Loreni Cristine da Silva

**A GTPase Rac1 PARTICIPA DA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS GLIAIS DE MÜLLER APÓS LESÃO EXCITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

Loreni Cristine da Silva

**A GTPase Rac1 PARTICIPA DA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS GLIAIS DE MÜLLER APÓS LESÃO EXCITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dânia Emi Hamassaki

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Loreni Cristine.

A GTPase Rac1 participa da proliferação de células gliais de Müller após lesão excitotóxica. / Loreni Cristine Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Dania Emi Hamassaki Britto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia Celular da retina.

Versão do título para o inglês: Rac1 GTPase participates in the proliferation of Müller glial cells after excitotoxic injury..

Descritores: 1. Retina 2. Proliferação Celular 3. Pintos I. Hamassaki, Dania Emi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

ICB/SBIB021/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Loreni Cristine Silva.

Título da Dissertação: A GTPase Rac1 participa da proliferação de células gliais
de Müller após lesão excitotóxica. .

Orientador(a): Dania Emi Hamassaki Britto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011)3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p style="text-align: right;">COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.054.08

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 52/05/CEEA, datado de 02.06.05 e por solicitação da Profa. Dra. DANIA EMI HAMASSAKI, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos Cinthia Takeyama, Felipe Monteleone Vieceli, Fernanda Balem, Loreni Cristine da Silva, Ricardo Moraes Borges a linha de pesquisa " *Desenvolvimento, degeneração da retina de vertebrados: aspectos celulares e moleculares*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 23 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA- ICB/USP

À melhor pessoa do mundo: minha MÃE.
Obrigada pelo incentivo para realização
deste trabalho e por me oferecer amor e
apoio, incondicionalmente.

Te amo.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular da Retina: Sayami, Fernanda, Kelly, Cristiano e Márcio pelo auxílio e convivência que contribuíram para a realização deste trabalho.

À professora Marinilce pelas contribuições a este trabalho e por ajudar a me preparar para a qualificação.

Ao professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto e Adilson da Silva Alves pela disponibilização do biotério e do microscópio.

À Dânia por me acolher em seu laboratório e me ajudar em momentos difíceis - profissionais e pessoais.

Obrigada por tudo!

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES

RESUMO

Silva LC. A GTPase Rac1 participa da proliferação de células gliais de Müller após lesão excitotóxica. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

As evidências de que, em peixes e aves, as células gliais de Müller geram novos neurônios retinianos em resposta a lesões, sugerem que essas células sejam uma possível fonte para regeneração retiniana também em mamíferos. Em contrapartida, sabe-se que as degenerações que acometem a retina podem ser exacerbadas pela proliferação exagerada destas células durante a gliose reativa. Em ambos os eventos, o equilíbrio na proliferação desta célula é essencial. Nesse contexto, as GTPases Rho podem ter um papel interessante, visto que regulam múltiplas vias de sinalização que controlam, por exemplo, a transcrição gênica, sobrevivência e proliferação celular. No presente estudo analisamos a participação de um dos membros dessa família (Rac1) na proliferação de células gliais de Müller da retina de galinhas após lesão excitotóxica com N-Metil-D-Aspartato (NMDA). A análise da participação de Rac1 foi feita após sua inibição com NSC23766. A proliferação foi avaliada a partir de administração de BrdU (análogo sintético da timidina). A injeção intraocular de NMDA promoveu extensa proliferação de células gliais de Müller. O padrão de distribuição de Rac1 sofreu desorganização na camada nuclear interna, provavelmente devido à morte de células amácrinas. A inibição de Rac1 não afetou a entrada no ciclo celular. Entretanto, provocou um retardo na progressão do ciclo celular, com a mitose sendo observada tardiamente (96 horas após lesão com NMDA). Nas condições utilizadas neste estudo, a inibição desta GTPase não alterou significativamente a excitotoxicidade causada por NMDA. Esses resultados sugerem um importante papel para a GTPase Rac1 na regulação da proliferação de células gliais de Müller em resposta a lesões retinianas, tornando-a um possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: Retina. Células gliais de Müller. GTPase Rho. Rac1. Proliferação.

