

Centro de Estudos Gerais  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**ERICK CORREIA LOIOLA**

**LIBERAÇÃO DE ATP DE CÉLULAS GLIAIS  
DE RETINA DE PINTO EM CULTURA**

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

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Marques Ventura

**uff**  
**NITERÓI**  
**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ERICK CORREIA LOIOLA**

**LIBERAÇÃO DE ATP DE CÉLULAS GLIAIS DE  
RETINA DE PINTO EM CULTURA**

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

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

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Marques Ventura

Niterói

2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica, do Programa de Neurociências do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob orientação de Ana Lúcia Marques Ventura e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*À minha família*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu Todo-Poderoso Deus, o único capaz de criar tudo a partir do nada; de gerar a certeza em meio a dúvida; de produzir força quando a fraqueza nos alcança; de incitar motivação quando o desânimo se aproxima; de dar vida quando a morte é certa, de realizar milagres diante de situações impossíveis. Que toda honra seja dada ao Rei da Glória, pois sem ele nada posso fazer.

À minha família. Pai e mãe, exemplos de homem e mulher, sempre intercedendo por mim. Sharlene e Patrick, mais que irmãos, amo muitíssimo vocês. A vocês que amam e confiam em mim incondicionalmente e sempre torceram para que os experimentos dessem certo. Aos meus avós, tios, primos e agregados, que sempre me apoiaram. Tanto aos que estão perto, quanto aos que estão longe, meu sincero Muito Obrigado!

À minha orientadora Ana Lúcia Marques Ventura, pela dedicação, cuidado e motivação desde a graduação. Sempre presente durante todo o tempo, nos momentos de descontração e também de preocupação. E uma paciência de Jó comigo.

Aos professores do departamento e ao seu empenho em nossa formação.

Muito importante também para este trabalho são os meus amigos do departamento, Guilherme, Isis, Roxana, Thayane, Karina, Mariana, Joyce, Sarah, Maria, Rodrigo e Aninha. Vocês são muito especiais pra mim, pessoas incríveis que marcaram a minha vida. Obrigado pela confiança e por sempre levantarem meu ânimo. Quase ninguém me ouve tanto quanto vocês.

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.*

Galileu Galilei

# Sumário

<b>Lista de Figuras e Tabelas.....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Abreviações.....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>01</b>
A retina como modelo de estudo do SNC.....	01
Estrutura da retina.....	01
Desenvolvimento da retina.....	03
Células gliais da retina.....	05
Papel das células de Müller na fisiologia da retina.....	07
1) Acoplamento neurovascular.....	08
2) Condução de luz para o segmento externo dos fotorreceptores.....	08
3) Suporte metabólico e nutrição de neurônios.....	08
4) Fonte de células progenitoras.....	09
5) Modulação da transmissão sináptica.....	09
6) Homeostasia do K <sup>+</sup> .....	09
7) Controle de osmolaridade.....	10
8) Controle do pH.....	10
9) Captação e reciclagem de neurotransmissores.....	11



10) Proteção contra o estresse oxidativo.....	12
11) Liberação de D-serina.....	12
ATP como neurotransmissor.....	13
Sinalização purinérgica na retina mediada por receptores P2.....	18
Sinalização por receptores P2 na retina em desenvolvimento.....	20
Liberação de transmissores por exocitose em células gliais.....	20
Liberação de ATP por exocitose em células gliais.....	22
Sinalização por glutamato na retina.....	24
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Materiais e métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>4 Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>5 Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>66</b>

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura A: Representação esquemática da retina de galinha mostrando suas diferentes camadas e tipos celulares.....	02
Figura B: Representação esquemática do movimento nuclear intercinético e início de extratificação na retina.....	03
Figura C: Representação esquemática da gênese de células na retina de pinto em função das idades embrionárias.....	04
Figura D: Representação esquemática do curso temporal de morte celular, proliferação e diferenciação da retina durante o desenvolvimento do embrião de galinha.....	06
Figura E: Representação esquemática da captação e reciclagem de neurotransmissores na retina.....	12
Figura F: Receptores purinérgicos ligam ATP extracelular além dos produtos de reação resultantes de sua hidrólise por ectonucleotidases.....	14
Figura G: Receptores de membrana para adenosina e ATP extracelular.....	16
Figura H: Modelo do duplo papel de receptores P2Y e P2X na fisiologia e patologia de células gliais do SNC.....	17
Figura I: Representação dos subtipos de receptores para o glutamato.....	25
Tabela 1: Funções relacionadas às células de Müller.....	07
Tabela 2: Expressão de subtipos de receptores purinérgicos nos diferentes tipos celulares na retina.....	17

Figura 1: Marcação citoquímica com quinacrina de vesículas contendo ATP em células gliais em cultura.....	34
Figura 2: Efeito de Bafilomicina A1 sobre a marcação com quinacrina em células gliais em cultura.....	36
Figura 3: Marcação de vesículas com quinacrina em função do desenvolvimento de células gliais de retina em cultura. ....	37
Figura 4: Ausência de variação na marcação de vesículas contendo quinacrina em função do tempo de incubação e visualização das células.....	39
Figura 5: Liberação de vesículas marcadas com quinacrina induzida por aumento na concentração extracelular de $K^+$ .....	40
Figura 6: Dinâmica de liberação de vesículas com quinacrina induzida por aumento na concentração extracelular de $K^+$ .....	42
Figura 7: Efeito inibitório da retirada de cálcio interno sobre a liberação de vesículas com quinacrina induzida por aumento na concentração extracelular de $K^+$ .....	43
Figura 8: Liberação de ATP induzida por KCl 50 mM.....	45
Figura 9: Liberação de vesículas com quinacrina induzida por ionomicina.....	46
Figura 10: Liberação de vesículas maracadas com quinacrina induzida por glutamato.....	49
Figura 11: Liberação de ATP induzida por glutamato 1mM.....	50
Figura 12: Efeito da bafilomicina A1 e BAPTA-AM na liberação de ATP induzida por glutamato.....	51
Figura 13: Efeito dos antagonistas glutamatérgicos MK-801 e DNQX na liberação de vesículas maracadas com quinacrina induzida por glutamato.....	54

Figura 14: Efeito dos antagonistas glutamatérgicos na liberação de ATP induzida por glutamato.....	55
Figura 15: Liberação de vesículas com quinacrina induzida por agonistas glutamatérgicos.....	56
Figura 16: Liberação de ATP induzida por kainato.....	57

## Lista de abreviações

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: concentração intracelular de cálcio

[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>: concentração extracelular de potássio

ADP: adenosina 5'difosfato

AMP: adenosina 5' monofosfato

AMPA: α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato

ANP: peptídeo natriurético atrial

ATP: adenosina 5'-trifosfato

BAPTA: (1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'- ácido tetraacético)

CCG: camada de células ganglionares

CNE: camada nuclear externa

CNI: camada nuclear interna

CPE: camada plexiforme externa

CPI: camada plexiforme interna

DNQX: 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-diona

E8: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário

E8C14: oitavo dia de estágio de desenvolvimento embrionário cultivado por quatorze dias.

EAAT: transportador de aminoácido excitatório

EGTA: ácido tetraacético etileno glicol

E-NDPK: ectonucleosídeo difosfato kinase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

GABA: ácido gama-aminobutírico

GAT: transportador de GABA dependente de sódio e cloreto

GS: glutamina sintetase

KA: kainato

MAPK: proteína cinase ativada por mitogeno

MEM: meio mínimo essencial

mGluRs: receptores metabotrópicos para o glutamato

MK-801: Dizocilpina

NMDA: N-metil D-Aspartato

P1: receptor purinérgico 1

P2: receptor purinérgico 2

PKC: proteína cinase dependente de cálcio

PLC: fosfolipase C

Sb2: sinaptobrevina 2

SN: sistema nervoso

SNAP-23: proteína associada a sinaptossoma de 23 kDa

SNARE: receptor de ligação ao NSF solúvel

SNC: sistema nervoso central

UTP: uridina 5'-trifosfato

V-ATPase: ATPase vacuolar

VGLUT: transportador de glutamato vesicular

## Resumo

ATP é liberado por neurônios e age como um neurotransmissor e modulador no sistema nervoso assim como na retina. Além de neurônios, astrócitos corticais são capazes de liberar ATP de vesículas acídicas através de um processo dependente de cálcio. Neste estudo, investigamos o efeito da ativação de receptores de glutamato, da despolarização por KCl e da incubação com ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a liberação vesicular de ATP no único tipo de célula glial presente na retina de pinto, a glia de Müller. A exocitose de vesículas contendo ATP foi estimada utilizando o corante quinacrina que marca vesículas contendo ATP. Culturas enriquecidas de glia, obtidas de retinas de embriões de galinha com 8 dias, apresentam vesículas fluorescentes após incubação com quinacrina, que se torna mais evidente com o desenvolvimento da cultura. Esta marcação foi bloqueada pela incubação com bafilomicina A1 1  $\mu\text{M}$ , confirmando a natureza vesicular da marcação. A adição de KCl 50mM, glutamato 1mM ou ionomicina 5 $\mu\text{M}$  foi capaz de induzir uma diminuição na quantidade de vesículas fluorescentes após 10 minutos de estimulação. A liberação induzida por KCl foi inibida por BAPTA-AM 30  $\mu\text{M}$  e a liberação induzida por ionomicina inibida por EGTA 1 mM, mostrando que a liberação vesicular de ATP é dependente de cálcio. O conteúdo de ATP liberado das células foi estimado por luminescência. De acordo com a diminuição da marcação com quinacrina, o tratamento com KCl e glutamato induziram um aumento de ATP extracelular. A liberação induzida por glutamato foi inibida por BAPTA-AM e bafilomicina A1, mostrando que esta liberação induzida é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e proveniente de vesículas. A análise dos receptores de glutamato envolvidos na liberação de ATP mostrou que os receptores ionotrópicos AMPA/KA estão envolvidos com uma maior liberação de ATP que o receptor NMDA. Kainato 100 $\mu\text{M}$  induziu tanto a diminuição da marcação de vesículas quanto um aumento no ATP liberado, enquanto NMDA 100 $\mu\text{M}$  induziu menor liberação de vesículas observadas pela marcação com quinacrina. O uso de antagonistas destes receptores confirmou a maior participação de receptores não-NMDA na liberação de ATP. Estes resultados sugerem que células gliais de retina em cultura liberam ATP por aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estas células apresentam vesículas passíveis de serem coradas com quinacrina, possivelmente contendo ATP, e que podem liberar seu conteúdo por estimulação de receptores glutamatérgicos ou despolarização.

Palavras Chave: ATP, Retina, Exocitose, Glia de Müller

## Abstract

ATP is released by neurons and acts as a neurotransmitter or modulator in the nervous system as in the retina. Also, cortical astrocytes are capable of releasing ATP from acidic vesicles in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent way. In the present work, we investigated the effect of glutamate receptor activation, high concentration of  $\text{K}^+$  and of  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore on the release of ATP from the unique chick retinal glial cell, the Müller glia. The exocytosis of ATP-containing vesicles was estimated using quinacrine, a fluorescent dye known to selectively label high levels of ATP in vesicles. Chick embryo retinal cell cultures enriched in glia presented fluorescent puncta that increased along the development of the cultures. This staining was blocked by incubation with 1  $\mu\text{M}$  bafilomycin A1, confirming the vesicular nature of the stain. KCl (50mM), glutamate (1mM) and ionomycin (5 $\mu\text{M}$ ) were capable of inducing a progressive decrease in the amount of fluorescent vesicles, mainly after 10 minutes of stimulation. KCl-induced decrease of staining was inhibited by 30  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM and the ionomycin effect was blocked by 1 mM EGTA, showing that the vesicular ATP release was calcium-dependent. The content of ATP released by the cells was estimated by luminescence. According to the decrease in quinacrine staining, the treatment with KCl and glutamate induced an increase in extracellular ATP. Glutamate-induced ATP release was inhibited by BAPTA-AM and bafilomycin A1, suggesting that ATP-induced release was calcium-dependent and derived from vesicles. Analysis of which glutamate receptors are involved in ATP release showed that ionotropic AMPA/KA receptors are responsible for a greater ATP release than NMDA receptors. Kainate (100 $\mu\text{M}$ ) induced a decrease in quinacrine staining and an increase in ATP measured by luminescence, while 100  $\mu\text{M}$  NMDA induced a minor release of vesicles observed with quinacrine. The use of glutamate receptor antagonists confirmed a major role of non-NMDA receptors in ATP release. These results suggest that retinal glial cells in culture release ATP when intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase is stimulated. These cells present vesicles that possibly contain ATP that can be stained with quinacrine and that can release its content by glutamatergic receptor stimulation or depolarization.

Keywords: ATP, Retina, Exocytosis, Müller Glia



# 1 Introdução

## ***A retina como modelo de estudo do SNC***

Embora a retina se localize em uma região periférica, ela é parte do sistema nervoso central (SNC) e constitui um modelo experimental bastante útil para o estudo deste sistema, já que compartilha a mesma origem embrionária e segue os mesmos padrões de desenvolvimento do cérebro.

A retina de pinto, em particular, é um excelente modelo para o estudo do SNC, por diversos motivos:

1- Apresenta poucos tipos celulares. Cinco tipos de neurônios estão presentes: fotorreceptores, células bipolares, ganglionares, horizontais e amácrinas. Um tipo principal de célula glial, a glia de Müller também está presente (para revisão, Rodieck, 1998).

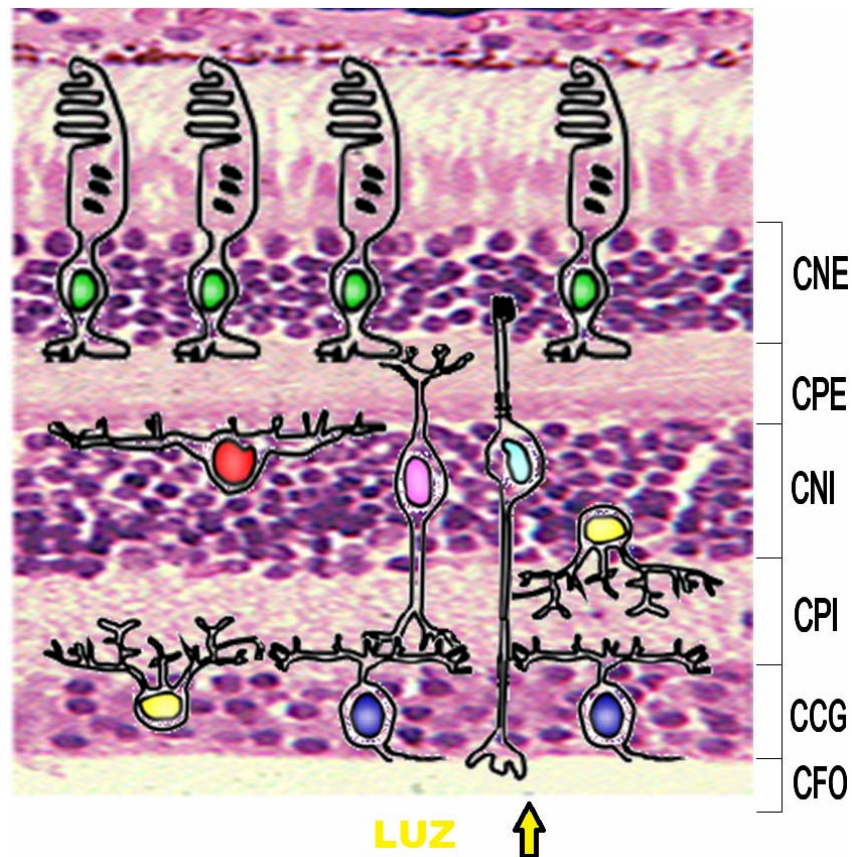
2- Possui uma estruturação clara, com camadas celulares definidas e uma rede de circuitos sinápticos restrita ao próprio tecido.

Para estudos de neurogênese, morte e diferenciação celular no SNC, este tecido também é um bom modelo uma vez que é uma estrutura de fácil acesso em quase todas as fases do desenvolvimento embrionário. Este tecido pode facilmente ser dissociado e, sob condições apropriadas, suas células desenvolvem muitas das propriedades da retina intacta, incluindo a formação de sinapses (de Mello, 1982).

## ***Estrutura da retina***

As camadas da retina estão organizadas da seguinte forma (Figura A): Camada Nuclear Externa (CNE), formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores; Camada Plexiforme Externa (CPE), região onde ocorrem as sinapses entre os fotorreceptores, as células horizontais e bipolares; Camada Nuclear Interna (CNI) formada pelos corpos das células horizontais, das bipolares, das amácrinas e do principal tipo de célula glial da retina: a glia de Müller; Em seguida, uma segunda camada de processos, a Camada Plexiforme Interna (CPI), onde ocorrem contatos sinápticos entre células bipolares, amácrinas e ganglionares; Os corpos das células ganglionares e algumas

amácrinas deslocadas formam a camada mais interna da retina, a Camada de Células Ganglionares (CCG).



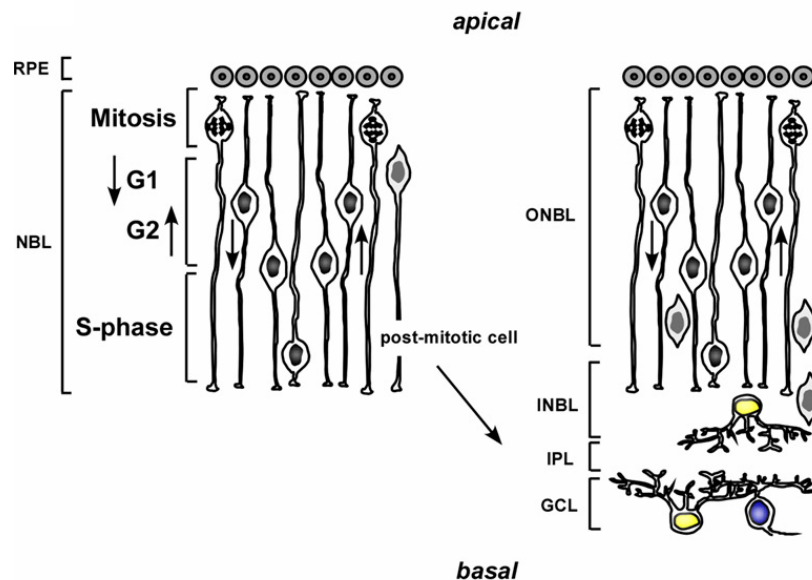
**Figura A: Representação esquemática da retina mostrando suas diferentes camadas e tipos celulares.** Corte histológico de retina. Células: azul escuro: células ganglionares; amarelo: células amácrinas; rosa: célula bipolar; azul claro: glia de Müller; vermelho: célula horizontal; verde: fotorreceptor cone. Modificado de Martins e Pearson, 2007.

