 82: 1013–1067.

NORTH, R.A.; VERKHRATSKY, A. (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. **Eur J Physiol.** 452: 479–485.

NUNES, P.H.; CALAZA, K.C.; ALBUQUERQUE, L.M.; FRAGEL-MADEIRA, L.; SHOLL-FRANCO, A.; VENTURA, A.L.(2007) Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. **Int J Dev Neurosci.** 25: 499-508.

OLIVEIRA, K.R.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DO NASCIMENTO, J.L.; (2009) Pharmacological characterization of glutamate Na(+)-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochem Int.** [Epub ahead of print]

OSBORNE, N.N. (1981) Norepinephrine, a transmitter candidate in the retina. **J. Neurochem.** 36: 17–27.

PANNICKE T, FISCHER W, BIEDERMANN B, SCHADLICH H, GROSCHE J, FAUDE F, WIEDEMANN P, ALLGAIER C, ILLES P, BURNSTOCK G, REICHENBACH A (2000) P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptors in Müller glial cells from the human retina. **J Neurosci.** 20: 5965-5972.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptor. **EMBO J.** 25: 5071–5082,.

PELTIER, J.; O'NEILL, A.; SCHAFFER, D.V.; (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. **Dev Neurobiol.** 67: 1348–1361.

PEREZ, M.T.R.; EHINGER, B.E.; LINDSTRÖM, K.; Fredholm, B.B.(1986) Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina. **Brain Res** 398: 106–112

PRADA, C.; PUGA, J.; PÉREZ-MÉNDEZ, L. LOPEZ, A.R., RAMIREZ, G (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. **Eur J Neurosci.** 3: 559–569.

PURO, D.G.; YUAN, J.P.; SUCHER, N.J. (1996) Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Müller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. **Vis Neurosci.** 13:319–326.

RAMIREZ, M.; LAMAS, M. (2009) NMDA receptor mediates proliferation and CREB phosphorylation in postnatal Müller glia-derived retinal progenitors. **Molecular Vision** 15: 713-721.

REICHENBACH, A.; WURM, A.; PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; BRINGMANN, A.; (2007) Müller cells as players in retinal degeneration and edema. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.** 245: 627–636

REIS, R.A.M.; CABRAL DA SILVA, M.C.; LOUREIRO DOS SANTOS, N.E.; BAMPTON, E.; TAYLOR, J.S.H.; DE MELLO, F.G.; LINDEN, R. (2002) Sympathetic neuronal survival induced by retinal trophic factors. **J Neurobiol.** 50: 13-23.

REIS, R.A.M.; VENTURA, A.L.M.; KUBRUSLY, R.C.C.; DE MELLO, M.C.F.; DE MELLO, F.G. (2007) Dopaminergic signaling in the developing retina. **Brain Res. Rev.** 54: 181-188.

ROBBINS, J.; WAKAKUWA, K.; IKEDA, H. (1988). Noradrenaline action on cat retinal ganglion cells is mediated by dopamine (D<sub>2</sub>) receptors. **Doc Ophthalmol.** 69: 175-86.

SANCHES, G.; ALENCAR, LS.; VENTURA, A.L.M. (2002) ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. **Int J Dev Neurosci.** 20: 21–27.

SARTHY, V.; RIPPS, H. (2001) The Retinal Müller Cell – Structure and function. Kluwer Academic, New York, pp 1-33.

SCHLAG, B.D.; VONDRASEK, J.R.; MUNIR, M.; KALANDADZE, A.; ZELENIAIA, O.A.; ROTHSTEIN, JD.; ROBINSON, M.B. (1998) Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. **Mol. Pharmacol.** 53: 355-69.

SCHWARTZ, J.P., NISHIYAMA, N., WILSON, D., TANIWAKI, T. (1994) Receptor-mediated regulation of neuropeptide gene expression in astrocytes. **Glia** 11: 185–190.

SEKI, M., TANAKA, T., SAKAI, Y., FUKUCHI, T., ABE, H., NAWA, H., TAKEI, N. (2005) Müller cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline

upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Müller cells. **Neurochem. Res.** 30: 1163–1170.