ABSTRACT

Silva LC. Rac1 GTPase participates in the proliferation of Müller glial cells after excitotoxic injury. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology Program)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The evidence that, in fish and birds, Müller glial cells generate new neurons in response to retinal injury, suggests that these cells are a potential source for retinal regeneration in mammals. On the other hand, it is known that degenerations that affect the retina can be exacerbated by exaggerated proliferation of these cells during reactive gliosis. At both events, the balance of cell proliferation is essential. In this context, Rho GTPases may have an interesting role, since they regulate multiple signaling pathways that control, for example, gene transcription, cell proliferation and survival. This study analyzed the involvement of a member of this family (Rac1) in the proliferation of Müller glial cells of chick retina after excitotoxic injury with N-methyl-D-aspartate (NMDA). The participation of Rac1 was evaluated after its inhibition with NSC23766. The proliferation was evaluated by administration of BrdU (synthetic analogue of thymidine). Intraocular injection of NMDA promoted extensive Müller glia proliferation, and a disorganization of Rac1 distribution pattern in the inner nuclear layer, probably due to amacrine cells death. Although Rac1 inhibition did not affect cell cycle entry, a delay in cell cycle progression was observed; mitosis could only be observed later (96 hours after injury with NMDA). Under the conditions employed in this study, no significant change was observed in the excitotoxicity caused by NMDA after the inhibition of this GTPase. These results suggest an important role for Rac1 in the regulation of Müller glial cells proliferation in response to retinal injury, and as a potential therapeutic target for retinal degenerations.

Key words: Retina. Müller glial cells. GTPase Rho. Rac1. Proliferation.

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	10
1.1 Células gliais de Müller	11
1.2 Potencial regenerativo de células gliais de Müller	13
1.3 GTPases Rho	15
1.4 Ciclo Celular	17
1.5 Proliferação e Rac1	18
<u>2 OBJETIVOS</u>	20
<u>3 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	21
3.1 Animais	21
3.2 Injeções intraoculares	21
3.3 Secção e imunohistoquímica	22
3.4 TUNEL	23
3.5 Fotomicrografias, contagem e análise estatística	23
<u>4 RESULTADOS</u>	25
4.1 Excitotoxicidade provocada por NMDA estimulou a proliferação na região central da retina	25
4.2 Células gliais de Müller proliferaram após lesão com NMDA	28
4.3 O padrão de imunomarcção de Rac1 sofreu desorganização Após lesão com NMDA	30
4.4 A administração de duas doses de 100µM ou dose única de 200µM do inibidor de Rac1 (NSC23766) afetou a proliferação de células gliais de Müller	32
4.5 O inibidor de Rac1 NSC23766 não foi tóxico para retina	35
4.6 Rac1 está envolvida na progressão do ciclo celular após lesão	37
4.7 A inibição de Rac1 não alterou o deslocamento nuclear das células proliferantes	40
4.8 A inibição de Rac1 após administração de NMDA não influenciou a morte neuronal	41
<u>5 DISCUSSÃO</u>	43
<u>6 CONCLUSÕES</u>	52
<u>REFERÊNCIAS</u>	53

1 INTRODUÇÃO

A retina faz parte do sistema nervoso central e exerce papel imprescindível na percepção visual de vertebrados. Todos os tipos celulares presentes neste tecido (neurônios e glia) são provenientes de uma mesma célula progenitora. Esta célula sofre inúmeras divisões e com a progressão do desenvolvimento, origina células que se diferenciam em uma célula madura quiescente. A determinação do tipo celular originado segue uma mesma sequência em todos os animais (células ganglionares, horizontais, cones, amácrinas, bastonetes, bipolares e células gliais de Müller) e possui um padrão de maturação gradual, que segue da região central para periférica (Agathocleous e Harris, 2009).

Figura 1 - Ilustração representativa da organização da retina e células pertencentes a este tecido. As células fotorreceptoras (F) tem o corpo celular localizado na camada nuclear externa (ONL), células amácrinas (A), bipolares (B), horizontais (H) na camada nuclear interna (INL) e as células ganglionares (G) tem o corpo celular localizado na camada de célula ganglionares (GCL). As células gliais de Müller (M) estendem-se por toda espessura da retina e possuem o corpo celular localizado na camada nuclear interna. Também é possível observar a presença de células microgliais (Mg), que podem localizar-se na camada plexiforme interna (IPL).