O tecido retiniano utiliza a maioria dos neurotransmissores e neuromoduladores encontrados no cérebro e em grande parte do SNC. O principal neurotransmissor utilizado na via transversal envolvendo os fotorreceptores, as bipolares e as ganglionares desse tecido é o glutamato. As populações heterogêneas de células amácrinas empregam um amplo espectro de neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo a substância P, a dopamina, encefalinas, o glucagon, a somastatina, a serotonina, a acetilcolina, a neurotensina, o neuropeptídeo Y, o glutamato, o GABA, entre outros (Mey e Thanos, 2000).

Tem sido verificado também, que o ATP tem um papel importante na modulação da neurotransmissão da retina. A fisiologia deste modulador na retina será abordada posteriormente.

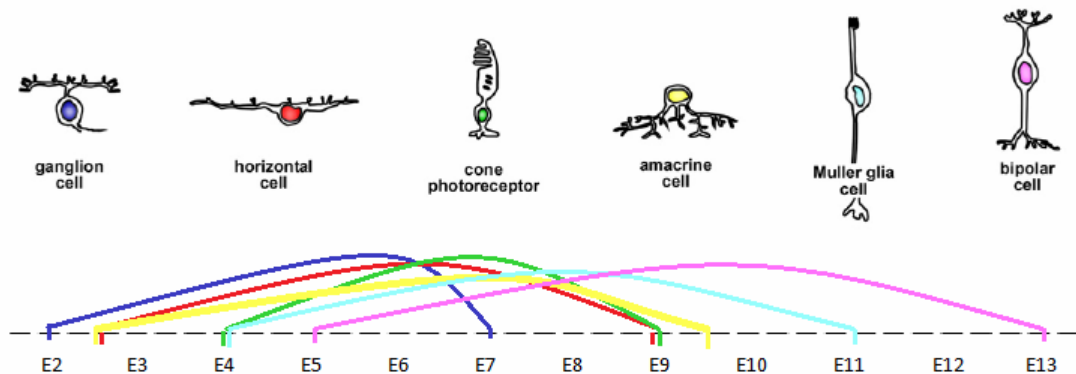
### ***Desenvolvimento da retina***

O desenvolvimento da retina segue os mesmos padrões de mitose, migração, diferenciação e morte celular encontrados no sistema nervoso em geral. Em estágios precoces do desenvolvimento, dois estratos na retina neural, a zona ventricular e a camada neuroblástica podem ser distinguidos. A zona ventricular contém principalmente células em mitose que migram para dentro da camada neuroblástica ao final da sua divisão (Mey e Thanos, 2000). Os precursores neurais sofrem inúmeras mitoses, durante as quais seus núcleos migram transversalmente pela camada neuroblástica. A fase S ocorre na superfície basal, enquanto a mitose propriamente dita ocorre na superfície apical, adjacente ao epitélio pigmentar (Martins e Pearson, 2007). Os núcleos migram entre estas duas superfícies durante as fases G1 e G2, em um processo chamado 'movimento nuclear intercinético' (Figura B).



**Figura B: Representação esquemática do movimento nuclear intercinético e início de estratificação na retina.** Durante a mitose de precursores neurais, os núcleos migram transversalmente pela camada neuroblástica. Azul escuro: células ganglionares; Amarelo: células amácrinas; Cinza: precursores neurais. Retirado de Martins e Pearson, 2007.

À medida que mais células se tornam pós-mitóticas, a retina passa da fase de proliferação para a fase de diferenciação. Os neuroblastos retinianos saem do ciclo celular de uma maneira ordenada e sucessiva (Figura C). Na galinha, cujo desenvolvimento embrionário dura 21 dias, a formação do cálice óptico ocorre entre o segundo e terceiro dia embrionário (E2 e E3). Os neuroblastos que irão gerar células ganglionares são os primeiros a saírem do ciclo celular a partir de E2 e principalmente entre E5 e E7. Os progenitores de células amácrinas ou horizontais começam a sair do ciclo em E2-3, sendo o ápice deste processo entre E6 e E7. Tanto as células de Müller quanto os fotorreceptores começam a ser gerados em E4, sendo seu maior nível de produção em E8. As últimas células a cessarem a divisão são as células bipolares que começam a sair do ciclo em E5. As células ganglionares finalizam sua neurogênese em E7, as horizontais e os fotorreceptores em E9, seguidas pelas células amácrinas em E10. Já os progenitores das células de Müller e bipolares são os últimos a saírem do ciclo celular em E11 e E13, respectivamente (Fujita e Horii, 1963; Kahn, 1974; Spence e Robson, 1989; Prada et al., 1991).



**Figura C: Representação esquemática da gênese de células na retina de pinto em função das idades embrionárias.** As curvas representam a fase em que os progenitores neurais saem do ciclo celular. Linha inferior: Dias embrionários. Azul escuro: células ganglionares; Amarelo: células amácrinas; Rosa: células bipolares; Azul claro: glia de Müller; Vermelho: células horizontais; Verde: fotorreceptores do tipo cone. Modificado de Martins e Pearson, 2007.

Os processos de migração e o crescimento de neuritos transformam a retina de pinto de um neuroepitélio pseudo-estratificado em um órgão sensorial multi-laminado, cujo padrão de estratificação está essencialmente estabelecido em E16 (Mey e Thanos, 2000).

Após a saída do ciclo celular, cada tipo celular da retina inicia sua diferenciação morfológica e bioquímica em estágios variáveis. Fotorreceptores, por exemplo, finalizam sua neurogênese em E9, porém sua maturação só é observada entre E16 e P0 (Mey e Thanos, 2000). Já células amácrinas dopaminérgicas são geradas entre os estágios de E3 e E7, mas só se diferenciam morfológicamente em E14 (Gardino et al., 1993).

A glia de Müller ainda imatura (glia radial) tem um importante papel para a organização laminar da retina, provendo um sistema de referência para migração celular e de suporte para a sinaptogênese (Stier e Schlosshauer, 1998). No entanto, a expressão da enzima glutamina sintetase, importante para a função glial de reciclagem sináptica do glutamato, só aparece em células gliais de Müller já diferenciadas em retinas mais amadurecidas (Willbold e Layer, 1998).

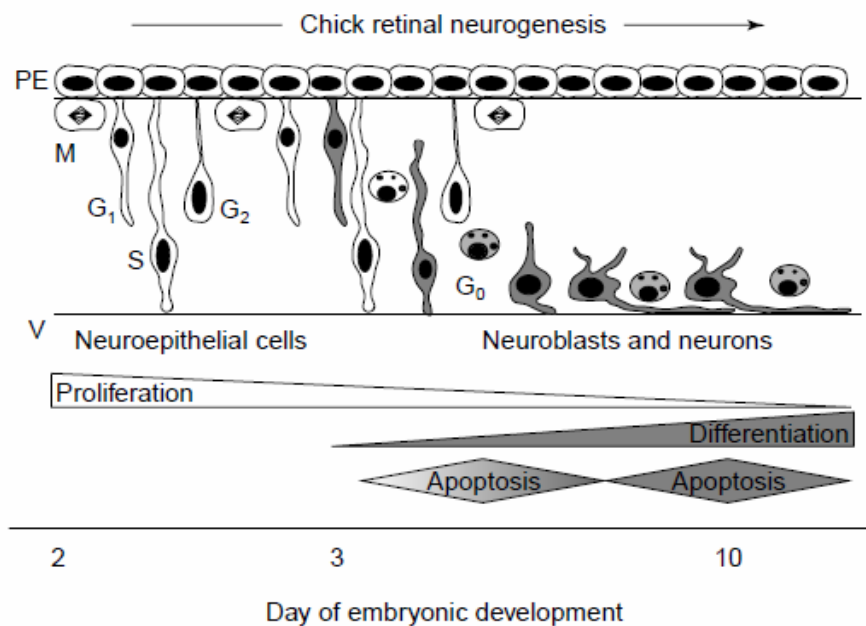
A apoptose tem um papel importante na regulação do número de neurônios no sistema nervoso em estágios precoces do desenvolvimento. Durante o desenvolvimento da retina de galinha, duas ondas de morte celular programada são encontradas (Cook et al., 1998; Chavarría et al., 2007) (Figura D). A primeira, entre os estágios de E4 e E7, é sobreposta ao período de neurogênese e diferenciação de células ganglionares (Cuadros e Rios, 1988). A segunda onda ocorre entre os estágios de E10 e E14, quando as células ganglionares começam a ser dependentes do suporte trófico de seus alvos (Vecino et al., 2004).

### ***Células gliais da retina***

A retina de vertebrados contém quatro tipos de células gliais, sendo a glia de Müller a mais abundante, compreendendo 90% das células gliais da retina. Este tipo glial está presente, salvo na entrada do nervo óptico, em todas as regiões da retina. Além da glia de Müller, astrócitos e microglia são os outros tipos gliais mais observados na retina. Estas células estão presentes apenas

em retinas de alguns mamíferos e compreendem menos de 10% das células gliais da retina. O quarto tipo de glia, os oligodendrócitos são observados na retina apenas em axônios mielinizados de células ganglionares que estão presentes na camada de fibras (para revisão, Sarthy e Ripps, 2001).

Em espécies com retinas não vascularizadas (répteis, anfíbios, aves e alguns mamíferos), poucas células são encontradas na retina neural em adição a glia de Müller. A glia se estende por todas as camadas da retina, formando as membranas limitantes interna e externa e tem seus corpos celulares localizados na camada nuclear interna e seus processos expandindo por toda extensão da retina. Estas células interagem com a maioria dos neurônios da retina (Sarthy e Ripps, 2001).



**Figura D: Representação esquemática do curso temporal de morte celular, proliferação e diferenciação da retina durante o desenvolvimento do embrião de galinha.** Note que a morte celular é um processo que ocorre naturalmente durante a gênese precoce dos neurônios da retina embrionária de galinha. Neste tecido, ocorrem duas fases de apoptose: uma fase envolvendo a morte de precursores neurais de diversos tipos celulares (pico em E5) e uma segunda fase envolvendo a morte de células ganglionares e outros neurônios em diferenciação ou já diferenciados (pico em E10). PE, epitélio pigmentar; V, superfície vítrea. Retirado de De la Rosa e De Pablo, 2000.

### ***Papel das células de Müller na fisiologia da retina***

A célula de Müller desempenha diversas funções na retina, incluindo as funções associadas à oligodendrócitos, astrócitos e células ependimais em outras regiões do SNC (Newman e Reichenbach, 1996). A glia de Müller fornece suporte estrutural e metabólico aos neurônios. Além disso, responde a uma variedade de sinais neuronais e ativamente controla os níveis de  $K^+$ ,  $H^+$  e neurotransmissores no espaço extracelular. Algumas das funções relacionadas à glia de Müller serão relatadas a seguir (Newman e Reichenbach, 1996; Bringmann et al., 2006) (Tabela 1).

<b>Funções das Células de Müller</b>	
<b>Desenvolvimento da retina</b>	Suporte para orientação (glia radial imatura)
<b>Acoplamento neurovascular</b>	Síntese e liberação de substâncias vasoativas
<b>Condução da luz ao segmento externo dos fotorreceptores</b>	A glia de Müller possui propriedades semelhantes a fibras ópticas.
<b>Homeostasia do <math>K^+</math> e controle de osmolaridade e pH</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Remoção do <math>K^+</math> externo (sifonamento do <math>K^+</math>)</li><li>- Desidratação da retina interna</li><li>- Tamponamento de <math>CO_2</math></li></ul>
<b>Captção e reciclagem de neurotransmissores</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Captção de glutamato, GABA, glicina e D-serina (Para revisão: Bringmann et al., 2009)</li><li>- Reciclagem de neurotransmissores, glutamato e GABA</li></ul>
<b>Liberação de substâncias neuroativas</b>	Estoque e liberação de: <ul style="list-style-type: none"><li>- D-serina</li><li>- Glutamato</li><li>- ATP</li></ul>
<b>Proteção contra o estresse oxidativo.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Produção de glutatona: O glutamato captado pelas células de Müller é utilizado na produção de glutatona (Pow e Crook, 1995).</li></ul>
<b>Suporte metabólico e nutrição dos neurônios.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Liberação de piruvato para neurônios</li><li>- Estoque de glicogênio e glicogenólise (Para revisão: Bringmann et al., 2006)</li></ul>
<b>Fonte de células progenitoras.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Células de Müller podem dediferenciar, proliferar e produzir novas células (Para revisão: Fischer e Reh, 2003)</li></ul>

**Tabela 1: Funções relacionadas às células de Müller.** Modificado de Bringmann et al., 2006

### 1) Acoplamento Neurovascular:

A atividade neuronal normalmente evoca mudanças localizadas no fluxo sanguíneo, um processo chamado acoplamento neurovascular. O fluxo sanguíneo no sistema nervoso é dinamicamente regulado para que neurônios ativos recebam mais oxigênio e glicose do que neurônios inativos. Na retina, o acoplamento neurovascular é mediado pelas células de Müller. A atividade neuronal gera uma sinalização purinérgica que induz um aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular na glia e, conseqüentemente, a produção e liberação de agentes vasoativos. Esses agentes como metabólitos do ácido araquidônico e prostaglandinas agem regulando o diâmetro dos vasos sanguíneos adjacentes (Metea e Newman, 2006).

### 2) Condução de luz para o segmento externo dos fotorreceptores:

Em uma série de elegantes experimentos, Franze e colaboradores, em 2007, mostraram que a glia de Müller apresenta uma ultra-estrutura peculiar que permite a passagem de luz causando o mínimo de distorção e perda luminosa na retina. Na glia de Müller organelas dispersivas de luz, como mitocôndrias, são raras, enquanto os filamentos de actina são orientados ao longo do eixo celular. Os pés das células de Müller cobrem toda a superfície interna da retina e estes possuem um baixo índice de refração, permitindo uma entrada eficiente de luz do humor vítreo para dentro das células de Müller. Em conjunto a isso, o seu formato de funil e sua orientação ao longo da via de passagem de luz, conferem propriedades semelhantes às encontradas em fibras ópticas.

### 3) Suporte metabólico e nutrição de neurônios:

O metabolismo energético das células gliais ocorre principalmente por glicólise anaeróbica, o que gera produtos como o piruvato. Estes produtos de metabolismo são liberados por células gliais e captados por neurônios, que podem utilizá-los em seu próprio ciclo de Krebs. Além disso, a glia possui reservas de glicogênio que podem ser metabolizadas por glicogenólise por aumento de atividade de neurônios (para revisão, Bringmann et al., 2006).



#### 4) Fonte de células progenitoras:

Em determinadas condições, a glia de Müller parece ser uma fonte de células precursoras que podem gerar novos neurônios na retina. Quando retinas são submetidas a danos ou expostas a fatores de crescimento exógenos, estas células, mesmo que totalmente diferenciadas em tecidos adultos, podem se desdiferenciar, proliferar, expressar combinações de fatores de transcrição normalmente expressados por progenitores embrionários e produzir novos neurônios e células gliais (para revisão, Fischer e Reh, 2003).

#### 5) Modulação da Transmissão Sináptica:

Células de Müller modulam direta e indiretamente a excitabilidade e transmissão neuronal, além de exercer efeitos sobre as próprias células gliais. A modulação direta acontece pela liberação de substâncias neuroativas, como glutamato e ATP. Já a modulação indireta ocorre pela captação e reciclagem de neurotransmissores, pela liberação de moduladores sinápticos como a D-serina, pelo controle do pH e pela retirada de íons do meio extracelular (Newman, 2004).

#### 6) Homeostasia do $K^+$ :

A estimulação da retina com luz resulta em ativação neuronal e aumento na concentração extracelular de potássio  $[K^+]_o$  nas camadas plexiformes interna e externa deste tecido (Karowski e Proenza, 1977). Esse aumento na  $[K^+]_o$  normalmente deve ser rapidamente revertido para limitar flutuações na excitabilidade neuronal. Células de Müller removem o excesso de  $K^+$  do espaço extracelular por vários mecanismos. Estas células captam e estocam temporariamente o  $K^+$ , com o influxo do íon ocorrendo por processos ativos ( $Na^+K^+$ -ATPase) e passivos. O  $K^+$  também pode ser removido do meio extracelular por um mecanismo de tamponamento espacial (Newman et al., 1984). O aumento da  $[K^+]_o$  nas camadas plexiformes provocam o influxo do íon, despolarizando localmente a glia de Müller, o potássio é então liberado destas células em outros locais como o espaço subretinal, vasos sanguíneos e humor vítreo. O tamponamento espacial do  $K^+$  decorrente deste processo redistribui efetivamente o potássio extracelular. Este processo de tamponamento espacial

é chamado de “sifonamento do potássio” (para revisão, Newman e Reichenbach, 1996).

#### 7) Controle de osmolaridade:

Em condições normais, a retina acumula água, que é continuamente redistribuída para fora da retina neural pelo epitélio pigmentar, que desidrata o espaço subretinal, e por células de Müller, que desidratam o tecido internamente. A retirada de água pela glia segue um gradiente de íons como o  $K^+$ . A glia de Müller co-expressa aquaporinas (proteínas transportadoras de água) com canais de  $K^+$  relacionados ao sifonamento do potássio. Portanto, em células de Müller, o controle de osmolaridade está relacionado com o tamponamento espacial do  $K^+$  (para revisão, Bringmann et al., 2006). A interrupção desta via por patologias que afetam células gliais, levam a formação do edema macular, uma via final de várias doenças oculares (Bringmann et al., 2004).

#### 8) Controle do pH:

A atividade neuronal na retina gera uma alcalinização extracelular (Borgula et al., 1989), sendo a manutenção do pH regulada por células de Müller. A glia apresenta um sistema de co-transporte de  $Na^+ / HCO_3^-$  (um íon  $Na^+$  para três íons  $HCO_3^-$ ) (Newman, 1991) e como este transporte é eletrogênico, a despolarização da célula resulta na retirada de íons  $HCO_3^-$ , acidificando o meio (Newman, 1996). Durante a atividade neuronal, as células de Müller são despolarizadas pelo aumento da  $[K^+]_o$ , ocorrendo um aumento na atividade do sistema de transporte de  $Na^+ / HCO_3^-$  que irá acidificar o meio, o que neutraliza a alcalinização causada pela atividade neuronal. Além disso, as células de Müller facilitam a retirada do  $CO_2$  produzido pela atividade neuronal. O  $CO_2$  é rapidamente convertido em  $HCO_3^-$  e  $H^+$  pela enzima anidrase carbônica encontrada na superfície e no interior das células de Müller (Newman, 1994). O  $HCO_3^-$  pode ser então transportado para o humor vítreo por co-transportadores  $Na^+ / HCO_3^-$ . A glia ainda pode modular a excitabilidade neuronal pela acidificação do meio. Uma acidificação de 0.05 unidades de pH produz uma redução de 24% na transmissão sináptica entre fotorreceptores e neurônios de segunda ordem (Barnes et al., 1993).