SEKI, T.; HINOHARA, Y.; TAKI, C.; NAKATANI, M.; OZAWA, M.; NISHIMURA, S.; TAKAKI, A.; ITHO, H.; TAKENOYA, F.; SHIODA, S. (2006) PACAP stimulates the release of interleukin-6 in cultured rat Müller cells. **Ann NY Acad Sci** 1070: 535–539.

SHOLL-FRANCO, A.; FRAGEL-MADEIRA, L.; MACAMA, A.D.; LINDEN, R.; VENTURA, A.L. (2009) ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. **Int J Dev Neurosci.** [Epub ahead of print]

SIBLEY, D.R. (1999) New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 39: 313–41.

SMALL, R.K.; WATKINS, B.A.; MUNRO, P.M.; LIU, D. (1993) Functional properties of retinal Müller cells **Glia.** 7: 158-69.

STUTZ, B (2007). Sinalização Aspartatérgica na retina de embriões de aves. Tese de Mestrado. Instituto de Biofísica CCF, UFRJ.

SUGIOKA, M.; FUKUDA, Y.; YAMASHITA, M. (1996)  $Ca^{2+}$  responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. **J Physiol.** 493: 855–863.

SUMMERS, R.J.; MCMARTIN, L.R. (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. **J Neurochem.** 60: 10-23

TACKENBERG, M.A.; TUCKER, B.D.; SWIFT, J.S.; JIANG, C.; REDENTIS, S.; GREENBERG, K.P.; FLANNERY, J.G.; REICHENBACH, A.; YOUNG, M.J. (2009) Müller cell activation, proliferation and migration following laser injury. **Molecular Vision.** 15: 1886-1896.

TORRES, G.E.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. (2003). Plasma Membrane Monoamine Transporters: Structure, regulation and function. **Nat Rev. Neurosci.** 4: 13-25.

VANDERHEYDEN, P.; EBINGER, G.; KANAREK, L.; VAUQUELIN, G. (1986) Epinephrine and norepinephrine stimulation of adenylate cyclase in bovine retina homogenate: evidence for interaction with the dopamine D<sub>1</sub> receptor. **Life Sci.** 38: 1221–1227.

VARELLA, M.H.; DE MELLO, F.G.; LINDEN, R. (1999) Evidence for an antiapoptotic role of dopamine in developing retinal tissue. **J. Neurochem.** 73: 485–492.

VENTURA, A.L.M.; KLEIN, W.L.; DE MELLO, F.G. (1984) Differential ontogenesis of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopaminergic receptors in the chick embryo retina. **Brain Res.** 314: 217–223.

VENTURA, A.L.; DE MELLO, F.G. (1990) D<sub>1</sub> dopamine receptors in neurite regions of embryonic and differentiated retina are highly coupled to adenylate cyclase in the embryonic but not in the mature tissue. **Brain Res.** 530: 301–308.

XUE, L. P.; LU, J.; CAO, Q.; HU, S.; DING, P.; LING, E.A. (2006) Müller glial cells Express nestin coupled with glial fibrillary protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. **Neuroscience.** 139: 723–732.

YANG, X.L. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Prog Neurobiol.** 73: 127–150.

WAKAKURA, M.; UTSUNOMIYA-KAWASAKI, I.; ISHIKAWA, S. (1998) Rapid increase in cytosolic calcium ion concentration mediated by acetylcholine receptors in cultured retinal neurons and Müller cells. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.** 236: 934–939.

WERBLIN, F. (1991) Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture]. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 32: 459–483.

WIESE, C.; ROLLETSCHEKA, A.; KANIA, G.; BLYSZCZUKA, P.; TARASOV, K.V.; TARASOV, Y.; WERSTO, R. P.; BOHELER, R.P.; WOBUS, A.M. (2004) Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell. Mol. Life Sci.** 61: 2510–2522.

WITKOVSKY, P. (2004) Dopamine and retinal function. **Doc. Ophthalmol.** 108: 17–40.

WU D.M.; SCHNEIDERMAN T.; BURGETT J.; GOKHALE P.; BARTHEL L.; RAYMOND P.A. (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 42: 2115-2124.

ZHANG, J.; YANG, X.L. (1999) GABA(B) receptors in Müller cells of the bullfrog retina. **Neuroreport.** 10: 1833–183.

ZHANG, S.S.; FU, X.Y.; BARNSTABLE, C.J. (2002) Tissue culture studies of retinal development. **Methods** 28: 4439-47.

# 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](#)