Fonte: Modificado de Reichenbach e Bringmann (2010).

A retina madura possui uma organização laminar, composta por três camadas de corpos celulares que estabelecem sinapses entre si através de camadas constituídas por seus processos (Kolb, 1994). Diversos tipos e subtipos neuronais altamente especializados estão presentes: fotorreceptores (cones e bastonetes, camada nuclear externa), células horizontais, bipolares e amácrinas (camada nuclear interna) e ganglionares (camada de células ganglionares) (Figura 1) (Tanaka e Ferretti, 2009). Além dos neurônios anteriormente descritos, a retina possui na camada nuclear interna, os corpos celulares das células gliais de Müller. Essa descrição apresenta uma visão simplificada da retina, pois sua organização funcional é muito mais complexa, envolvendo circuitos sinápticos elaborados e atuação concomitante de diversos neuromediadores e seus receptores.

1.1 Células Gliais de Müller

A morfologia das células gliais de Müller varia de acordo com a espécie de vertebrado estudada (Figura 2) (Cajal, 1982; Dreher et al., 1992). De maneira geral, apresentam formato cilíndrico e organizam-se paralelamente entre si, além de estender-se radialmente ao longo de toda a espessura da retina, prolongando-se da camada limitante interna (próxima ao vítreo) até a camada limitante externa (acima da camada nuclear externa) (Newman e Reichenbach, 1996). Estas especificações são importantes para uma de suas propriedades recentemente descrita: funcionam como fibra óptica, capazes de captar a luz e levá-la diretamente aos fotorreceptores. Conduzem a luz por toda a espessura da retina e a informação é processada com o mínimo de distorção e dispersão que sofreria caso fosse necessário atravessar todas as camadas de células subjacentes (Franze et al., 2007).

As células de Müller também desempenham diversas outras funções típicas de células gliais (como, por exemplo, astrócitos), visando a manutenção do tecido e sua perfeita atividade. Assim, além do suporte estrutural para os pericários e dendritos de neurônios (Newman e Reichenbach, 1996; Newman, 2004a), mantêm a homeostase do meio extracelular: regulam a concentração de íons, produzem

anti-oxidantes, fatores neurotróficos, citocinas, além de seqüestrar e inativar neuromediadores importantes na retina (Newman, 2004b).

Figura 2 - Esquema das células de Muller de diferentes espécies de vertebrados (sapo, peixe, lagarto, galinha e boi), utilizando a técnica de Golgi
Fonte: Cajal, 1892.

Uma das funções mais importantes da célula glial de Müller na retina é a captação e reciclagem de aminoácidos excitatórios (Reichenbach e Bringmann, 2010). Estas células expressam transportadores de aminoácidos, em especial o EAAT1, também conhecido como (GLAST), que contribui para remoção destes aminoácidos do meio extracelular. No meio intracelular, o glutamato é convertido à um composto não reativo, a glutamina. Esta conversão é realizada pela enzima glutamina sintetase, presente apenas em células gliais de Müller, na retina. No sistema nervoso central, o glutamato, pode desencadear uma potente resposta excitotóxica, caso sua concentração extracelular esteja elevada. Desta maneira, torna-se o possível responsável por diversas lesões, incluindo isquemia, anóxia e trauma. Além disso, também já foi observado aumento na concentração de glutamato no vítreo de humanos e macacos acometidos por glaucoma (García e Vecino, 2003).

Todas as lesões retinianas, incluindo retinose pigmentar, degeneração macular, retinopatia diabética e glaucoma, levam à gliose reativa de células gliais de Müller. A gliose reativa caracteriza-se por mudanças na morfologia das células gliais de Müller, tais como hipertrofia, aumento do corpo celular, inchaço dos processos,

além de aumento no conteúdo de filamento intermediário GFAP (proteína acídica fibrilar), alteração na atividade de canais de potássio (Kir) e modulação na expressão gênica que a assemelham a uma célula glial imatura. A princípio, esta resposta celular tem como objetivo minimizar os danos e restaurar o tecido. Há produção de citocinas e fatores neurotróficos, importantes para sobrevivência neuronal.