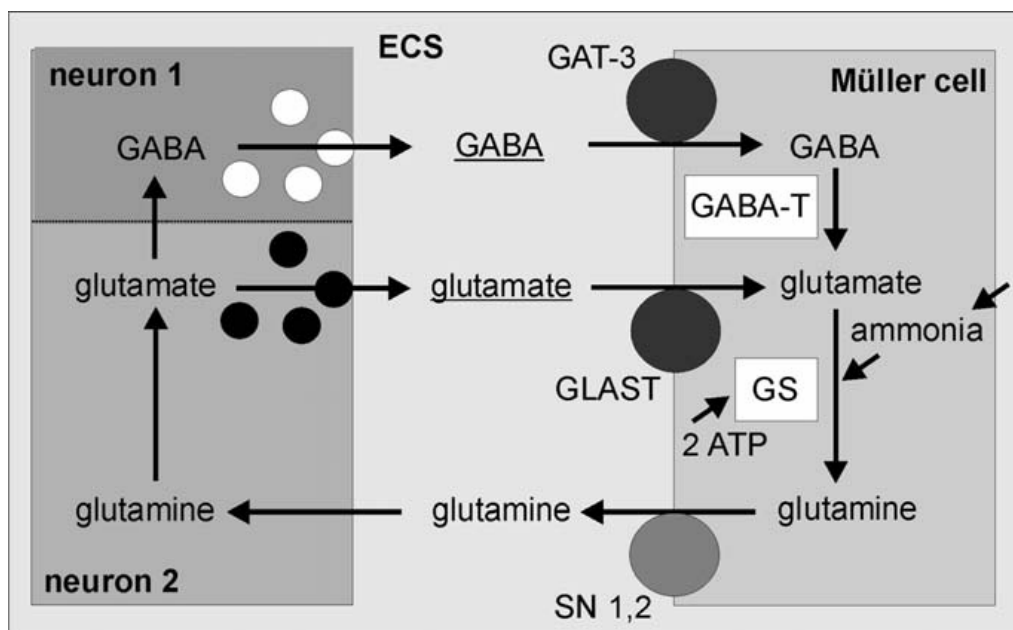
### 9) Captação e Reciclagem de Neurotransmissores:

Células de Müller são responsáveis pela maior parte da reciclagem dos neurotransmissores nas interações neuro-gliais. Para a retirada rápida de transmissores das fendas sinápticas, a glia de Müller expressa sistemas de captação para transmissores aminoácidos como o glutamato (Sarthy et al., 2005), GABA (Biedermann et al., 2002) e glicina (Gadea et al., 2002) (Figura E).

A retirada de glutamato da sinapse pela célula de Müller é requerida para o funcionamento normal de sinapses excitatórias e para a prevenção da neurotoxicidade. O mau funcionamento do transporte de glutamato da glia resulta em níveis aumentados de glutamato, que podem contribuir para a disfunção neuronal e apoptose na retina em situações patológicas (Barnett e Pow, 2000). A glia de Müller expressa o transportador glutamato/aspartato, EAAT, que é o transportador predominante na remoção de glutamato na retina (Rauen et al., 1998). Após a captação pelas células de Müller, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase, GS, que é expressa somente nestas células (Willbold e Layer, 1998).

A captação de GABA é principalmente mediada por transportadores de GABA de alta-afinidade dependentes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (GATs), onde 2 íons  $\text{Na}^+$  e 1  $\text{Cl}^-$  são co-transportados com uma molécula de GABA (Biedermann et al., 2002). Na retina de mamíferos, os neurônios e as células de Müller removem GABA do espaço extracelular, enquanto que em retinas de aves e vertebrados inferiores, a remoção de GABA é quase exclusivamente mediada por células neuronais (para revisão, Bringmann et al., 2009). No entanto, células de Müller de ave em cultura são capazes de captar GABA (De Sampaio Schitine et al., 2007).

Após a captação do GABA em células de Müller, o neurotransmissor é rapidamente convertido em glutamato pela GABA transaminase (Biedermann et al., 2002), que então é inserido na via da GS, de maneira semelhante ao glutamato captado. A glutamina é então disponibilizada de volta para os neurônios como um precursor para a síntese de glutamato e GABA (ciclo glutamato-glutamina da retina) (Pow e Crook, 1996).



**Figura E: Representação esquemática da captação e reciclagem de neurotransmissores na retina.** Um neurônio GABAérgico (neurônio 1) e um neurônio glutamatérgico (neurônio 2) foram representados juntos para simplificação. Eles liberam os neurotransmissores GABA e Glutamato respectivamente, no espaço extracelular (ECS), de onde são rapidamente captados pela célula de Müller. Para este propósito a célula possui transportadores de captação de alta-afinidade para GABA (GAT-3) e glutamato (GLAST). Uma vez entrando no citoplasma, GABA é convertido em glutamato pela ação da GABA-transaminase (GABA-T). Glutamato então é transformado em uma substância não-neuroativa, a glutamina pela ação da enzima específica da glia glutamina sintetase (GS). A glutamina é então exportada por transportadores de glutamina, SN1 e SN2, para o ECS, onde os neurônios podem captá-la e utilizar na síntese de glutamato e GABA. Retirado de Bringmann et al., 2006.

#### 10) Proteção contra o estresse oxidativo:

A glutathiona reduzida é um importante antioxidante que protege as células contra estresse oxidativo e nitrosativo pela neutralização de radicais livres. O glutamato captado pelas células de Müller também é utilizado para a produção de glutathiona, que pode ser liberada, protegendo células neuronais e glia do dano causado por radicais livres (Pow e Crook, 1995; Oliveira et al., 2010).

#### 11) Liberação de D-serina:

D-serina é um ligante endógeno do sítio modulatório da glicina no receptor glutamatérgico NMDA. Este aminoácido é liberado por células de Müller na retina (Miller, 2004). D-serina ativa o sítio de ligação da glicina com com uma

potência até 3 vezes maior que a própria glicina, sendo necessário para a total atividade dos receptores NMDA em células ganglionares. A D-serina e a serina racemase, sua enzima de síntese, estão presentes na glia de Müller que parece ser a principal fonte deste aminoácido na retina (Stevens et al., 2003).

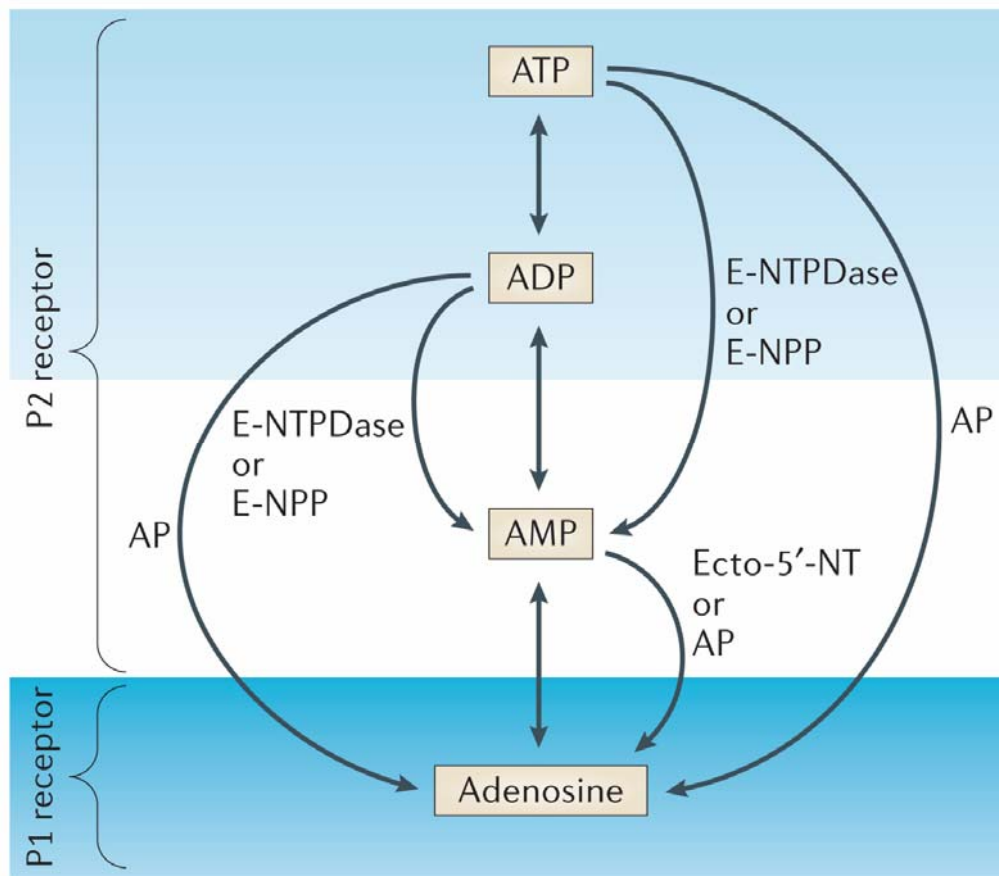
### ***ATP como neurotransmissor***

Durante um longo período, o ATP foi reconhecido como a fonte de energia intracelular, sendo a aceitação de seu papel como molécula sinalizadora extracelular muito mais recente. Os potentes efeitos do ATP no coração e em vasos sanguíneos foram primeiramente descritos por Drury e Szent-Györgvi em 1929. Mais de 40 anos depois, o ATP foi proposto como neurotransmissor em neurônios não-colinérgicos, não-adrenérgicos no intestino e na bexiga e o termo purinérgico foi então estabelecido (Burnstock, 1972).

Efeitos complexos da sinalização do ATP ficaram imediatamente aparentes, como a excitação ou inibição da neurotransmissão (para revisão, Fields e Burnstock, 2006). Foi reconhecido, então, que o ATP era prontamente clivado por hidrólise enzimática, formando ADP, AMP e adenosina (Figura F). A suposição de que deveria existir uma complexa família de receptores de membrana especializados em responder ao diferentes produtos de reação da hidrólise do ATP foi confirmado, havendo a identificação e caracterização de 19 receptores purinérgicos distintos (Burnstock, 2006).

Enquanto neurotransmissores clássicos são regulados pela liberação e recaptação do transmissor da fenda sináptica, o ATP é degradado por ectonucleotidases e cada um dos seus produtos da hidrólise pode ativar diferentes tipos de receptores (Figura G). Várias famílias de enzimas estão envolvidas na hidrólise de ATP liberado para o meio extracelular (Figura F): As ectonucleosídeo trifosfato hidrolase (E-NTPDases), das quais NTPDase 1,2,3 e 8 são extracelulares; As ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), que podem ser de três sub-tipos: fosfatases alcalinas, ecto-5'-nucleotidases ectonucleosídeo difosfato cinase (E-NDPKs). A NTPDase1 hidrolisa ATP diretamente para AMP e o UTP para UDP, enquanto a NTPDase2 hidrolisa ATP para ADP. Já a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP para

adenosina. Essas enzimas possuem uma distribuição ampla no SN e normalmente são expressas em conjunto (para revisão, Zimmermann, 2001).



**Figura F: Receptores purinérgicos ligam ATP extracelular além dos produtos de reação resultantes de sua hidrólise por ectonucleotidasas.** Receptores P2 ligam ATP e ADP, enquanto receptores P1 ligam adenosina. Este metabolismo de ATP extracelular é regulado por diversas ectonucleotidasas, incluindo membros da família ENTPDase e da família E-NPP. Ecto-5'-nucleotidase e alcalino fosfatase (AP) catalisam a degradação do nucleotídeo para adenosina. Retirado de Fields e Burnstock, 2006.

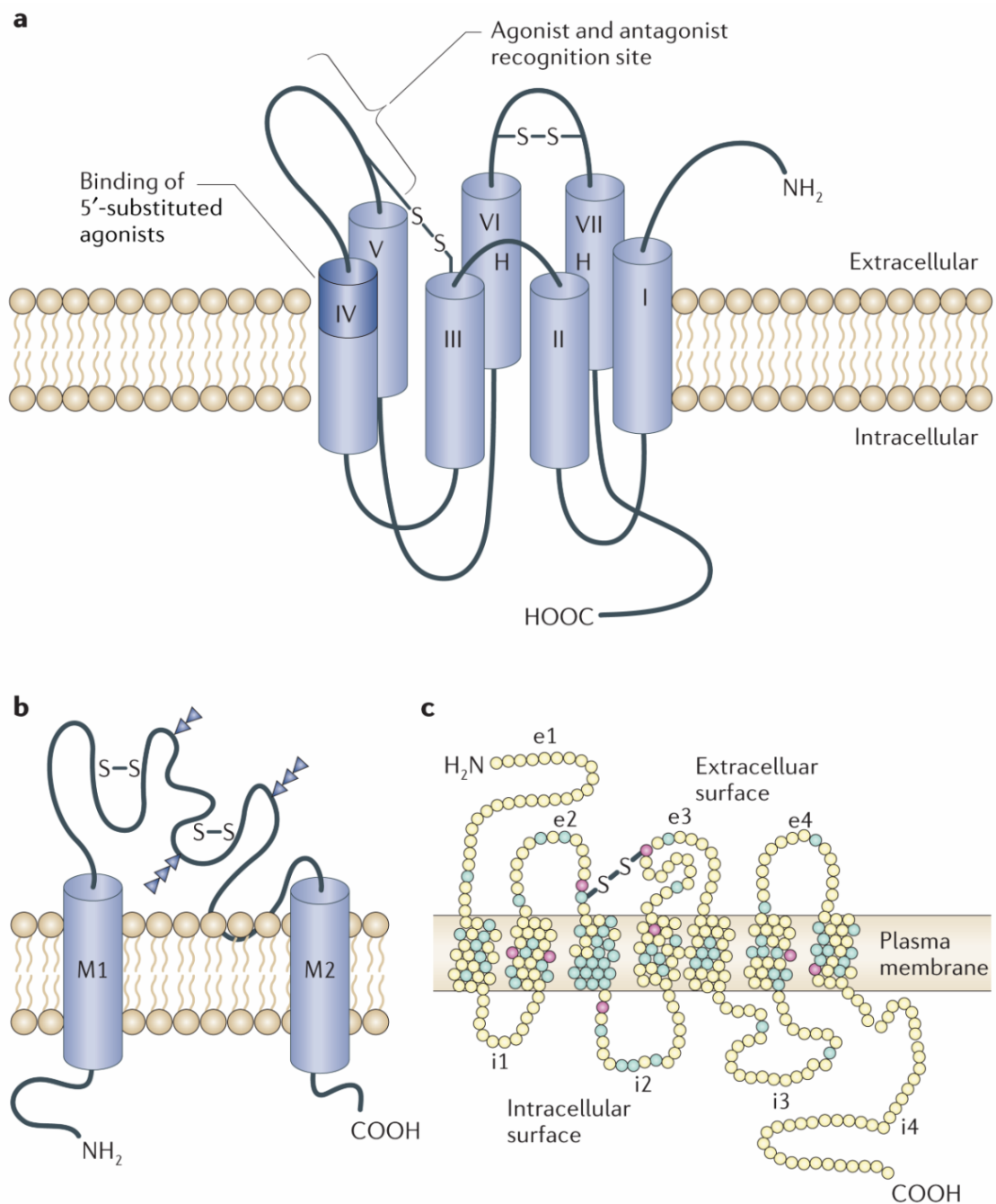
Diversos estudos mostraram que ATP pode ser co-liberado de vesículas sinápticas de neurônios, se tornando acessível às células gliais que circundam as sinapses. Estudos farmacológicos de receptores revelaram que a maior parte das células gliais do SN (astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, células de Müller e microglia) expressam receptores purinérgicos (para revisão, Fields e Stevens, 2000). O ATP, então, pode agir como sinalizador entre neurônios e células gliais, induzindo aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  (para revisão, Fields e Burnstock, 2006).

A concentração de ATP em vesículas liberadas por neurônios pode chegar a 1000 mM. Porém, a principal fonte de ATP que age em purinoceptores em tecidos nervosos são células morrendo ou que sofreram algum tipo de dano. A liberação de ATP de muitas células é uma resposta fisiológica ou patofisiológica ao estresse mecânico, hipóxia ou inflamação (para revisão, Bodin e Burnstock, 2001b). A liberação de ATP por células gliais será discutida adiante.

Purinas liberadas no meio extracelular exercem suas funções através de receptores de membrana purinérgicos do tipo P1 ou P2 (Burnstock, 1997). (FIGURA G). Baseado em sua estrutura, em evidências bioquímicas e ações farmacológicas, os receptores P2 foram subdivididos em duas famílias, ionotrópicos e metabotrópicos: P2X e P2Y, respectivamente (Abbraccio e Burnstock, 1994). A família de receptores P2X foi identificada como canais iônicos dependentes de ligantes, tendo sido clonados sete subtipos (P2X1-7). A família de receptores P2Y está envolvida com a ativação de proteínas G (Abbraccio e Burnstock, 1994; Di Virgilio, 2001) e até o momento foram clonados oito subtipos (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14). Estes receptores metabotrópicos têm sete domínios transmembrana, uma porção N-terminal localizada extracelularmente, uma porção C-terminal voltada para o meio intracelular e acoplam-se com proteínas G dos tipos Gq/11, Gs e Gi.

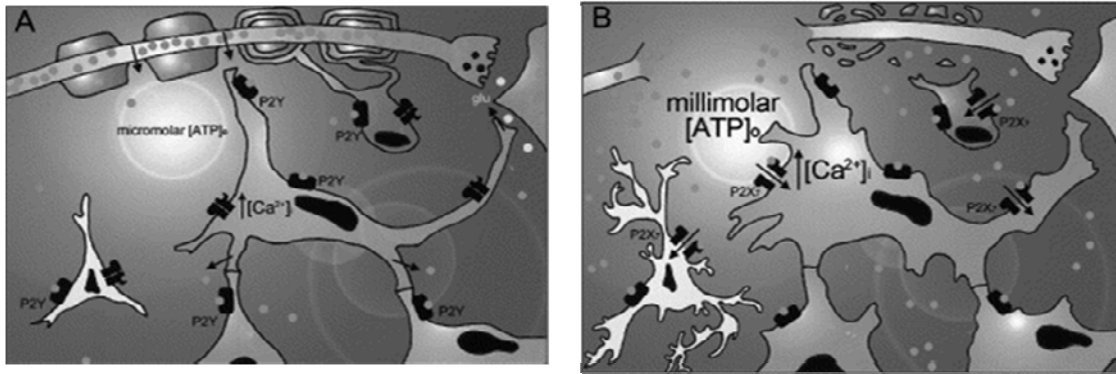
Baixas e altas concentrações de ATP evocam 2 respostas distintas de  $Ca^{2+}$  na glia do nervo óptico, o que seria uma evidência relacionada com o tipo de receptor P2Y ou P2X ativado. O aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  glial mediado por receptores P2Y, ativados por ATP na concentração de  $\mu M$ , é dependente da liberação de estoques intracelulares que diminuem durante a exposição ao ATP (Sugioka et al., 1996). Por outro lado, receptores P2X somente evocam influxos de  $Ca^{2+}$  em concentrações altas de ATP (mM), o que sugere que eles tenham um papel específico, mas não exclusivo, em patologias de células gliais (Figura H) (para revisão, James e Butt, 2002).

A tabela 2 sintetiza os receptores purinérgicos encontrados na retina de diferentes animais.



**Figura G: Receptores de membrana para adenosina e ATP extracelular. (a)** A família de receptores P1 para adenosina extracelular são receptores acoplados a proteína G que modulam a adenilato ciclase. **(b-c)** A família P2 de receptores ligam nucleotídeos e é composta por dois tipos de receptores: P2X e P2Y. **(b)** A família P2X é formada por receptores ionotrópicos. **(c)** Os receptores P2Y são receptores acoplados a proteína G. Retirado de Fields e Burnstock, 2006.





**Figura H: Modelo do duplo papel de receptores P2Y e P2X na fisiologia e patologia de células glias do SNC.** A) Astrócitos com baixas concentrações de ATP ( $\mu$ Molar) B) astrócitos incubados com altas concentrações de ATP (mMolar). Os receptores P2X somente evocam influxos grandes de  $Ca^{2+}$  em concentrações altas de ATP, sugerindo que eles tem um papel específico, mas não exclusivo, na patologia celular glial (James e Butt, 2002).

Receptor subtypes	Species
<b>Photoreceptors</b>	
A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>	Salamander <sup>b,c</sup>
A <sub>2</sub>	Rabbit <sup>d</sup> and mouse <sup>d</sup>
A <sub>2</sub>	Teleosts <sup>e</sup>
A <sub>2A</sub>	Salamander <sup>f</sup>
P2X <sub>2</sub>	Rat <sup>f,g</sup>
P2X <sub>7</sub>	Rat and marmoset <sup>g,h,j</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	Rat <sup>f,g,j</sup> , rabbit <sup>f</sup> and macaque <sup>f</sup>
<b>Bipolar cells</b>	
A <sub>1</sub>	Rat <sup>c</sup>
P2X <sub>3</sub> , P2X <sub>4</sub> , P2X <sub>5</sub>	Rat <sup>j</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	Rat <sup>g,h,j</sup>
<b>Retinal ganglion cells</b>	
A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>3</sub>	Rat <sup>f</sup> and mouse <sup>k</sup>
A <sub>1</sub>	Rat <sup>b,c</sup>
<b>Other cell types</b>	
A <sub>1</sub>	Salamander <sup>2</sup>
A <sub>3</sub>	Rat <sup>b</sup>
P2X <sub>2</sub> , P2X <sub>3</sub> , P2X <sub>4</sub> , P2X <sub>5</sub> , P2X <sub>7</sub>	Rat <sup>f,g,j</sup>
P2X <sub>7</sub>	Rat <sup>b,g</sup>
P2X <sub>7</sub>	Mouse <sup>g,j</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	Rat <sup>f,g,j</sup>
<b>Amacrine cells</b>	
A <sub>1</sub>	Chick <sup>b,e</sup> and rabbit <sup>e</sup>
P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>2</sub> , P2X <sub>3</sub> , P2X <sub>5</sub> , P2X <sub>7</sub>	Rat <sup>g,h</sup> and mouse <sup>6</sup>
P2X <sub>2</sub>	Mouse <sup>g</sup>
P2X <sub>7</sub>	Rat <sup>g,h,j</sup>
<b>Horizontal cells</b>	
P2X <sub>7</sub>	Monkey <sup>g</sup> rat <sup>g,h</sup>
<b>Interplexiform cells</b>	
P2X <sub>3</sub>	Rat <sup>g,h</sup>

Receptor subtypes	Species
<b>Retinal astrocytes and Müller cells</b>	
A <sub>1</sub>	Rat <sup>e</sup>
A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub>	Rat <sup>b,c</sup>
A <sub>2</sub>	Rat <sup>b</sup>
P2X <sub>7</sub>	Human <sup>b,c</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>13</sub>	Salamander <sup>b</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	Rat <sup>b,j</sup>
P2Y <sub>1</sub>	Rat <sup>e</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	Human <sup>b,c,g,j</sup>
<b>Retinal microglia</b>	
P2X <sub>7</sub>	Rat <sup>e</sup>
P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub>	Rat <sup>e</sup>
P2Y <sub>1</sub>	Rabbit <sup>e</sup>
<b>Pericytes of retinal microvasculature</b>	
A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub>	Rat <sup>c</sup>
P2X <sub>7</sub> , P2Y <sub>4</sub>	Rat <sup>b,c</sup>
P2X <sub>7</sub> , P2Y <sub>4</sub>	Rat <sup>b,c</sup>
<b>Retinal pigment epithelium</b>	
A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>	Human <sup>b,e</sup>
A <sub>2</sub>	Pig <sup>e</sup>
A <sub>2B</sub>	Rat <sup>e</sup>
P2X, P2Y	Rat <sup>b,c</sup>
P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>12</sub>	Human <sup>b,j,l</sup>
P2Y <sub>2</sub>	Cow <sup>b,c</sup> , human <sup>b,c</sup> and rabbit <sup>e,f</sup>
<b>Developing retina</b>	
A <sub>2</sub>	Ferret, mouse <sup>b,g</sup>
A <sub>2A</sub>	Chick <sup>e</sup>
P2Y <sub>1</sub>	<i>Xenopus</i> <sup>m</sup>
P2Y <sub>1</sub>	Chick <sup>e</sup>
P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub>	Chick <sup>b,e</sup>

**Tabela 2: Expressão de subtipos de receptores purinérgicos nos diferentes tipos celulares na retina.** Modificado de Housley et al., 2009.

## ***Sinalização purinérgica na retina mediada por receptores P2***

O ATP tem diversos papéis na fisiologia da retina adulta. Em camundongo, por exemplo, este nucleotídeo pode modular o processamento do sinal luminoso de uma maneira diferente nas vias ON e OFF. A distribuição de receptores P2X difere entre as duas vias, com um enriquecimento de P2X2 em amácrinas colinérgicas OFF (Kaneda et al., 2008). Nesta via, o ATP aumenta as correntes inibitórias do GABA em amácrinas OFF, mas não em amácrinas ON, além de inibir células ganglionares OFF e ativar células ganglionares ON (Kaneda et al., 2008).

Na retina, purinas são tonicamente liberadas no escuro (Housley et al., 2009) e sua liberação aumenta com a atividade neuronal (Perez et al., 1986). O ATP é liberado de neurônios da retina de maneira dependente de  $Ca^{2+}$  (Perez et al., 1986; Santos et al., 1999). Santos e colaboradores (1999) mostraram a liberação de ATP de células amácrinas em cultura que pode ocorrer em conjunto com a acetilcolina neste tecido (Neal e Cunningham, 1994). Já Newman (2005) demonstrou que neurônios liberam ATP em resposta a estimulação luminosa na retina. Também é especulado que o ATP possa ser co-liberado com GABA de células horizontais e amácrinas (Puthussery e Fletcher, 2004). O ATP também pode ser liberado por células do epitélio pigmentado, pela abertura espontânea de hemicanais de conexina (Pearson et al., 2005) ou por estimulação de receptores NMDA (Reigada et al., 2006).

A liberação de ATP a partir de células gliais, astrócitos da retina e glia de Müller pode ocorrer quando aumentos transientes de cálcio são induzidos na retina. A liberação de ATP de astrócitos foi visualizada utilizando o ensaio de luciferina-luciferase em paralelo com o aumento intracelular de cálcio. (Newman, 2001; Newman, 2003). Células gliais respondem a diversos estímulos (mecânicos, elétricos e químicos) com um aumento transitório da concentração de cálcio intracelular,  $[Ca^{2+}]_i$  (Verkhatsky et al., 1998). A aplicação de diversos neurotransmissores resulta em um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em células de Müller, sendo o ATP o neuromodulador mais efetivo em causar aumentos transitórios e oscilações de cálcio neste tipo celular (Newman e Zahs, 1997; Newman, 2003).

Este nucleotídeo é responsável pela formação de ondas de cálcio que se propagam neste tecido. O aumento transitório de  $[Ca^{2+}]_i$  se propaga através do citoplasma e é capaz de se propagar entre células gliais, mesmo que estas células não estejam em contato direto (Newman, 2001). Esta propagação é chamada de “ondas de  $Ca^{2+}$ ” e sua transmissão entre duas células de Müller pode ser inibida por antagonistas purinérgicos ou pela degradação do ATP no meio extracelular (Newman, 2001). Newman ainda mostrou, utilizando uma mistura de luciferina e luciferase, que a liberação de ATP ocorre antes da propagação da onda de  $Ca^{2+}$  para a célula adjacente, o que indica fortemente que essa propagação ocorre pela liberação de ATP e ativação da célula adjacente por este nucleotídeo.

Por sua vez, o aumento transitório de  $Ca^{2+}$  na glia induzido por ATP modula diversos fenômenos na glia e na retina, como a liberação de gliotransmissores, o acoplamento neurovascular e a captação de neurotransmissores. Já foi estabelecido, por exemplo, que células gliais ativadas interferem na atividade das células ganglionares (Newman e Zahs, 1998). Esse efeito pode ser tanto de aumento quanto de diminuição da atividade evocada pela luz nestas células, dependendo do tipo de receptor purinérgico ativado (Newman, 2004). A liberação de ATP da glia pode ativar receptores P2X em células ganglionares, despolarizando-as (Taschenberger et al., 1999). Por outro lado, se o ATP for convertido para adenosina por ectoenzimas, este nucleosídeo pode ativar receptores A1 e hiperpolarizar estas células (Braas et al., 1987)

A retina também utiliza o ATP para controlar o volume de células gliais e impedir alterações da célula em resposta a condições hipo-osmóticas (Uckermann et al., 2004). Esse mecanismo envolve a liberação tanto de ATP quanto de adenosina e a ativação autócrina dos receptores P2Y1 e A1 (Uckermann et al., 2006; Wurm et al., 2008). Este mecanismo pode ser ativado por glutamato liberado por células neuronais ou gliais (Uckermann, 2004; Wurm et al., 2008).

### ***Sinalização por receptores P2 na retina em desenvolvimento***

Dentre os diversos fatores que influenciam a proliferação celular durante o desenvolvimento da retina, os nucleotídeos têm sido fortes candidatos a desempenhar o papel de indutores de proliferação de precursores, uma vez que a resposta da retina à estimulação purinérgica mostrou ser predominante no período proliferativo deste tecido (Pearson et al., 2002; Sakaki et al., 1996; Sugioka et al., 1996). Na retina embrionária de galinha, por exemplo, entre os dias embrionários 3 e 6, a ativação de receptores P2Y2/4 por ATP exógeno ou UTP induz a proliferação celular de progenitores retinianos. Muito provavelmente, estes precursores darão origem a fotorreceptores, células amácrinas, ganglionares ou horizontais (Pearson et al., 2005; Pearson et al., 2002; Sugioka et al., 1999). Dois ou três dias depois, entre E6 e E8, a ativação de receptores P2Y1 por ATP exógeno ou ADP induz proliferação de progenitores de desenvolvimento tardio tais como progenitores de células gliais e/ou bipolares (Sanchez et al., 2002; França et al., 2007). Esta resposta é mediada pela ativação da PLC, PKC e MAPK (Nunes et al., 2007; Sanchez et al., 2002).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o ATP também está envolvido no fenômeno de morte celular na retina (Anccasi, 2008). A adição de altas concentrações de ATP em culturas de células de retina embrionária causa morte celular por apoptose. Esta morte é observada nos estágios de E9 e E10. Diferente do efeito do ATP sobre a proliferação que é mediada pelo receptor P2Y1, a morte celular induzida por ATP parece ser mediada principalmente por ativação de receptores P2X7.

O efeito de nucleotídeos sobre a sinalização de fatores tróficos ou outros sistemas de neurotransmissores tem sido demonstrado em diversos tipos celulares, inclusive na retina. Estudos recentes mostram que receptores para nucleotídeos podem potencializar os efeitos tróficos de alguns fatores de crescimento (Neary e Abbracchio, 2000).

### ***Liberação de transmissores por exocitose em células gliais***

Gliotransmissores são compostos liberados de células gliais seguindo um grupo de critérios (para revisão, Parpura e Zorec, 2009): São sintetizados e/ou armazenados na glia; sua liberação é desencadeada por estímulos fisiológicos

e/ou patológicos; Ativam rapidamente respostas nas células vizinhas; tem um papel em processos (pato) fisiológicos.

Células gliais podem liberar seus transmissores no meio extracelular por exocitose dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e do complexo SNARE (Chen et al., 2006). Em 1994, Parpura e colaboradores descreveram pela primeira vez, a exocitose de glutamato em astrócitos em cultura. Esta liberação era dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e estimulada por bradicinina. Além do glutamato, outros moduladores já foram descritos como sendo liberados de astrócitos por mecanismos exocíticos, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (Bezzi et al., 2001), o peptídeo natriurético atrial (Krzan et al., 2003), a D-serina (Mothet et al., 2005) e o ATP (Bal-Price et al., 2002; Coco et al., 2003).

Estímulos que aumentam a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  são necessários e suficientes para a liberação de glutamato em astrócitos. Por exemplo, o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  ionomicina, apenas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, foi capaz de induzir a liberação do transmissor (Parpura et al., 1994). Da mesma maneira, estímulos que diretamente aumentam a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , como estimulação mecânica e fotoestimulação induzem a liberação de glutamato (Parpura et al., 1994). Por outro lado, o tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, usando o quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA-AM reduz a liberação do gliotransmissor ATP de astrócitos (Bal-Price et al., 2002).

A fonte do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico necessário para a liberação de glutamato de astrócitos é derivada principalmente de estoque internos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Consistente com este fato, a pré-incubação de astrócitos com tapsigargina, um inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase específica para estoques internos, causa uma redução na liberação de glutamato de astrócitos (Innocenti et al., 2000). Além disso, astrócitos expressam vários canais ou receptores permeáveis a este íon e receptores ionotrópicos para o glutamato, que permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana plasmática. Ainda mais, a mitocôndria tem a capacidade de modular a magnitude da liberação de glutamato dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (para revisão, Reyes e Parpura, 2009).

A liberação de transmissores dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  necessita da presença de uma maquinaria secretória exocítica. Astrócitos expressam as proteínas do complexo SNARE: sinaptobrevina 2, Ssb2 (também referida como VAMP2); sintaxina 1; proteína associada a sinaptossoma de 23 kDa, SNAP-23; assim

como diversas proteínas auxiliaadoras a este complexo, incluindo sinaptagmina 4 (Montana et al., 2006).

O uso de toxinas que clivam proteínas SNARE necessárias para a exocitose, causa uma redução na liberação de glutamato dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos (Montana et al., 2006). Por exemplo, toxina tetânica e toxina botulínica A, que clivam seletivamente VAMP e SNAP-25, inibem a liberação de gliotransmissores (Araque et al., 2000; Pasto et al., 2001).

Secretogranina II, uma proteína envolvida no empacotamento e separação de neuropeptídeos em vesículas secretórias, também é encontrada em células gliais, como astrócitos, em vesículas envolvidas na liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP). O gliotransmissor ATP também foi encontrado em vesículas contendo ANP (Pangršič et al., 2007), consistente com os dados que mostram que ATP é estocado em vesículas contendo secretogranina II (Coco et al., 2003).

A exocitose de transmissores requer um mecanismo pelo qual um transmissor possa ser concentrado dentro das vesículas sinápticas. Existem duas proteínas essenciais necessárias para este processo: a V-ATPase e o transportador de transmissores vesicular (Parpura e Zorec, 2009). A V-ATPase bombeia prótons para o lúmen vesicular, levando a sua acidificação. O gradiente de prótons criado entre o lúmen vesicular e o citoplasma permite que os transportadores de transmissores vesiculares, como o VGLUT, transportem transmissores (glutamato, no caso do VGLUT) para dentro das vesículas enquanto transportam prótons para o citoplasma. Wilhelm e colaboradores, em 2004, encontraram expressão de V-ATPase na periferia celular e processos de astrócitos, indicando a presença de organelas acídicas, que incluem endossomos, lisossomos e vesículas secretórias (Finbow e Harrison, 1997). O bloqueio da V-ATPase com bafilomicina A1 reduz a liberação de gliotransmissores (Bezzi et al., 2001; Araque et al., 2000; Coco et al., 2003).

### ***Liberação de ATP por exocitose em células gliais***

Evidências morfológicas e bioquímicas sugerem que o ATP pode ser liberado a partir de células gliais por exocitose dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . As primeiras evidências vieram de experimentos nos quais astrócitos expostos a NO responderam com um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático e liberação de ATP

(Bal-Price et al., 2002). Tamponamento do cálcio intracelular com BAPTA ou a inibição de liberação vesicular com toxina botulínica C, diminuíram a liberação de ATP. Posteriormente, Coco e colaboradores, em 2003, demonstraram que astrócitos estimulados mecanicamente liberam ATP, que pode ser inibido pelo uso de bafilomicina A1 ou toxina tetânica (Coco et al., 2003). A redução na liberação de ATP induzida por toxina tetânica é menos pronunciada que na liberação de glutamato, sugerindo que ATP e glutamato possam ser liberados a partir de vesículas diferentes ou ter sua liberação regulada de maneiras diferentes.

A liberação de ATP de astrócitos em cultura pode ser induzida por UTP, via a ativação de receptores P2Y2 (Abdipranoto et al., 2003). Um bloqueador de saída de vesículas do aparelho de Golgi, brefeldina A, assim como um inibidor de exocitose, a toxina botulínica A, bloqueiam a liberação de ATP, mostrando que uma via exocítica está envolvida no processo de liberação de ATP induzida por UTP.