Entretanto, as alterações pelas quais as células de Müller passam, podem ser exacerbadas em casos onde a lesão é muito extensa e/ou duradoura. Neste contexto, a gliose conservativa que atua na proteção da retina torna-se gliose proliferativa, prejudicial ao tecido. A gliose proliferativa, como a própria denominação já informa, é caracterizada pela proliferação exagerada das células gliais. Dyer e Cepko (2000) observaram que a regulação negativa da CKI (inibidor de cinase dependente de ciclina) p27^{kip1} caracteriza o início deste processo, viabilizando a nova entrada no ciclo celular. A proliferação, então, é limitada após a regulação negativa da ciclina D3 (Dyer e Cepko, 2000). Esta proliferação promove a formação de um denso tecido cicatricial. Esta cicatriz pode inibir o crescimento axonal e dendrítico, impossibilitando a restauração da conexão sináptica entre os neurônios e desencadear mecanismos citotóxicos capazes de causar degenerações secundárias (Jadhav et al., 2009; Sofroniew, 2005; García e Vecino, 2003, Dyer e Cepko, 2000). Desta maneira, a gliose reativa pode ser benéfica e também deletéria para o tecido, dependendo do tempo e da amplitude da resposta.

1.2 Potencial regenerativo das células gliais de Müller

Ao se diferenciarem em neurônios, os progenitores retinianos cessam a expressão de genes característicos de células progenitoras e saem do ciclo celular. Entretanto, sabe-se que o mesmo não ocorre quando os progenitores se diferenciam em células gliais de Müller. Eles retêm a expressão de genes característicos de células progenitoras e em determinadas circunstâncias, após lesões da retina, podem entrar novamente no ciclo celular. Desta maneira, as células gliais de Müller podem apresentar potencial regenerativo, como células-tronco/progenitoras da retina, capazes de proliferação, desdiferenciação em

progenitores retinianos, diferenciação em novos neurônios e glia e integração à circuitaria retiniana (Lamba et al. 2008).

A retina de peixes apresenta uma admirável regeneração proveniente das células gliais de Müller (Bernardos et al., 2007). Esta capacidade, em menor grau, já foi observada também em aves (Fisher e Reh, 2001) e de maneira limitada, em mamíferos. Estes estudos demonstram, portanto, que a base celular para regeneração está presente inclusive em humanos (Bhatia et al. 2009).

Após lesão da retina de pintos por injeção intra-ocular de doses excitotóxicas de N-metil-D-aspartato (NMDA) uma grande quantidade das células de Müller foi capaz de se desdiferenciar, expressar fatores de transcrição característicos de células-tronco retinianas (Chx10 e Pax6), entrar novamente no ciclo celular e proliferar (Fischer e Reh, 2001). Enquanto a maior parte dessas células manteve-se desdiferenciada, as demais originaram novos neurônios (células amácrinas e bipolares,) ou células de Müller. O mesmo ocorreu com cainato e colchicina, que em concentrações tóxicas levaram à morte principalmente as células ganglionares. De modo interessante, as células de Müller se diferenciaram e substituíram especificamente os tipos celulares perdidos em cada um dos tratamentos (Fischer e Reh, 2002; Fischer e Reh, 2003; Moshiri et al., 2004).

Respostas semelhantes foram obtidas através da administração de fatores de crescimento (Insulina e FGF – fator de crescimento de fibroblasto) sem a necessidade de lesão retiniana. Uma vez que esta capacidade regenerativa foi estabelecida, as vias que medeiam estes processos começaram a ser investigadas. Dentre os resultados obtidos nestes estudos destaca-se a via de MAPK, que é ativada na resposta das células gliais de Muller à lesão com NMDA e ao estímulo por fatores de crescimento. Nos dois modelos, sua ação é *downstream* ao receptor de FGF (Fischer et al., 2009a, Fischer et al., 2009b). Contudo, a ativação apenas desta via não é suficiente para induzir a entrada de células de Müller novamente no ciclo celular, visto que a via de Notch parece atuar em conjunto com a via de MAPK (Ghai et al. 2010). A ativação da via de Notch é importante para a proliferação e desdiferenciação em progenitores, mas depois torna-se limitante para a diferenciação neuronal (Hayes et al., 2007).