A proteína responsável pelo acúmulo de ATP em vesículas secretórias foi recentemente identificada como a proteína SLC17A9. Este transportador de nucleotídeo vesicular (VNUT) foi mostrado em astrócitos por marcação imunocitoquímica (Sawada et al., 2008).

Para estudar a natureza quântica da liberação de ATP em astrócitos, Pangršič e colaboradores (2007) incubaram astrócitos com quinacrina, um composto fluorescente que marca estruturas contendo ATP. A quinacrina revelou uma marcação puntiforme nestas células. Uma diminuição nesta marcação foi evidente pela estimulação de receptores, utilizando glutamato, ATP ou estímulos que aumentam diretamente a  $[Ca^{2+}]_i$  como ionomicina ou “photon-uncaging” de  $Ca^{2+}$  (Pryazhnikov e Khiroug, 2008). Pangršič e colaboradores, em 2007, usando um dominante-negativo para SNARE em astrócitos, mostraram uma redução dependente de  $Ca^{2+}$  na marcação de quinacrina, indicando a exocitose de vesículas contendo ATP. Além disto, a estimulação por glutamato destas células induz a liberação quântica de ATP, fato que foi demonstrado utilizando, para medir o ATP liberado, células “repórter” que respondem ao nucleotídeo.

Zhang e colaboradores, em 2007, encontraram em astrócitos, lisossomas contendo ATP passíveis de serem liberados de maneira estímulo- e  $Ca^{2+}$  -

dependentes. Esses lisossomos, carregados com o análogo fluorescente do ATP, o MANT-ATP, também foram liberados sob estimulação. Já a lise seletiva de lisossomos aboliu a liberação de ATP.

Chen e colaboradores em 2006, propuseram que a exocitose de gliotransmissores ocorria exclusivamente pelo mecanismo de “kiss-and-run”, onde vesículas se aproximam e se fundem apenas parcialmente na membrana plasmática da célula. Zhang e colaboradores (2007) propuseram que a liberação de ATP de lisossomas em astrócitos também ocorria de maneira exocítica pelo mecanismo de “kiss-and-run”.

Outras células gliais, como as células de Schwann também liberam ATP por exocitose. A liberação de ATP induzida por UTP nestas células foi diminuída por brefeldina A e toxina botulínica A, proteínas inibidoras de exocitose (Liu et al., 2005).

### ***Sinalização por glutamato na retina***

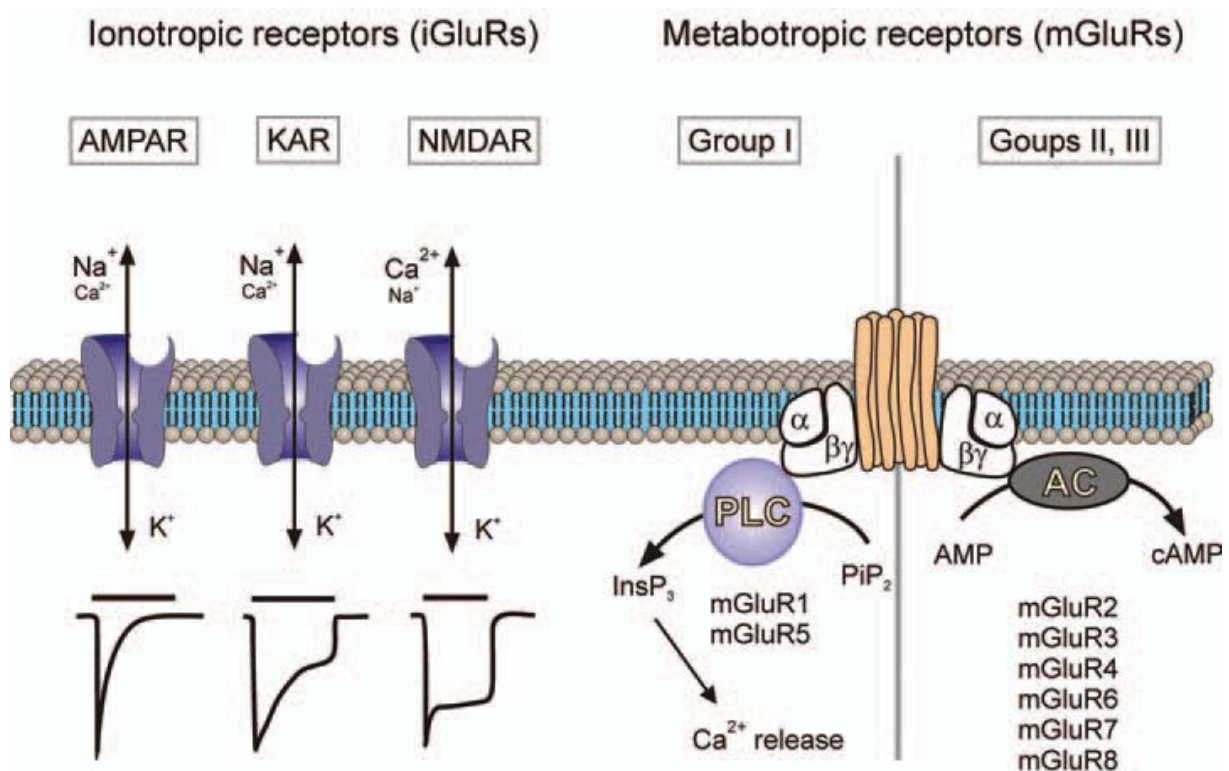
Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório na retina, usado na transmissão dos sinais visuais por fotorreceptores, células bipolares e ganglionares. O glutamato é continuamente liberado de fotorreceptores no escuro, sendo essa liberação modulada pela luz.

Na camada plexiforme interna, células bipolares ON também liberam glutamato na presença de luz, assim como células bipolares OFF liberam glutamato no escuro. Fotorreceptores e células bipolares não geram potencial de ação, mas respondem à luz com potenciais graduados que modulam a liberação contínua de glutamato (para revisão, Thoreson e Witkovsky, 1999).

O glutamato exerce sua função através da ativação de receptores específicos. Duas classes fundamentalmente diferentes de receptores glutamatérgicos são representadas pelos receptores ionotrópicos (canais catiônicos) e metabotrópicos (acoplados à proteína G). Os receptores ionotrópicos são subdivididos em três subtipos em receptores: AMPA, kainato (KA) e NMDA, que respondem com maior seletividade aos ligantes que os nomeiam (Mayer, 2005). Cada subtipo de receptor ionotrópico é formado por 4 subunidades específicas e a composição destas subunidades determina as propriedades funcionais do receptor. Os receptores AMPA e KA são



predominantemente permeáveis para  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , contudo algumas montagens tetraméricas são também altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Essas formas permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  são prevalentes durante o desenvolvimento e diminuem com a maturidade, sugerindo que essa isoforma pode ter um papel específico no desenvolvimento (Pellegrini-Giampietro et al., 1992). Receptores NMDA são dependentes de voltagem e altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Receptores metabotrópicos para o glutamato (mGluRs) controlam segundos mensageiros intracelulares sinalizando pelas vias do  $\text{InsP}_3/\text{DAG}$  (mGluR do grupo I) e do AMPc (mGluRs dos grupos II e III) (para revisão, Verkhratsky e Kirchhoff, 2007) (Figura I).



**Figura I: Representação dos subtipos de receptores para o glutamato.** Os receptores para glutamato pertencem a classe de receptores ionotrópicos (AMPAR, KAR e NMDAR), e metabotrópicos (mGluR1-8). Os receptores ionotrópicos permeiam a passagem de cátions,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , em diferentes níveis. Os receptores metabotrópicos estão relacionados a ativação de fosfolipase C (mGluR1 e 5) ou a inibição da adenilato ciclase (mGluR2-4 e 6-8). Retirado de Verkhratsky e Kirchhoff, 2007.

Os receptores NMDA em células gliais e em neurônios são funcionalmente e estruturalmente diferentes entre si. Os receptores da glia são fracamente sensíveis ao bloqueio com magnésio extracelular, o que pode indicar uma expressão de subunidades diferentes do receptor (Verkhratsky e Kirchhoff, 2007). Na retina de pinto pós-eclosão, todas as subunidades de receptores AMPA/KA e a subunidade NR1 do receptor NMDA são expressos na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares, predominantemente em células amácrinas e ganglionares (Santos Bredariol and Hamassaki-Britto, 2001). A expressão da maioria dos subtipos de receptores glutamatérgicos é baixa antes da sinaptogênese, aumentando conforme o tecido amadurece (Cristóvão et al., 2002a,b). No entanto, análises por Western blot mostraram que subunidades de receptores glutamatérgicos estão presentes em estágios precoces do desenvolvimento (E5), embora a sua expressão esteja restrita a neurônios imaturos (Santos Bredariol and Hamassaki-Britto, 2001).

A ativação de receptores glutamatérgicos não possui efeito aparente no tempo em que os progenitores retinianos gastam para completar a mitose na retina de pinto (para revisão, Martins e Pearson, 2008). Porém, Martin e colaboradores mostraram, em 2006, que o glutamato modula a proliferação de progenitores em retinas de camundongo.

Células de Müller de retina de pinto expressam todos os tipos de receptores glutamatérgicos, NMDA (Lopez et al, 1997; Lamas et al., 2005), AMPA/KA (López et al., 1994) e mGluR que induzem a mobilização de  $Ca^{2+}$  interno (Keirstead e Miller, 1997). Entretanto, na retina de mamíferos, o glutamato é ineficaz em evocar aumentos de  $Ca^{2+}$  em células de Müller (Bringmann et al., 2002; Newman, 2005; Newman and Zahs, 1997). Entretanto, estudos com células de Müller de coelho em cultura indicam a entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular induzida por estimulação dos receptores AMPA/KA, mas não por receptores NMDA (Wakakura e Yamamoto, 1994). Portanto, a insensibilidade de células de Müller de retinas de mamíferos ao glutamato pode ser uma particularidade da retina intacta, uma vez que nesta condição o glutamato é liberado continuamente.

Como já discutido anteriormente, a glia de Müller possui um papel essencial na regulação do glutamato no meio extracelular e reciclagem destes neurotransmissores liberados por neurônios (Bringmann et al., 2009). A glia de

Müller modula ainda a transmissão glutamatérgica pela liberação de D-serina, que age como co-agonista em receptores NMDA. A liberação de D-serina por células de Müller pode ser estimulada por ativação de receptores glutamatérgicos (Oliet e Mothet, 2006).

## 2 Objetivos

A partir das evidências relatadas acima que indicam que ATP pode ser liberado de maneira exocítica de células gliais sob estímulo de receptores glutamatérgicos ou despolarização, resolvemos investigar os seguintes aspectos em culturas enriquecidas em glia de retina embrionária de pinto:

- Investigar a presença de vesículas acídicas contendo ATP através da marcação por quinacrina
- Investigar se as vesículas marcadas com quinacrina podem liberar seu conteúdo mediante estímulos
- Quantificar a liberação de ATP mediante estímulo

## 3 Metodologia

### 3.1 Materiais

Glutamina, penicilina, sulfato de estreptomicina glutamato, kainato, DNQX, BAPTA-AM, EGTA, quinacrina foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA); MEM da Life Technologies Inc.; Tripsina da Worthington Biochemical (Freehold, NJ, USA); ATP determination kit da Invitrogen (San Diego, CA, USA).

### 3.2 Obtenção de culturas de retina de embrião de pinto

Culturas de células da retina de embriões de galinha White-Leghorn foram utilizadas no preparo de culturas em monocamada enriquecidas em glia. Retinas de embriões E8 foram dissecadas de outras estruturas oculares e imediatamente transferidas para 1 ml de solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF). As retinas foram então tratadas com tripsina 0,1% por 20 min, à 37°C. A solução de tripsina foi retirada e as células mecanicamente dissociadas em 5 mL de meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e glutamina 2 mM. A densidade de células foi estimada em câmara de Neubauer. Para experimentos de marcação de vesículas com quinacrina, as células foram semeadas em placa de Petri plásticas de 40 mm, na densidade de  $2,5 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>. Para experimentos de recolhimento de meio para determinação da concentração de ATP, as células foram semeadas em placas multi-well, na mesma densidade de células. As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada de 5% CO<sub>2</sub> – 95% ar a 37°C com trocas de meio três vezes por semana. Para experimentos avaliando a cinética temporal do aparecimento de vesículas, as culturas foram cultivadas por 2, 6 e 13 dias, e então submetidas ao protocolo de marcação para quinacrina. Para todos os outros experimentos, as culturas foram utilizadas a partir de 14 dias de cultivo, quando havia apenas uma pequena porcentagem de neurônios, a partir do qual, as culturas foram consideradas enriquecidas em glia.

### 3.3 Marcação de vesículas por quinacrina

Para verificar a presença de vesículas contendo ATP em células da retina embrionária de pinto, as culturas foram incubadas com quinacrina na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , por 5 min a 37°C.

Quinacrina é um composto utilizado no tratamento da malária derivado da acridina-quinolona. Essa substância produz uma fluorescência verde quando exposta a luz ultra-violeta. Assim como outros marcadores citoquímicos, a quinacrina pode agir reversivelmente com uma variedade de poliânions incluindo RNA, DNA, nucleotídeos adenina e se acumular em compartimentos acídicos intracelulares. No entanto devido à sua alta afinidade pelo ATP (Irvin e Irvin, 1954), quinacrina tem sido usada para localizar possíveis estoques intracelulares desta purina (Mitchell et al., 1998; Bodin e Burnstock, 2001a; Coco et al., 2003; Pangršič et al., 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2007).

As culturas foram então lavadas 6 vezes com 1 mL de solução de Hank's pré-aquecida a 37°C e observadas ao microscópio de fluorescência, utilizando um filtro para fluoresceína. Para os experimentos do efeito do inibidor da v-ATPase sobre a marcação das vesículas, as culturas foram incubadas com bafilomicina A1 (1  $\mu\text{M}$ ) por 1h antes da adição de quinacrina.

### 3.4 Liberação de vesículas marcadas com quinacrina

Para inferir a liberação de ATP a partir de vesículas marcadas com quinacrina, culturas enriquecidas em glia foram submetidas ao protocolo de marcação de vesículas por quinacrina e levadas ao microscópio de fluorescência.

Para reduzir o efeito de "fading" da marcação, foi utilizado um filtro de barreira que diminui a intensidade de excitação das amostras fluorescentes em 1/3.

As culturas foram fotografadas, e então foi adicionado Hanks' a 37 °C, com as diferentes drogas usadas no tratamento das culturas: KCl (50 mM), glutamato (1 mM), kainato (100  $\mu\text{M}$ ), NMDA (100 $\mu\text{M}$ ), glicina (2 mM) MK-801 (50  $\mu\text{M}$ ), DNQX (50  $\mu\text{M}$ ), ionomicina (5  $\mu\text{M}$ ) e EGTA (1 mM). Para o tratamento com BAPTA-AM (30  $\mu\text{M}$ ), as culturas foram pré-incubadas com o composto por 15 min antes da incubação com quinacrina. O ensaio de liberação também foi

realizado na presença do BAPTA-AM. Para o tratamento com bafilomicina A1 (1  $\mu$ M), as culturas foram pré-incubadas com o composto por 1h antes da incubação com quinacrina.

Para verificar a liberação das vesículas pelos tratamentos, a fluorescência foi analisada e registrada em um mesmo campo na cultura nos tempos de 0, 3, 5 e 10 minutos de tratamento. A liberação foi avaliada pela análise comparativa entre as fotomicrografias de tempos diferentes. Como controle de fading e de liberação, culturas não-tratadas foram fotografadas durante os mesmos intervalos de tempo apenas na presença de solução salina de Hanks'.

### 3.5 Ensaio de Detecção do ATP por Bioluminescência

Culturas de retina de pinto enriquecidas em glia foram lavadas 2 vezes por 5 min, com 500 $\mu$ l de solução salina de Hank's a 37°C. As culturas foram então incubadas com 200 $\mu$ l da solução de Hanks' com a presença ou ausência dos antagonistas glutamatérgicos, MK-801 (50  $\mu$ M) e DNQX (50  $\mu$ M) ou o quelante de cálcio, BAPTA-AM (30  $\mu$ M). O sobrenadante foi recolhido após 5 min e imediatamente refrigerado. As células foram então incubadas com KCl (50mM), glutamato (1 mM) ou kainato (100  $\mu$ M) por 5 min, na presença ou ausência de MK-801, DNQX ou BAPTA-AM, e o sobrenadante recolhido e refrigerado. BAPTA-AM (30  $\mu$ M) e bafilomicina A1 (1  $\mu$ M) foram pré-incubadas respectivamente, 15 min e 1 h antes da primeira lavagem.

Neste método, o ATP liberado para o meio extracelular é incubado com uma mistura de luciferina/luciferase do vagalume. O ATP é essencial na transformação da luciferina em luciferil adenilato, que é o substrato para a enzima luciferase. A degradação do luciferil adenilato em oxiluciferina é uma reação que emite luz visível. Essa luz pode ser quantificada em um luminômetro e é produzida em relação direta a concentração do ATP, como reagente limitante da reação. Utilizando concentrações conhecidas de ATP para construir uma curva padrão, podemos estimar a quantidade de ATP no sobrenadante de culturas estimuladas ou não.

O conteúdo de ATP liberado foi estimado utilizando o "ATP determination kit" da Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente: 10  $\mu$ l dos padrões de ATP (25 nM – 400 nM) e amostras foram adicionadas em

pendorfis com o reagentes contendo luciferina-luciferase e a luz emitida durante a reação avaliada em um luminômetro (Modulus, Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA). As amostras foram medidas por um tempo de integração de 10 s. Uma curva de calibração foi construída usando os padrões de ATP e usada para calcular os níveis de ATP nas amostras.

### 3.6 Análises Estatísticas

Comparações estatísticas foram feitas pelo teste ANOVA utilizando o pós-teste de Bonferroni (Prism 5, GraphPad, San Diego, CA, USA), quando 3 ou mais conjuntos de dados eram avaliados. Para comparação estatística entre dois conjuntos de dados foi utilizado o t-teste não pareado. Dados são apresentados como médias  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$  foi tomado como significativo.