É interessante ressaltar que a capacidade regenerativa de células gliais de Müller já foi observada em mamíferos (Del Debbio et al., 2010). Em roedores, resultados semelhantes aos obtidos em aves foram obtidos por Ooto et al. (2004),

onde a indução de neurotoxicidade por NMDA provocou proliferação e diferenciação de células de Müller. Dados recentes indicam que as células lesadas após dano agudo liberaram glutamato, que então atua como um sinalizador para estimular a neurogênese na retina adulta (Takeda et al., 2008). Este estudo revelou que níveis subtóxicos de glutamato e seu análogo α -Aminoadipato podem estimular a proliferação de células de Müller de camundongos. Além de proliferar, essas células migraram e se diferenciaram em novos neurônios, incluindo fotorreceptores. Também já foi demonstrado que lesão do nervo óptico acarreta a morte de células ganglionares e é capaz de ativar e estimular a proliferação das células de Müller, de maneira que após dez dias a maior parte destas células foi recrutada para a camada de células ganglionares lesada (Tackenberg et al., 2009).

Close et al. (2006) descrevem uma diminuição na expressão do receptor de EGF (fator de crescimento epidermal) em células gliais de Muller durante o desenvolvimento pós-natal da retina. Este declínio foi relacionado a uma diminuição na resposta proliferativa, estimulada por EGF, que acarretaria a quiescência observada em condições fisiológicas (após a segunda semana pós-natal). Em contrapartida, após lesão das células fotorreceptoras por luz, as células de Müller aumentaram a expressão deste receptor e entraram novamente no ciclo celular após administração de EGF. Desta maneira, esses dados em conjunto demonstram que o potencial de diferenciação das células de Müller está intimamente relacionado às alterações promovidas pelos estímulos aos quais a retina é exposta (Ahmad et al., 1999; Marquardt e Gruss, 2002; Insua et al., 2008).

1.3 GTPases Rho

Apesar dos dados conhecidos até o momento, mais estudos ainda são necessários para a compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos na regulação dos passos que medeiam a resposta proliferativa e regenerativa das células gliais de Müller, desencadeadas após lesões. Neste contexto, se destaca um grupo de proteínas denominadas GTPases Rho.

As GTPases Rho (RhoA, RhoB, Cdc42, Rac1, entre outras) são proteínas de baixo peso molecular (21-25 kDa) que fazem parte da super-família das GTPases

Ras. São encontradas em todas as células eucarióticas. Em resposta a diferentes sinais extracelulares podem desempenhar diversas funções, como: migração, expressão gênica e progressão do ciclo celular (Jaffe e Hall, 2005; Etienne-Manneville e Hall, 2002).

O estado ativo (ligação ao GTP) e inativo (ligação ao GDP) das GTPases Rho é controlado por três classes de proteínas regulatórias: fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), que estimulam a troca de GDP por GTP, proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), que promovem a hidrólise do GTP em GDP e fatores inibidores da dissociação de GDP (GDIs), que formam um complexo com a proteína inativa, inibindo sua ativação (Figura 3) (Bustelo et al., 2007; Jaffe e Hall, 2005). Uma vez ativa essas GTPases são capazes de atuar intracelularmente via seus efetores sendo os mais descritos: ROCKs, PAKs, MAPKs.

Estudos do nosso laboratório mostraram que as GTPases RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 estão distribuídas durante o desenvolvimento nos neurônios e células gliais retinianas (Santos-Bredariol et al., 2002, 2006), sugerindo que algumas proteínas Rho possam ser recrutadas em momentos distintos, desempenhando papéis específicos nos processos de diferenciação celular, migração neuronal, elaboração e plasticidade dendrítica e na formação de sinapses (Ruchhoeft et al., 1999; Lehmann et al., 1999; Wong et al., 2000; Wong e Wong, 2000).

Figura 3 - Ilustração esquemática do mecanismo de ativação/inativação das GTPases Rho
Fonte: Jaffe e Hall, 2005.

1.4 Ciclo Celular

Em resposta a lesões retinianas, as células gliais de Müller podem exibir características relacionadas à gliose proliferativa e também de células progenitoras capazes de originar novos neurônios. Há um ponto comum a ambos os processos: as células gliais de Müller entram novamente no ciclo celular e proliferam.

O ciclo celular é composto por uma sucessão de eventos complexos e coordenados que culmina na divisão celular. Brevemente, o ciclo celular pode ser dividido em quatro fases distintas e necessariamente sucessivas. A primeira fase, denominada **fase G1**, possui um ponto de restrição que ao ser ultrapassado torna a célula comprometida a transpor o restante do ciclo celular. A célula então inicia a **fase S**, onde ocorre a replicação do material genético a partir da síntese de DNA. A terceira fase, **fase G2**, em conjunto com as anteriores, faz parte do período denominado intérfase, que antecede a mitose propriamente dita. A mitose ocorre apenas na quarta fase, denominada **fase M**, na qual uma cópia completa do material genético será transmitida para cada uma das duas células originadas (Suryadinata et al., 2010; Borriello et al., 2007).

A progressão do ciclo celular é mediada por proteínas responsáveis por controlar positiva ou negativamente a transição entre as fases. Agindo de maneira positiva, ou seja, mediando estas transições destaca-se o complexo ciclina-CDK (cinase dependente de ciclina). Neste complexo, **CDK** atua como a subunidade catalítica de cinase, fosforilando diversos substratos, e a **ciclina** é a subunidade ativadora do complexo (Suryadinata et al., 2010). Em contrapartida, **CKIs** (inibidor de cinase dependente de ciclina) podem ligar-se ao complexo ciclina-CDK, desta maneira inativando-o (Borriello et al., 2007).

As CKIs podem ser divididas em duas famílias, de acordo com sua homologia e especificidade de ação: INK4 e Cip/Kip. Os membros da família INK4, denominados p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} e p19^{Ink4d} inibem especificamente a ação de CDK4 e CDK6. A família Cip/Kip compreende p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, capazes de inibir uma maior quantidade de complexos ciclina-CDK (Borriello et al., 2007).

Figura 4 - Participação dos complexos ciclina-CDKs durante as fases do ciclo celular.
 Fonte: Suryadinata et al. (2010).

Como já mencionado, a progressão das fases do ciclo celular é regida por complexos ciclina-CDK e estes complexos atuam em etapas específicas. A princípio, mitógenos estimulam a expressão de ciclina D que unida à CDK4 e 6 atua de duas maneiras: 1) fosforila o produto do gene retinoblastoma (Rb) promovendo a expressão de genes necessários para progressão de G₁; 2) atua como reservatório de CKIs. Há então a síntese de ciclina E que ao se unir com CDK2 fosforila substratos envolvidos na progressão de G₁ para S. A síntese de ciclina E cessa e CDK2 interage com ciclina A para a progressão da fase S, ciclina A-CDK1 atua na fase G₂ e finalmente ciclina B-CDK1 promove a progressão da mitose (Figura 4) (Echalier et al., 2010; Suryadinata et al., 2010).

1.5 Proliferação e Rac1

Na literatura há indícios crescentes de que a progressão do ciclo celular conta com a participação das GTPases Rho em diversos momentos (Villalonga e Ridley, 2006). Dentre estas proteínas, Rac1, já teve sua participação descrita na proliferação de diferentes tipos celulares. Recentemente, Leone et al. (2010) observaram que a deleção desta GTPase promoveu a redução na expressão de ciclina D2, diminuindo a proliferação de células progenitoras da zona subventricular

de embriões de camundongos, além de promover, precocemente, a saída do ciclo celular e diferenciação destas células.

A inibição de Rac1 em linhagens de células de câncer de mama humano (MDA-MB-231, MCF7 e T47D) provocou parada do ciclo celular na fase G1 por meio de regulação negativa de ciclina D1 além de desfosforilação e subsequente inativação de Rb (Yoshida et al., 2010). Mutante constitutivamente ativo de Rac1 em fibroblastos da linhagem NIH 3T3 atua em diversos pontos de regulação da progressão do ciclo celular, promovendo acúmulo de ciclina D1, fosforilando Rb e favorecendo a ativação do fator de transcrição E2F (Gjoerup et al., 1998).