## 4 Resultados

Trabalhos anteriores demonstraram o acúmulo de ATP extracelular em culturas organotípicas de retinas de embrião de pinto (Sugioka et al., 1999) e que ondas de cálcio induzidas por estimulação mecânica são propagadas pela liberação de ATP proveniente de células gliais e astrócitos na retina de rato (Newman, 2001, 2003). Por outro lado, em diversos tipos celulares incluindo astrócitos (Coco et al., 2003) e células endoteliais (Bodin e Burnstock, 2001) a liberação de ATP ocorre por um processo de exocitose de vesículas contendo este nucleotídeo. Com o objetivo de verificar se células gliais de Muller da retina embrionária de pinto eram capazes de liberar ATP de forma exocítica, resolvemos investigar primeiramente a presença ou não de vesículas contendo este nucleotídeo nestas células em cultura. Para isso, culturas enriquecidas em células gliais de retina de embrião de pinto foram incubadas com quinacrina, um composto capaz de se ligar a nucleotídeos de adenina (Irvin e Irvin, 1954) e evidenciar vesículas intracelulares contendo ATP (Bodin e Burnstock, 2001; Coco et al., 2003). A incubação das células com quinacrina 5  $\mu$ M por 5 min, seguida por lavagem com solução salina de Hanks' e observação ao microscópio de fluorescência revelou uma marcação puntiforme abundante distribuída pelo citoplasma destas células (Figuras 1A e 1B). Já a incubação das culturas com quinacrina por tempos maiores (1 hora) revelou um padrão de marcação das vesículas um pouco diferente, onde os pontos fluorescentes eram bem maiores e mais abundantes (Figuras 1C). Estes resultados em conjunto sugerem a presença de vesículas contendo ATP em células gliais em cultura. Tendo em vista que a marcação com quinacrina em culturas incubadas por 5 min foi semelhante à marcação de vesículas contendo ATP em outros tipos celulares não neuronais (Bodin e Burnstock, 2001a; Orriss et al., 2009), passamos a utilizar o tempo de 5 min para a marcação de vesículas nos experimentos seguintes.



Estudos em células cromafim indicam que a captação de ATP em grânulos secretórios requer um gradiente eletroquímico de  $H^+$  mantido por uma ATPase vacuolar (v-ATPase) (Gualix et al., 1996). A Bafilomicina A1 tem sido utilizada como inibidor de liberação exocítica de ATP, pois inibe seletivamente a V-ATPase, o que leva a alcalinização do lúmen da vesícula e o colapso do gradiente de próton necessário para o acúmulo de ATP nestas organelas (Bowman et al., 1988). Com o objetivo de identificar o tipo de estrutura intracelular que pode acumular ATP em nossas culturas de células gliais, resolvemos investigar o efeito de bafilomicina A1 sobre a marcação de quinacrina. Culturas enriquecidas em glia foram pré-tratadas com bafilomicina A1 1  $\mu$ M por 1h e então coradas com quinacrina. Enquanto uma marcação puntiforme típica foi observada nas culturas controle (Figura 2A e 2B), nenhuma marcação com quinacrina foi observada nas culturas tratadas com bafilomicina A1 (Figura 2C e 2D), sugerindo que este marcador fluorescente esteja corando vesículas que acumulam ATP de maneira dependente da atividade da ATPase vacuolar.

Com o objetivo de caracterizar o desenvolvimento das células gliais que expressam vesículas contendo ATP, resolvemos avaliar a marcação de quinacrina em culturas de células de retina mantidas por períodos crescentes de tempo. Tanto a quantidade quanto a intensidade de marcação das vesículas fluorescentes aumentaram com a maturação das culturas (Figura 3). Em culturas jovens, como E8C2, a intensidade da marcação em células gliais foi bastante baixa (Figura 3A-B; seta). Já em culturas de E8C6, uma maior intensidade de marcação fluorescente foi observada em algumas células gliais (Figura 3C-D). Após duas semanas, todas as células gliais na cultura apresentaram marcação fluorescente puntiforme (Figura 3E-F).





Em astrócitos, a marcação de vesículas contendo ATP com quinacrina permitiu estimar a ocorrência de liberação de ATP por excitose (Coco *et al*, 2003; Pangršič *et al*, 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2007). Nestas células, a liberação de ATP por excitose, estimada pelo desaparecimento de vesículas coradas por quinacrina, foi confirmada através da dosagem direta do ATP liberado para o meio de cultura. Por outro lado, a atividade de neurônios da retina provoca um aumento na concentração de  $K^+$  extracelular que pode causar uma rápida despolarização das células de Müller (Wen and Oakley, 1990). Sabendo que a glia de Müller apresenta canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L (Puro *et al.*, 1996; Firth *et al.*, 2001) e que um aumento nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  ocorre em resposta a despolarização por aumento da concentração extracelular de  $K^+$  (Wakakura e Yamamoto, 1993; Keirstead e Miller, 1995), resolvemos avaliar o efeito da despolarização das células gliais em cultura na liberação de ATP. Culturas enriquecidas em glia foram previamente incubadas com quinacrina 5  $\mu$ M por 5 min, lavadas com Hanks' e observadas ao microscópio de fluorescência. Para excluir o efeito de extinção da fluorescência (fading), um filtro de barreira que diminui a intensidade da excitação das amostras foi utilizado. As culturas controle foram fotografadas nos tempos 0, 3, 5 e 10 minutos. Como pode ser observado na figura 4, nenhuma diminuição na quantidade ou intensidade de fluorescência das vesículas foi observada em culturas controle, incubadas por até 10 minutos apenas com solução salina. Já a incubação de culturas com 1 ml de solução salina de Hanks' contendo KCl na concentração de 50 mM induziu uma diminuição tanto na intensidade de fluorescência quanto na quantidade de vesículas marcadas com quinacrina após 10 minutos de estimulação (Figura 5A-D). Entretanto, nestas culturas estimuladas, as respostas das células foram variáveis. Enquanto em algumas células a quantidade de vesículas marcadas com quinacrina após 10 minutos foi muito reduzida, em outras células, nenhuma modificação na quantidade de vesículas foi observada (Figura 5E-F). Esta última observação sugere que apenas parte das células gliais em cultura é capaz de liberar vesículas coradas com quinacrina.







As vesículas marcadas com quinacrina liberadas por células gliais durante o estímulo despolarizante do KCl apresentaram uma dinâmica diferenciada de desaparecimento de marcação (Figura 6A-B). Enquanto algumas vesículas desapareceram após a incubação das células, o que sugere uma completa liberação do seu conteúdo, outras apresentaram apenas uma diminuição na intensidade da marcação. Outras vesículas, ainda, não apresentaram nenhuma modificação na intensidade de fluorescência ou até aumentaram sua intensidade. Essas observações em conjunto sugerem que a liberação de vesículas contendo quinacrina em células gliais de Muller ocorra por um mecanismo de exocitose denominado “kiss-and-run”, onde a exocitose não ocorre necessariamente pela fusão completa das vesículas, mas por sua mobilização e fusão parcial com a membrana plasmática (Chen et al., 2006).

Na maioria dos tipos celulares onde a liberação de ATP por exocitose foi investigada, ficou demonstrado que este processo é dependente de íons cálcio (Pangršič et al., 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2008). Com o intuito de verificar se a liberação de vesículas coradas com quinacrina em células gliais é dependente de cálcio, resolvemos investigar o efeito do quelante de cálcio interno BAPTA-AM. Culturas enriquecidas em células gliais foram coradas com quinacrina por 5 min e estimuladas com KCl 50 mM na presença ou ausência de BAPTA-AM 30  $\mu$ M, sendo este composto adicionado 15 minutos antes da incubação das células com quinacrina. Nenhuma diminuição na quantidade ou intensidade de marcação das vesículas foi observada nas culturas tratadas com KCl na presença do quelante (Figura 7C-D), em contraste com a liberação induzida por KCl na ausência de BAPTA-AM (Figura 7A-B), sugerindo que a liberação de vesículas coradas por quinacrina induzida por despolarização seja dependente de íons cálcio.





Com o objetivo de verificar se a diminuição na quantidade de vesículas coradas com quinacrina em células de Muller em cultura corresponde a um processo de exocitose de vesículas contendo ATP, resolvemos investigar a liberação deste nucleotídeo das células diretamente, através do método de dosagem de ATP por bioluminescência. Neste método, a concentração de ATP liberado para o meio extracelular é determinada pela reação de transformação da luciferina catalisada pela luciferase, uma reação que emite luz. Esta luz pode ser quantificada em um luminômetro, sendo diretamente proporcional às quantidades de ATP presentes na reação. Culturas enriquecidas em células de glia foram lavadas 2 x com solução de Hanks' e incubadas com 200 µl desta solução por 5 min a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi recolhido para a determinação dos níveis basais de ATP. As culturas foram então incubadas com Hanks' contendo KCl 50 mM por mais 5 minutos e a solução recolhida para a determinação dos níveis estimulados de ATP. Um aumento significativo de 1.8 x na concentração de ATP foi observado quando as culturas foram estimuladas com KCl (média em pmol/placa ± EPM: basal, 1.68 ± 0.29; KCl, 2.97 ± 0.45) (Figura 8).

Em astrócitos, a ionomicina, um potente ionóforo de  $Ca^{2+}$ , é capaz de induzir a liberação de ATP de maneira dependente da presença de íons cálcio no meio extracelular (Queiroz et al., 1999). Esta observação reforça a idéia de que o aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico não só é necessário, como também é suficiente para a liberação de vesículas contendo ATP (Pryazhnikov e Khiroug, 2008). Para verificar se um aumento citosólico de cálcio é suficiente para induzir a liberação de vesículas contendo ATP em células de Muller da retina, resolvemos investigar o efeito de ionomicina sobre a marcação de vesículas com quinacrina em culturas enriquecidas em glia. As culturas foram tratadas com Hanks' contendo ionomicina na concentração de 5 µM. Uma diminuição na marcação de quinacrina após 10 minutos de estímulo foi observada (Figura 9A-B). Além disto, a adição de EGTA 1 mM às culturas incubadas com ionomicina foi capaz de bloquear completamente a diminuição na quantidade de vesículas induzida pelo ionóforo. Estes dados sugerem que a liberação de vesículas com quinacrina possa ser induzida por entrada de cálcio proveniente do meio extracelular.





Dados anteriores revelaram que a ativação de receptores de glutamato é capaz de induzir a liberação de ATP em astrócitos (Queiroz et al., 1997; Queiroz et al., 1999; Pangršič et al., 2007). Por outro lado, em culturas primárias de células de Muller, os aumentos transientes na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  interno necessários para a liberação exocítica de ATP podem ser induzidos pela aplicação de glutamato, AMPA ou kainato, mas não de NMDA (Wakakura e Yamamoto, 1994). Para avaliar o efeito do glutamato sobre a liberação de vesículas marcadas com quinacrina em células de Müller, culturas enriquecidas em glia e coradas com quinacrina foram incubadas com glutamato 1 mM, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a liberação com KCl. As culturas foram fotografadas nos tempos de 0, 3, 5 e 10 minutos após a adição do glutamato. De maneira semelhante ao observado no tratamento com KCl, a incubação com glutamato induziu uma diminuição nos níveis de marcação com quinacrina após 10 minutos de incubação das células (Figura 10). Nenhuma diminuição foi observada nas culturas controle.

A quantidade de ATP liberado após estimulação com glutamato foi medida utilizando-se o método da luciferina-luciferase. Culturas enriquecidas em glia foram incubadas por 5 minutos em solução salina de Hanks' contendo glutamato 1 mM (Figura 11). Consistente com a redução no número de vesículas no ensaio de marcação com quinacrina, glutamato foi capaz de induzir um aumento de aproximadamente 2.3 x no acúmulo de ATP no meio extracelular (média em pmol/ placa  $\pm$  EPM: basal,  $1.51 \pm 0.20$ ; glutamato,  $3.45 \pm 0.51$ ).

Os dados relatados acima mostram que glutamato foi capaz de induzir tanto uma diminuição na quantidade de vesículas coradas com quinacrina (figura 10) quanto um aumento na concentração de ATP extracelular (figura 11) em nossas culturas. Sabendo que bafilomicina A1 é um potente inibidor de v-ATPases que bloqueia o acúmulo de ATP em vesículas secretórias, resolvemos investigar o efeito deste composto sobre a liberação de ATP induzida por glutamato, na tentativa de verificar a natureza dos estoques de ATP liberados por glutamato em células gliais de retina em cultura. Para isto, culturas enriquecidas em glia foram pré-incubadas por 1h com 1  $\mu\text{M}$  de

bafilomicina A1 e submetidas ao protocolo de liberação de ATP para o meio extracelular, utilizando glutamato na concentração de 1mM. Na figura 12A, podemos verificar que o tratamento com bafilomicina A1 diminuiu significativamente a liberação de ATP evocada por glutamato em nossas culturas. Enquanto culturas incubadas apenas com glutamato apresentaram níveis de ATP extracelular normalizados pelo controle de  $2.35 \pm 0.28$ , culturas tratadas com bafilomicina A1, na presença ou ausência de glutamato, apresentaram níveis de ATP normalizados pelo controle de apenas  $0.59 \pm 0.09$  e  $0.92 \pm 0.22$ , respectivamente. Esses dados em conjunto sugerem que a estimulação de células gliais em cultura com glutamato promove a liberação de ATP estocado em vesículas sensíveis a bafilomicina A1.

A exocitose é uma via de liberação de transmissores regulada pela elevação na concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$ . Em astrócitos, a liberação exocítica de ATP é inibida quanto o aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular é bloqueado (Pangršič et al., 2007). Para investigar a dependência de cálcio na liberação de ATP induzida por glutamato em células de Muller da retina, culturas enriquecidas em glia foram pré-incubadas com o quelante de  $Ca^{2+}$  BAPTA-AM (30  $\mu$ M) por 15 minutos antes da estimulação com glutamato 1mM. Na figura 12B, podemos verificar que a liberação de ATP induzida por glutamato foi completamente inibida pelo pré-tratamento das células com BAPTA AM. Enquanto culturas incubadas com glutamato apresentaram níveis de ATP normalizados pelo controle de  $2.43 \pm 0.28$ , culturas tratadas com BAPTA-AM, na ausência ou presença de glutamato, apresentaram níveis de ATP normalizados de  $0.55 \pm 0.9$  e  $0.71 \pm 0.19$ , respectivamente. Estes níveis observados nas culturas tratadas com BAPTA-AM não foram significativamente diferentes dos níveis de culturas controle. Esses dados sugerem que células gliais de Muller, quando estimuladas com glutamato, liberam ATP por exocitose dependente da elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular.









Diversas classes de receptores glutamatérgicos foram demonstradas em células gliais de Müller, como receptores NMDA (López et al., 1997; Lamas et al., 2005), receptores AMPA/KA (López et al., 1994) e receptores metabotrópicos (Keirstead e Miller, 1997). Além disto, em células gliais de Müller, apenas receptores ionotrópicos não-NMDA e metabotrópicos são capazes de induzir um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wakakura e Yamamoto, 1994; Keirstead e Miller, 1997). Com o objetivo de identificar os receptores de glutamato envolvidos na liberação de ATP em células gliais de retina de pinto, inicialmente, culturas enriquecidas em glia foram coradas com quinacrina e incubadas com glutamato 1 mM na ausência ou presença de MK-801 ou DNQX, antagonistas para receptores NMDA e AMPA/KA, respectivamente. Ambos os antagonistas foram adicionados na concentração final de 50  $\mu\text{M}$ . Como já mostrado anteriormente, a incubação de glutamato 1mM resulta em uma diminuição na marcação por quinacrina após 10 minutos (Figura 13A e 13B). Como mostrado nas figuras 13C e 13D, nenhum efeito inibitório de MK-801 foi observado e o tratamento das culturas com glutamato na presença deste antagonista induziu uma diminuição na quantidade de vesículas coradas por quinacrina após 10 minutos de incubação das células. Em contraste com o MK-801, a presença do antagonista DNQX bloqueou completamente a diminuição de vesículas induzida por glutamato após 10 minutos de incubação (Figuras 13E e 13F).

O efeito destes antagonistas glutamatérgicos sobre a liberação de ATP induzida por glutamato em nossas culturas está mostrado na figura 14. Como esperado, glutamato induziu um aumento de  $\sim 2.2 \times$  nos níveis de ATP extracelular (média em pmol / placa  $\pm$  EPM: controle,  $1.51 \pm 0.20$ ; glutamato,  $3.45 \pm 0.51$ ). Enquanto a incubação das células com DNQX sozinho não alterou significativamente os níveis de ATP extracelular em comparação com culturas controle ( $1.03 \pm 0.29$  pmol / placa), este antagonista foi capaz de diminuir significativamente o acúmulo de ATP extracelular induzido por glutamato ( $1.28 \pm 0.29$  pmol / placa). Além disto, em contraste com o efeito inibitório observado com DNQX, o tratamento de culturas com MK-801 não induziu uma diminuição significativa no acúmulo de ATP extracelular induzido por glutamato ( $2.03 \pm 0.45$  pmol / placa). Nenhuma diminuição nos níveis de

ATP extracelular, em comparação com culturas controle, foi observada nas culturas tratadas apenas com MK-801 ( $1.25 \pm 0.30$  pmol / placa). Esses resultados em conjunto sugerem que a liberação de ATP induzida por glutamato em células de Muller em cultura ocorra através da participação de receptores ionotrópicos, principalmente do tipo não-NMDA.

Para confirmar o envolvimento de receptores glutamatérgicos ionotrópicos na liberação de ATP de células de Müller, culturas enriquecidas em glia foram incubadas com quinacrina e submetidas ao ensaio de liberação vesicular na presença dos agonistas kainato ( $100 \mu\text{M}$ ) e NMDA ( $100 \mu\text{M}$ ). Na figura 15, podemos observar uma diminuição na marcação de vesículas de ATP após 10 min de tratamento com kainato. Por outro lado, o tratamento com NMDA na presença de glicina  $2 \text{ mM}$  não foi capaz de diminuir a quantidade de vesículas com quinacrina na maioria das culturas estudadas (Figura 15 C-D). Apenas em aproximadamente 20 % das culturas estudadas, o tratamento com este agonista induziu uma diminuição no conteúdo de vesículas em pelo menos uma das células analisadas (figura 15 E-F).

Os níveis de ATP extracelular em culturas estimuladas por 5 minutos com kainato  $100 \mu\text{M}$  estão mostrados na figura 16. Condizente com a diminuição no conteúdo de vesículas marcadas com quinacrina, o tratamento das culturas com este agonista induziu um aumento significativo na liberação deste nucleotídeo para o meio extracelular (níveis normalizados pelo controle  $\pm$  EPM =  $2.38 \pm 0.40$ ). Estes dados sugerem que a estimulação de receptores AMPA/kainato por glutamato é capaz de induzir a liberação de ATP em células gliais de Muller em cultura.