Em cultura de retina de embriões de galinha, a via Ras/PI3-Kinase está envolvida na proliferação e a ativação de Rac/Rho é necessária para este processo (Peyssonaux et al., 2000). Células musculares de aorta de rato, em cultura, proliferam em meio com soro a partir da ativação do Rho GEF Vav3 e pela via Rac1/Pak (Toumaniantz et al., 2010). Fuchs et al. (2009) demonstraram que EGF é um potente mitógeno para progenitores tardios, provenientes da crista neural de camundongos. Esta proliferação é desencadeada a partir da ativação de Rac1/Cdc42 e a deleção destas GTPases provoca um aumento na expressão de p21^{Cip1} capaz de provocar a saída do ciclo celular. Estes são apenas alguns exemplos, mas há um número crescente de estudos que apontam para o estabelecimento do conceito de que esta GTPase é uma reguladora-chave na progressão do ciclo celular podendo tornar-se portanto, um importante alvo terapêutico.

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo investigar o envolvimento da GTPase Rac1 na proliferação das células gliais de Müller de pintos após lesão retiniana induzida por doses excitotóxicas de N-Metil-D-Aspartato.

Estratégias utilizadas:

- Estímulo da proliferação de células de Müller em retina de pintos a partir de injeções intraoculares de NMDA;
- Análise da proliferação por meio de incorporação de BrdU;
- Confirmação da proliferação de células gliais de Müller por meio de imunohistoquímica com anticorpo anti-BrdU e anticorpo anti-glutamina sintetase, enzima expressa apenas por este tipo celular na retina;
- Análise da participação de Rac1 utilizando-se inibidor de Rac1, NSC23766
- Detecção de células apoptóticas pelo método de TUNEL

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo 052).

Pintos (White Leghorn) recém eclodidos (P1) foram mantidos em biotério, com temperatura de 25 °C, ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro, com água e ração *ad libitum*.

3.2 Injeções Intraoculares

As injeções foram realizadas como já descrito na literatura (Fischer e Reh, 2001; Fischer et al., 1998). Oito dias após a eclosão (P8), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (10mg/kg) e xilazina (2mg/kg). Após anestesia injeções intraoculares excitotóxicas de NMDA 1mM (20µl de volume final) foram realizadas a partir da região dorsal. Conforme mencionado anteriormente, o NMDA, análogo do neurotransmissor glutamato, é excitotóxico em doses elevadas e promove extensa lesão retiniana.

Após 24h, os animais foram divididos em 3 grupos e receberam injeções intraoculares (20µl/olho) do inibidor de Rac1, NSC 23766, no olho direito em:

- Injeção única de solução 100 µM ;
- Injeção única de solução 200 µM;
- Duas injeções de solução 100 µM (24 e 36 h após lesão induzida por NMDA).

Quarenta e oito horas após a injeção de NMDA foram feitas injeções intraoculares com BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, 50µg em 20µl/olho), análogo sintético da timidina que é incorporado durante a fase S do ciclo celular.

Em todos os grupos, o olho esquerdo serviu como controle e recebeu injeções de salina tamponada (PBS 0,1M) ao invés de NMDA e de NSC23766.

Os animais foram sacrificados com overdose de ketamina e xilazina em diferentes horários, especificados na linha do tempo que consta em cada um dos resultados. Cada observação foi realizada com uma quantidade mínima de 3 animais, totalizando 40 animais.

Figura 5 – Esquema resumindo os grupos experimentais utilizados.

3.3 Secção e imunohistoquímica

Os olhos foram enucleados, fixados por 15 minutos em paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PB) 0,1M pH 7,3, crioprotetidos em solução de 30% de sacarose por pelo menos 24 horas à 4 °C. Foram embebidos em O.C.T, posicionados em criostato de maneira que as secções foram iniciadas a partir da região dorsal. Após cerca de 4,2 milímetros, foram obtidas 20 secções transversais de 12µm contendo região temporal, central e nasal. Estas secções representativas da retina foram processadas para imunohistoquímica. Foi realizado bloqueio de ligação não-específica com solução contendo 0,3% Triton X-100, 3% de NDS (soro normal de burro), 1% de BSA (albumina sérica bovina) em PB 0,1M. Secções foram incubadas com anticorpo primário (anti- Rac1, 1:1- Santa Cruz Biotech, anti- BrdU, 1:100 – Accurate,) diluído em PB 0,1M, 0,3% Triton X-100 e 0,3% de NDS, durante 16h em câmara úmida à temperatura ambiente. O anticorpo secundário (donkey anti-rat TRITC – Jackson Labs, donkey anti-rabbit FITC – Jackson Labs) foi diluído em PB 0,1M, 0,3% Triton X-100 e os cortes incubados por 2 horas, em câmara úmida à temperatura ambiente. Após lavagem, as secções foram montadas com Vecta Shield (Vector Labs).