## 5 Discussão

O ATP é uma importante molécula sinalizadora na retina, estando envolvido em processos como proliferação celular (Sanchez et al., 2002), comunicação neurônio-glia (Newman, 2006) e morte celular (Zhang et al., 2005). Na retina, o ATP pode ser liberado de neurônios (Perez et al., 1986), como células amácrinas (Santos et al., 1999) e células ganglionares (Newman, 2005), do epitélio pigmentado (Pearson et al., 2005; Reigada et al., 2006) e de astrócitos e células de Müller (Newman, 2001). A liberação de ATP de células gliais pode ocorrer por diferentes vias, como por hemicanais de conexina (Stout et al., 2002), por canais de panexina formados por ativação do receptor purinérgico P2X7 (Anderson et al., 2004; ) e por proteínas transportadoras de ATP (Abraham et al., 1993). Outra via de liberação de ATP em células gliais é a exocitose (Coco et al., 2003), demonstrada em astrócitos (Pangršič et al., 2007) e células de Schwann (Liu et al., 2005). Neste trabalho, mostramos evidências para que a glia de Müller da retina de pinto seja uma fonte de ATP que pode ser liberado por exocitose mediante diversos estímulos.

Evidências anteriores demonstraram que o ATP pode ser estocado em vesículas em diversos tipos celulares. A utilização do composto quinacrina revelou a marcação destas vesículas em diversas células não neuronais incluindo células endoteliais (Bodin e Burnstock, 2001a), osteoblastos (Orris et al., 2009) e astrócitos (Coco et al., 2003; Pangršič et al., 2007). Utilizando a quinacrina, os dados apresentados neste trabalho revelaram uma marcação abundante na glia de Müller de culturas de células de retinas embrionárias de pinto. O padrão de marcação, observado apenas no citoplasma celular e com aspecto granular, foi bastante semelhante ao padrão relacionado com vesículas contendo ATP observado em astrócitos (Coco et al., 2003; Pangršič et al., 2007). Além disto, a quantidade destas vesículas aumentou com o tempo de cultivo das células, sugerindo que seu aparecimento seja regulado durante o processo de crescimento e diferenciação destas células em cultura. Por outro lado, nossos dados também revelaram que a marcação granular característica da quinacrina não foi observada em neurônios presentes em culturas mais

joventos. Tendo em vista que vesículas que acumulam quinacrina são organelas com altas concentrações de ATP (Bodin e Burnstock, 2001b), nossos dados sugerem a existência de vesículas citoplasmáticas contendo esta purina preferencialmente em células de Müller em cultura.

A incubação com quinacrina por um período maior de tempo gerou um padrão diferente de marcação das vesículas. A marcação fluorescente foi observada em grânulos maiores e mais abundantes no citoplasma celular. Embora o mecanismo de captação de quinacrina não esteja completamente elucidado, é possível que a quinacrina seja endocitada e transportada para endossomas primários e, posteriormente, para endossomas tardios, uma vez que este composto tem afinidade por ambientes acídicos (Yamada et al., 2005). Portanto, o aumento no tamanho dos grânulos marcados com quinacrina após um tempo maior de incubação das células pode indicar uma marcação em endossomas tardios fundidos ou em lisossomos. De acordo com esta idéia, Zhang e colaboradores (2007) mostraram anteriormente liberação de ATP a partir de estoques que co-localizam com marcadores lisossomais em astrócitos.

Mitchell e colaboradores, em 1998, sugeriram que o padrão citoplasmático de marcação granular com quinacrina seja uma fonte de ATP passível de liberação em células epiteliais ciliares. Esta marcação possui características semelhantes àquela que encontramos em células de Müller a partir de duas semanas de cultivo das células. Newman, em 2001, obteve evidências de que a glia de Müller da retina de camundongos libera ATP em resposta às ondas de cálcio induzidas por estimulação mecânica, sendo esta liberação responsável pela propagação das ondas de cálcio intercelulares. Nossos dados revelaram que tanto a despolarização com alta concentração de KCl, quanto a ativação de receptores de glutamato ou a incubação com ionóforos de  $Ca^{2+}$  foram capazes de induzir uma diminuição na intensidade da marcação com quinacrina após 10 minutos de estimulação. Estes dados sugerem que células de Müller de retina de pinto realizam exocitose de vesículas marcadas com quinacrina mediante estímulos que induzem um aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ .

A diminuição na intensidade de marcação com quinacrina nestas células após estímulos despolarizantes poderia ser devida a uma diminuição na fluorescência provocada pela excitação prolongada das células com luz, um fenômeno conhecido com “fading”. De fato, a excitação das células com luz durante sua observação no microscópio de fluorescência induziu uma diminuição espontânea na marcação das vesículas com quinacrina. Entretanto, a utilização de um filtro de barreira na iluminação das amostras bloqueou esta diminuição de marcação. Portanto, tendo em vista que nenhuma diminuição na quantidade de vesículas marcadas ou na intensidade de marcação foi observada no período de 10 min de incubação em culturas controle, não estimuladas, nossos dados em culturas estimuladas sugerem que a diminuição de marcação de quinacrina seja devida à liberação do conteúdo das vesículas após a incubação das células com agentes despolarizantes. Além disto, tendo em vista que quinacrina cora preferencialmente vesículas contendo ATP (Bodin e Burnstock, 2001a; Coco *et al*, 2003; Pangršič *et al*, 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2007; Striedinger *et al.*, 2007), nossos dados sugerem que agentes despolarizantes induzam a liberação de vesículas contendo este nucleotídeo em células gliais em cultura.

Nossos dados também revelaram que as vesículas coradas com quinacrina em células gliais de retina em cultura possuem uma cinética de desaparecimento independente uma das outras após estímulo com alta concentração de KCl. Em uma mesma célula, enquanto muitas vesículas desapareceram ou diminuíram sua marcação, outras permaneceram inalteradas ou até apresentaram um aumento na intensidade de fluorescência. Estas observações estão de acordo a hipótese de liberação pelo modo “kiss and run” proposta por Chen e colaboradores (2006) para liberação de vesículas por exocitose em astrócitos. Nesta hipótese, os estímulos induzem a aproximação, fusão parcial e desprendimento rápido da vesícula da membrana plasmática. Neste caso, a diminuição na marcação da vesícula mas não o seu desaparecimento completo é devida a uma liberação incompleta do seu conteúdo, sendo apenas ~ 10% liberado, de modo que múltiplas rodadas de liberação evocada são possíveis sem o re-enchimento da vesícula. A liberação

de ATP observada em astrócitos a partir de lisossomos também ocorre pelo método “kiss-and-run” (Zhang et al., 2007).

A liberação de ATP em culturas de células gliais estimada pela liberação de grânulos corados com quinacrina foi confirmada através de métodos que permitem quantificar diretamente o conteúdo de ATP no meio extracelular. O ensaio de bioluminescência com luciferina/luciferase é um destes métodos. A despolarização de células de Müller com alta concentração de KCl ou o tratamento das células com glutamato e kainato induziram um aumento significativo no conteúdo de ATP medido no meio das culturas após 5 minutos de estímulo. Assim como a estimulação com 50 mM de KCl, a estimulação das células com glutamato ou kainato induziram a diminuição da marcação com quinacrina, o que sugere que a liberação de ATP induzida por estes agentes também ocorra por exocitose em células gliais de retina em cultura. Além disto, para todos os agentes inclusive o KCl, a diminuição no conteúdo das vesículas marcadas com quinacrina só foi observada entre 5 e 10 minutos de incubação das células. Entretanto, a discrepância entre o curso temporal da liberação de ATP nos ensaios de bioluminescência e a cinética de liberação das vesículas marcadas com quinacrina pode ser explicada por uma diferença nas temperaturas em que os experimentos foram conduzidos. Nos experimentos para a quantificação de ATP, as culturas foram mantidas a 37°C durante todo o tratamento. Já nos ensaios de fluorescência de quinacrina não foi possível manter esta temperatura nas incubações e os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente, o que pode ter reduzido a velocidade de liberação de ATP vesicular.

Recentemente foi identificado o transportador de nucleotídeo vesicular (VNUT) SLC17A9 responsável pelo acúmulo de nucleotídeos em vesículas por um gradiente eletroquímico de prótons gerado por uma próton-ATPase vacuolar (v-ATPase) (Sawada et al., 2008). Esta proteína está presente em astrócitos e foi relacionada com a liberação exocítica de ATP. Consistente com a observação de que o acúmulo de ATP em vesículas depende da ação do VNUT e da v-ATPase, nossos dados mostraram que a marcação com quinacrina de vesículas pode ser bloqueada por bafilomicina A1, composto que inibe a acidificação vesicular gerada pela ação da v-ATPase (Bowman et al.,

1988). Este efeito da bafilomicina A1 foi semelhante aquele encontrado por Coco e colaboradores (2003) que também realizaram experimentos com quinacrina em astrócitos. Além disso, nossos dados revelaram que bafilomicina A1 foi capaz de inibir o aumento no conteúdo de ATP extracelular induzido por glutamato, sugerindo que o ATP liberado após estimulação por este aminoácido seja proveniente de vesículas que utilizam o gradiente de prótons para estocar ATP, o que reforça a hipótese de liberação de ATP por exocitose de vesículas em células gliais de retina em cultura. Tendo em vista que nenhuma diferença significativa na liberação de ATP, assim como na marcação de vesículas com quinacrina, foi observada entre culturas controle e culturas tratadas somente com bafilomicina A1, nossos dados sugerem que apenas a liberação de ATP evocada por agentes despolarizantes como o glutamato ocorra por exocitose de vesículas. É possível que a liberação espontânea de ATP em células de glia de Müller em cultura ocorra através de outras vias que não a exocitose. Em astrócitos não estimulados, por exemplo, a liberação de ATP pode ocorrer através de hemicanais de conexina (Cotrina et al., 1998; Stout et al., 2002). O uso de bloqueadores de hemicanais ou de outros mecanismos de transporte para inibir a liberação de ATP em nossas culturas poderá ajudar a elucidar esta questão e definir se outros mecanismos de liberação de ATP também estão presentes em células gliais de Müller.

A dependência de  $Ca^{2+}$  e do complexo SNARE é um dos fatores mais importantes na exocitose de vesículas em neurônios, células neuroendócrinas e células gliais (Chen et al., 2006). A liberação de ATP está relacionada com o aumento de  $Ca^{2+}$  interno e quelantes de  $Ca^{2+}$  inibem a liberação de ATP (Coco et al., 2003, Pangršič et al., 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2007; Striedinger et al., 2007), assim como ionóforos de  $Ca^{2+}$  estimulam a liberação desta purina (Queiroz et al., 1999; Pangršič et al., 2007; Pryazhnikov e Khiroug, 2007). Nossos dados revelaram que a incubação de células de Müller em cultura com BAPTA-AM inibiu completamente a liberação de vesículas marcadas com quinacrina induzida por KCl. Estes resultados sugerem que a entrada de íons  $Ca^{2+}$  durante a despolarização da glia seja necessária para a exocitose de vesículas contendo ATP e marcadas com quinacrina. Esta idéia é reforçada por nossa observação de que a incubação das culturas com o ionóforo de cálcio

ionomicina foi suficiente para induzir a liberação das vesículas marcadas com quinacrina, um efeito que foi bloqueado pelo quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  externo EGTA. Tendo em vista que células de Müller da retina de galinha apresentam canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Firth et al., 2001), é possível que a despolarização das células de Müller em cultura por KCl provoque a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, um aumento na concentração intracelular deste íon e conseqüentemente a exocitose de vesículas. A natureza dos canais dependentes de voltagem envolvidos na liberação por exocitose de vesículas contendo quinacrina poderá ser melhor definida pela utilização de bloqueadores seletivos.

Em células gliais de Müller, o aumento de cálcio em resposta ao glutamato normalmente está relacionado com a ativação de receptores metabotrópicos (Keirstead e Miller, 1997) ou receptores AMPA/KA (Wakakura e Yamamoto, 1993). Nossos resultados mostraram que o glutamato foi capaz de induzir o acúmulo de ATP extracelular em nossas culturas, um efeito que foi bloqueado pela incubação conjunta de glutamato com o quelante de cálcio interno BAPTA-AM. Estes resultados sugerem que a ativação de receptores glutamatérgicos em células gliais de retina de pinto induz a liberação de ATP por mecanismos dependentes de cálcio interno. Tendo em vista que glutamato também induziu a liberação de vesículas marcadas com quinacrina, nossos dados sugerem ainda que a ativação de receptores glutamatérgicos induz a liberação de ATP através de exocitose de vesículas em células gliais de retina em cultura. Esta idéia é reforçada pela observação de que a bafilomicina A1, inibidor da v-ATPase que bloqueia o gradiente de prótons em vesículas, foi capaz de inibir completamente o acúmulo de ATP no meio extracelular em culturas estimuladas com glutamato.

Nossos resultados mostraram um maior envolvimento de receptores AMPA/KA na liberação de ATP induzida por glutamato em culturas de células gliais de pinto. A adição do antagonista de receptores AMPA/KA, DNQX, foi capaz de inibir tanto a diminuição de vesículas coradas com quinacrina quanto o acúmulo de ATP no meio extracelular induzido por glutamato, sugerindo que o glutamato seja capaz de estimular a liberação de ATP através da ativação de receptores AMPA/KA em células gliais de Müller em cultura. Esta idéia é

reforçada pela observação de que kainato, um agonista destes receptores, também foi capaz de aumentar a concentração de ATP extracelular em nossas culturas.

Nossos dados também revelaram que o antagonista de receptores NMDA MK-801 não induziu nenhuma modificação na quantidade ou intensidade de fluorescência em culturas coradas com quinacrina, sugerindo a não participação destes receptores na exocitose de vesículas induzida por glutamato. No entanto, embora de maneira não significativa, o acúmulo de ATP extracelular induzido por glutamato foi atenuado pela incubação das células com glutamato na presença de MK-801. Além disto, o agonista NMDA foi capaz de induzir liberação de vesículas coradas com quinacrina em cerca de 20% das culturas analisadas. Estes dados em conjunto sugerem que a liberação de ATP induzida por ativação de receptores ionotrópicos de glutamato seja mediada principalmente por receptores não-NMDA, embora uma pequena população de células gliais de retina de pinto em cultura sejam capazes de liberar ATP em resposta à estimulação de receptores NMDA. Esta idéia é reforçada pela observação de que o padrão de expressão de receptores de neurotransmissores pode variar substancialmente entre as células gliais de uma mesma cultura (Dave et al., 1991; McCarthy e Salm, 1991; Shao e McCarthy, 1993, 1994) e que células gliais de Müller são heterogêneas. A participação ou não de receptores distintos do receptor AMPA/KA, como receptores metabotrópicos ou o próprio NMDA, na liberação exocítica de ATP induzida por glutamato em nossas culturas poderá ser melhor avaliada pelo uso de outros agonistas e antagonistas glutamatérgicos.



## 6 Conclusões

- Nossos dados indicam que a glia de Müller possui vesículas passíveis de serem coradas por quinacrina, um composto que marca vesículas contendo ATP.
- O desenvolvimento de culturas de células da retina provoca mudanças na expressão das vesículas marcadas com quinacrina. As vesículas se encontram em maior densidade na glia mais desenvolvida.
- As vesículas diminuem sua marcação através de estímulos que causam aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  interno na glia, como despolarização por aumento da concentração de  $\text{K}^+$  externo, incubação com ionóforo de cálcio e ativação de receptores glutamatérgicos.
- O aumento de  $\text{K}^+$  extracelular e a ativação de receptores glutamatérgicos induzem um aumento na liberação de ATP de culturas enriquecidas em glia, o que está de acordo com seu efeito na diminuição de vesículas contendo quinacrina. Esta observação reforça a idéia de que estas vesículas contenham este nucleotídeo.
- A liberação de ATP dependente da estimulação por glutamato é proveniente de vesículas e dependente do aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Os receptores ionotrópicos não-NMDA são os principais responsáveis pela liberação de ATP induzida por glutamato, embora o papel dos receptores NMDA não possa ser descartado.

Com base nas observações acima, podemos sugerir que uma das fontes de ATP na retina é a glia de Müller, podendo este nucleotídeo ser liberado de maneira exocítica de vesículas que podem ser coradas com quinacrina.

## 7 Referências Bibliográficas

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. (1994) Purinoceptores: are There Families of P2X and P2Y Purinoceptors? *Pharmacology and Therapeutics*. 64: 445-475.

ABDIPRANOTO, A.; LIU, G.J.; WERRY, E.L.; BENNETT, M.R. (2003) Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *Neuroreport*. 2;14(17):2177-81.

ABRAHAM, E.H.; PRAT, A.G.; GERWECK, L.; SENEVERATNE, T.; ARCECI, R.J.; KRAMER, R.; GUIDOTTI, G.; CANTIELLO, H.F. (1993) The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:312–316

ANCCASI, R.M. (2008) Morte celular induzida pelo ATP nas células de retina embrionária de galinha [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal Fluminense;

ANDERSON, C.M.; BERGHER, J.P.; SWANSON, R.A. (2004) ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem*. 88(1):246-56, 2004

ARAQUE, A.; LI, N.; DOYLE, R.T.; HAYDON, P.G. (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*. 15;20(2):666-73.

BAL-PRICE, A.; MONEER, Z.; BROWN, G.C. (2002) Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia*.40(3):312-23.

BARNES, S.; MERCHANT, V.; MAHMUD, F. (1993) Modulation of transmission gain by protons at the photoreceptor output synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1;90(21):10081-5.

BARNETT, N.L.; POW, D.V. (2000) Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.;41(2):585-91.

BEZZI, P.; DOMERCQ, M.; BRAMBILLA, L.; GALLI, R.; SCHOLS, D.; DE CLERCQ, E.; VESCOVI, A.; BAGETTA, G.; KOLLIAS, G.; MELDOLESI, J.; VOLTERRA, A. (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci.*;4(7):702-10.

BIEDERMANN, B.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. (2002) High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia*, 39(3):217-28.

BIEDERMANN, B.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. (2002) High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia*. 2002 39(3):217-28

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. (2001a) Evidence that release of Adenosine Triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol*. 38(6):900-8.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. (2001b) Purinergic Signalling: ATP Release. *Neurochem Res*. 26(8-9):959-69.

BORGULA, G.A.; KARWOSKI, C.J.; STEINBERG, R.H. (1989) Light-evoked changes in extracellular pH in frog retina. *Vision Res*. 29(9):1069-77.

BOWMAN, E.J.; SIEBERS, A.; ALTENDORF, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;85(21):7972-6.

BRAAS, K.M.; ZARBIN, M.A.; SNYDER, S.H. (1987) Endogenous adenosine and adenosine receptors localized to ganglion cells of the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(11):3906-10.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M.; IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J.;

REICHENBACH, A. (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*; 54(3-4):143-60.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25(4):397-424.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; WEICK, M.; BIEDERMANN, B.; UHLMANN, S.; KOHEN, L.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A. (2002) Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Müller (glial) cells. *Glia*. 37(2):139-52.

BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A.; WIEDEMANN, P. (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.*; 36(5):241-9.

BURNSTOCK, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.*;24(3):509-81.

BURNSTOCK, G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36 (9):1127-1139, 1997.

BURNSTOCK, G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*. 27(3):166-76.

CHAVARRÍA, T.; VALENCIANO, A.I.; MAYORDOMO, R.; EGEA, J.; COMELLA, J.X.; HALLBÖÖK, F.; DE PABLO, F.; DE LA ROSA, E.J. (2007) Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev Neurobiol*. Nov;67(13):1777-88.

CHEN, X.K.; XIONG, Y.F.; ZHOU, Z. (2006) "Kiss-and-run" exocytosis in astrocytes. *Neuroscientist*. 12(5):375-8.

COCO, S.; CALEGARI, F.; PRAVETTONI, E.; POZZI, D.; TAVERNA, E.; ROSA, P.; MATTEOLI, M.; VERDERIO, C.J. (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem*. 10;278(2):1354-62

COOK, B.; PORTERA-CAILLIAU, C.; ADLER, R. (1998) Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J Comp Neurol.* Jun 22;396(1):12-9.

COTRINA, M.L.; LIN, J.H.C.; RODRIGUES, A.A.; LIU, S.; Li, J.; GHADIMI, H.A.; KANG, J.; NAUS, C.C.G.; NEDERGAARD, M. (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *The National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Neurobiology.* 95(26): 15735–15740.

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

CRISTÓVÃO, A.J.; OLIVEIRA, C.R.; CARVALHO, C.M. (2002b) Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res Mol Brain Res.* 28;99(2):125-33.

CUADROS, M.A.; RÍOS, A. (1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 178, 543– 551.

DAVE, V.; GORDON, G.W.; MCCARTHY, K.D. (1991) Cerebral type 2 astroglia are heterogeneous with respect to their ability to respond to neuroligands linked to calcium mobilization. *Glia.*;4(5):440-7.

DE LA ROSA, E.J.; DE PABLO, F. (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* ;23(10):454-8.

DE MELLO, M.C.; VENTURA, A.L.; PAES-DE-CARVALHO, R.; KLEIN, W.L., DE MELLO, F.G. (1982) Regulation of dopamine – and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79 (18): 5708-5712.

DE SAMPAIO SCHITINE, C.; KUBRUSLY, R.C.; DE MELO REIS, R.A.; YAMASAKI, E.N.; DE MELLO, M.C.; DE MELLO, F.G. (2007) GABA uptake by purified avian Müller glia cells in culture. *Neurotox Res.* Sep;12(2):145-53.

DRURY, A.N.; SZENT-GYÖRGYI, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 25;68(3):213-37.

FIELDS, R.D.; BURNSTOCK, G. (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 7(6):423-36.

FIELDS, R.D.; STEVENS, B. (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.*23(12):625-33.

FINBOW, M.E.; HARRISON, M.A. (1997) The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J.* 15;324 (Pt 3):697-712.

FIRTH, S.I.; MORGAN, I.G.; BOELEN, M.K.; MORGANS, C.W. (2001) Localization of voltage-sensitive L-type calcium channels in the chicken retina. *Clin Experiment Ophthalmol.*;29(3):183-7.

FISCHER, A.J.; REH, T.A (2003) Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia.*43(1):70-6.

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(5):283-91.

FRANZE, K.; GROSCHE, J.; SKATCHKOV, S.N.; SCHINKINGER, S.; FOJA, C.; SCHILD, D.; UCKERMANN, O.; TRAVIS, K.; REICHENBACH, A.; GUCK, J. (2007) Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 15;104(20):8287-92.

FUJITA, S.; HORII, M. (1963) Analysis of cytogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch Histol Jpn.* 23:359-66

GADEA, A.; LÓPEZ, E.; HERNÁNDEZ-CRUZ, A.; LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. (2002) Role of  $Ca^{2+}$  and calmodulin-dependent enzymes in the regulation of glycine transport in Müller glia. *J Neurochem.* 80(4):634-45.

GARDINO, P.F.; DOS SANTOS, R.M.; HOKOÇ, J.N. (1993) Histogenesis and topographical distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells in the developing chick retina. *Brain Res Dev Brain Res.* Apr 16;72(2):226-36.

GUALIX, J.; ABAL, M.; PINTOR, J.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1996) Presence of  $\epsilon$ -adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of  $\epsilon$ -ATP. *FEBS Lett.* 5;391(1-2):195-8.

HOUSLEY, G.D.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. (2009) Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci.*32(3):128-41.

INNOCENTI, B.; PARPURA, V.; HAYDON, P.G. (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 1;20(5):1800-8.

IRVIN, J.L.; IRVIN, E.M. (1954) The interaction of quinacrine with adenine nucleotides. *J Biol Chem.*;210(1):45-56.

JAMES, G.; BUTT, A.M. (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated  $Ca^{2+}$  signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol.* 5;447(2-3):247-60.

KANEDA, M.; ISHII, T.; HOSOYA, T. (2008) Pathway-dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 28(1):128-36.

KANH, A.J. (1974) An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Bio.*38: 30-40

KAROWSKI, C.J.; PROENZA, L.M. (1977) Relationship between Müller cell responses, a local transretinal potential, and potassium flux. *J Neurophysiol.* 40(2):244-59.

KEIRSTEAD, S.A.; MILLER, R.F. (1997) Metabotropic glutamate receptor agonists evoke calcium waves in isolated Müller cells. *Glia*.;21(2):194-203.

KRZAN, M.; STENOVEC, M.; KREFT, M.; PANGRŠIČ, T.; GRILC, S.; HAYDON, P.G.; ZOREC, R. (2003) Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci.* 1;23(5):1580-3.

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(10):3570-7.

LIU, G.J.; WERRY, E.L.; BENNETT, M.R. (2005) Secretion of ATP from Schwann cells in response to uridine triphosphate. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 21, pp. 151–160

LÓPEZ T, LÓPEZ-COLOMÉ AM, ORTEGA A. (1994) AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport.* 12;5(4):504-6.

LÓPEZ T, LÓPEZ-COLOMÉ AM, ORTEGA A. (1997) NMDA receptors in cultured radial glia. *FEBS Lett.* 24;405(2):245-8.

MARTINS R.A.; PEARSON R.A. (2007) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 4;1192

MARTINS, R.A.; LINDEN, R.; DYER, M.A. (2006) Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. *Eur J Neurosci.* 24(4):969-80.

MARTINS, R.A.; PEARSON, R.A. (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 4;1192:37-60.

MAYER, M.L. (2005) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* ;15(3):282-8.

MCCARTHY, K.D.; SALM, A.K. (1991) Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. *Neuroscience.* ;41(2-3):325-33.



METEA, M.R.; NEWMAN, E.A (2006) Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci.* 15;26(11):2862-70.

MEY, J.; THANOS, S. (2000) Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews* 3:343–379.

MILLER, R.F. (2004) D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia.* 15;47(3):275-83.

MITCHELL, C.H., CARRE, D.A., MCGLINN, A.M, STONE, R.A; CIVAN, M.M (1998) A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 7174–7178

MONTANA, V.; MALARKEY, E.B.; VERDERIO, C.; MATTEOLI, M.; PAPPAS, V. (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia.* 15;54(7): 700-15.

MOTHET, J.P.; POLLEGIONI, L.; OUANOUNOU, G.; MARTINEAU, M.; FOSSIER, P.; BAUX, G. (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12;102(15):5606-11.

NEAL, M.J.; CUNNINGHAM, J. (1994) Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of Ach from retina cholinergic neurons. *Br J Pharmacol.*;113(4):1085-7.

NEARY, J.T.; ABBRACCHIO, M.P. (2000) Trophic roles of purines and pyrimidines. *Handb Exp Pharmacol* 151 (1) (10 p.1/4): 305-338

NEWMAN, E.A. (1991) Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander. *J. Neurosci.* 11:3972-3983

NEWMAN, E.A. (1994) A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia,* 11:291-299.

NEWMAN, E.A. (1996) Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. *J. Neurosci.* 16:159-168

NEWMAN, E.A. (2001) Propagation of Intracellular Calcium Waves in Retinal Astrocytes and Müller Cells. *Journal of Neuroscience*. 21: 2215-2223,

NEWMAN, E.A. (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *Neurosci*. 1;23(5):1659-66.

NEWMAN, E.A. (2004a) A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biol*. 1(3): 245–252

NEWMAN, E.A. (2004b) Glial Modulation of Synaptic Transmission in the Retina. *Glia*. 15; 47(3): 268–274.

NEWMAN, E.A. (2005) Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci*. 8;25(23):5502-10.

NEWMAN, E.A. (2006) A purinergic dialogue between glia and neurons in the retina. *Novartis Found Symp*.; 276:193-202; discussion 202-7, 233-7, 275-81.

NEWMAN, E.A.; FRAMBACH, D.A.; ODETTE, L.L. (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science*. 14;225(4667):1174-5.

NEWMAN, E.A.; ZAHS, K.R. (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science*. 7;275(5301):844-7.

NEWMAN, E.A.; ZAHS, K.R. (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci*. 1;18(11):4022-8.

NEWMAN, E.A.; REICHENBACH, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 19:307-312

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(8):499-508.

OLIET, S.H.; MOTHET, J.P. (2006) Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function. *Glia* 15;54(7):726-37.

OLIVEIRA, K.R.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DO NASCIMENTO, J.L. (2010) Pharmacological characterization of glutamate Na<sup>+</sup>-independent transport in retinal cell cultures: implications in the glutathione metabolism. *Neurochem Int.* Jan;56(1):59-66.

ORRISS, I.R.; KNIGHT, G.E.; UTTING, J.C.; TAYLOR, S.E.; BURNSTOCK, G.; ARNETT, T.R. (2009) Hypoxia stimulates vesicular ATP release from rat osteoblasts. *J Cell Physiol.*;220(1):155-62.

PANGRŠIČ, T.; POTOKAR, M.; STENOVEC, M.; KREFT, M.; FABBRETTI, E.; NISTRİ, A.; PRYAZHNIKOV, E.; KHIROUG, L.; GINIATULLIN, R.; ZOREC, R. (2007) Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem.* 282(39):28749-58.

PARPURA, V.; BASARSKY, T.A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P.G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 30;369(6483):744-7.

PARPURA, V.; ZOREC, R. (2009) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.*, doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.008

PASTI, L.; ZONTA, M.; POZZAN, T.; VICINI, S.; CARMIGNOTO, G. (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci.* 15;21(2):477-84.

PEARSON, R.A.; CATSICAS, M.; BECKER, D. (2002). Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci* 22:7569-7579.

PEARSON, R.A.; DALE, N.; LLAUDET, E.; MOBBS, P. (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46, 731-744.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; BENNETT, M.V.; ZUKIN, R.S. (1992) Are  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci Lett.* 14;144(1-2):65-9.

PEREZ, M.T.; EHINGER, B.E.; LINDSTRÖM, K.; FREDHOLM, B.B. (1986) Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina. *Brain Res.* 19;398(1):106-12.

POW, D.V.; CROOK, D.K. (1995) Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neurosci Lett.* 23;193(1):25-8.

POW, D.V.; CROOK, D.K. (1996) Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience.* 70(1):295-302.

PRADA, C.; PUGA, J.; PEREZ-MENDEZ, L.; LOPEZ, R.; RAMIREZ, G.; (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci.* 3 (6): 559-569.

PRYAZHNIKOV, E.; KHIROUG, L. (2007) Sub-micromolar increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia.*; 56(1):38-49.

PURO, D.G.; HWANG, J.J.; KWON, O.J.; CHIN, H. (1996) Characterization of an L-type calcium channel expressed by human retinal Müller (glial) cells. *Brain Res Mol Brain Res.*;37(1-2):41-8.

PUTHUSSERY, T.; FLETCHER, E.L. (2004) Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina. *J Comp Neurol.* 19;472(1):13-23.

QUEIROZ, G.; GEBICKE-HAERTER, P.J.; SCHOBERT, A.; STARKE, K.; KÜGELGEN, I.V. (1997) Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience* Vol. 78, No. 4, pp. 1203–1208,

QUEIROZ, G.; MEYER, D.K.; MEYER, A.; STARKE, K.; VON KÜGELGEN, I. (1999) A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience*;91(3):1171-81.

RAUEN, T.; TAYLOR, W.R.; KUHLBRODT, K.; WIESSNER, M. (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res*.291(1):19-31.

REIGADA, D.; LU, W.; MITCHELL, C.H. (2006) Glutamate acts at NMDA receptors on fresh bovine and on cultured human retinal pigment epithelial cells to trigger release of ATP. *J Physiol*. 575:707-720

REYES, R.C.; PARPURA, V. (2009) The trinity of  $Ca^{2+}$  sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*. 55(1-3):2-8.

RODIECK, R.W. (1998) *The First Steps in Seeing*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

SAKAKI, Y.; FUKUDA, Y.; YAMASHITA, M. (1996) Muscarinic and purinergic  $Ca^{2+}$  mobilizations in the neural retina of early embryonic chick. *Int J Dev Neurosci*.14(6):691-9.

SANCHES, G.; DE ALENCAR, L.S.; VENTURA, A.L. (2002). ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int J Dev Neurosci*. 20(1):21-7.

SANTOS BREDARIOL, A.S.; HAMASSAKI-BRITTO,D.E. (2001) Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. *J Comp Neurol*. 3;441(1):58-70.

SANTOS, P.F.; CARAMELO, O.L.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. (1999) Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons. *J Neurobiol*. 15;41(3):340-8.

SARTHY, V.; RIPPS, H., (2001) The retinal Müller Cell. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, NewYork.

SARTHY, V.P.; PIGNATARO, L.; PANNICKE, T.; WEICK, M.; REICHENBACH, A.; HARADA, T.; TANAKA, K.; MARC, R. (2005) Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia*. 15;49(2):184-96.

SAWADA, K.; ECHIGO, N.; JUGE, N.; MIYAJI, T.; OTSUKA, M.; OMOTE, H.; YAMAMOTO, A.; MORIYAMA, Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;105(15):5683-6.

SCEMES, E.; SUADICANI, S.O.; DAHL, G.; SPRAY, D.C. (2007) Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol*. Aug;3(3):199-208.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K.D. (1993) Regulation of astroglial responsiveness to neuroligands in primary culture. *Neuroscience*.;55(4):991-1001.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K.D. (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia*.;11(2):147-55.

SPENCE S.G.; ROBSON J.A. (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 32(3):801-12.

STEVENS, E.R.; ESGUERRA, M.; KIM, P.M.; NEWMAN, E.A.; SNYDER, S.H.; ZAHS, K.R.; MILLER, R.F. (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27;100(11):6789-94.

STIER, H.; SCHLOSSHAUER, B. (1998) Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth. *Eur J Neurosci*.; 10(3):1000-10.

STOUT, C.E.; COSTANTIN, J.L.; NAUS, C.C.; CHARLES, A.C. (2002) Intercellular Calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem.* 277(12):10482-8

STRIEDINGER, K., MEDA, P., SCEMES, E. (2007) Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillations and cell migration. *Glia.* 15;55(6):652-62.

SUGIOKA, M.; FUKUTA, Y.; YAMASHITA, M. (1996)  $Ca^{2+}$  responses to ATP via purinoreceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol.* 15;493 (Pt 3):855-63.

SUGIOKA, M.; ZHOU, W.L.; HOFFMANN, H.D.; YAMASHITA, M. (1999)  $Ca^{2+}$  mobilization and capacitive  $Ca^{2+}$  entry regulate DNA synthesis in cultured chick retinal neuroepithelial cells. *Int J Dev Neurosci.* 17(3):163-72.

SUGIOKA, M.; ZHOU, W.L.; HOFMANN, H.D.; YAMASHITA, M. (1999) Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo. *Int J Dev Neurosci.*;17(2):135-44.

TASCHENBERGER, H.; JÜTTNER, R.; GRANTYN, R. (1999)  $Ca^{2+}$ -permeable P2X receptor channels in cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 1;19(9):3353-66.

THORESON, W.B.; WITKOVSKY, P. (1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.*;18(6):765-810.

UCKERMANN, O.; VARGOVÁ, L.; ULBRICHT, E.; KLAUS, C.; WEICK, M.; RILLICH, K.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; SYKOVÁ, E.; BRINGMANN, A. (2004) Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea pig retina. *J Neurosci.* 10;24(45):10149-58.

UCKERMANN, O.; WOLF, A.; KUTZERA, F.; KALISCH, F.; BECK-SICKINGER, A.G.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. (2006) Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. *J Neurosci Res.* 83(4):538-50.

VECINO, E.; HERNÁNDEZ, M; GARCÍA, M (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 965-974.

VERKHRATSKY, A.; KIRCHHOFF, F. (2007) Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat.*;210(6):651-60.

VERKHRATSKY, A.; ORKAND, R.K.; KETTENMANN, H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.*78(1):99-141.

WAKAKURA, M.; YAMAMOTO, N. (1994) Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res.*;34(9):1105-9.

WAKAKURA, M.; YAMAMOTO, N. (1994) Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res.*;34(9):1105-9.

WEN, R.; OAKLEY, B. II (1990) K<sup>+</sup>-evoked Müller cell depolarization generates b-wave of electroretinogram in toad retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;87(6):2117-21.

WILLBOLD, P.; LAYER, G. (1998) Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol. Histopathol.* 13\_531–552.

WURM, A.; PANNICKE, T.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. (2008) Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. *J Neurochem.*;104(2):386-99.

YAMADA, K.; FUJI, K.; SHIMADA, T.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. (2005) Endosomal proteases facilitate the fusion of endosomes with vacuoles at the final step of the endocytotic pathway. *Plant J.*;41(6):888-98.

ZHANG, X.; ZHANG, M.; LATIES, A.M.; MITCHELL, C.H. (2005) Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca<sup>2+</sup> and kills retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;46(6):2183-91.



ZHANG, Z.; CHEN, G.; ZHOU, W.; SONG, A.; XU, T.; LUO, Q.; WANG, W.; GU, X.S.; DUAN, S. (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.*;9(8):945-53.

ZIMMERMANN, H. (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Dev Res* 52:44–56.

# 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](#)