3.4 TUNEL

Para detecção de células apoptóticas foi utilizado o método de TUNEL (kit In Situ Cell Death, Roche Applied Science). O material previamente fixado em paraformaldeído 2% foi lavado em PBS 0,05M (pH 7,4). As secções de 12µm foram incubadas em solução contendo Triton-X 100 0,1% e citrato de sódio 0,1% em PBS 0,05M, por 2 minutos em gelo. Após três lavagens com PBS, foi realizado o alongamento dos fragmentos de DNA a partir de incubação, por 60 minutos à 37 °C, com a enzima transferase (TdT) e os nucleotídeos marcados com fluoresceína foram incorporados aos terminais da molécula de DNA fragmentada. A reação foi interrompida com solução de Tris-HCl 4mM e EDTA 5mM por 5 minutos. No controle negativo da reação, a incubação com a enzima (TdT) foi omitida. Os cortes foram montados com Vecta Shield (Vector Labs, Burlingame, CA) e analisados em microscópio confocal Nikon PCM 2000.

3.5 Fotomicrografias, contagem e análise estatística

Após montagem, as secções foram analisadas em microscópio confocal (Nikon PCM2000). Figuras foram montadas em Adobe Photoshop 7.0 (Deneba) e a manipulação restrita a ajustes de brilho e contraste.

A contagem das células BrdU- positivas e TUNEL-positivas foi realizada em cortes transversais da retina central de cada indivíduo ($n \geq 3$). A região periférica da retina, até 2mm de distância do corpo ciliar, não foi considerada. Foram contadas as células localizadas no interior de 12 campos com 260x65µm de diâmetro (equivalente a ± 2000 células no total).

Os valores médios obtidos são apresentados no texto seguidos por $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student (dois grupos) ou ANOVA (mais de dois grupos) o valor de significância foi estabelecido como menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Excitotoxicidade provocada por NMDA estimulou a proliferação na região central da retina

A injeção intraocular de níveis tóxicos de NMDA (1mM) provocou uma extensa morte de células da camada nuclear interna (Figura 5), possivelmente células amácrinas e bipolares. Após 54h desse estímulo neurotóxico, foi observado um grande número de células mitoticamente ativas, demonstrado por incorporação de BrdU, análogo da timidina.

Os núcleos das células que entraram novamente no ciclo celular (BrdU-positivas) estavam localizados principalmente na camada nuclear interna da região central da retina, mas células BrdU-positivas também foram observadas em menor quantidade nas camadas ganglionar e plexiforme interna (Figura 6). A posição destas células foi condizente com a presença de células da microglia, normalmente recrutadas após lesão. Entretanto, como a ênfase foi em células gliais de Müller, células marcadas nas camadas ganglionar e plexiforme interna não foram consideradas nas nossas análises.

Da mesma maneira, tendo em vista a escassa presença de núcleos BrdU-positivos na região periférica da retina, até aproximadamente 2 milímetros do corpo ciliar, o presente estudo se concentrou na retina central.

C

Figura 6 - **A injeção de NMDA estimulou a proliferação na retina central.** Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A). Fotomicrografia representativa de retina processada para o método de TUNEL para detecção de células apoptóticas (B). Fotomicrografias representativas de retinas das regiões central e periférica após injeção intraocular de PBS ou NMDA, administração de BrdU e processamento para imunohistoquímica anti-BrdU (C). Além da proliferação de células gliais de Müller é possível observar, na camada plexiforme interna, a presença de células da microglia BrdU-positivas (cabeça de seta) Abreviaturas: onl, inl, gcl Escala 50µm.

4.2 Células gliais de Müller proliferaram após lesão com NMDA

Dados da literatura descrevem que a lesão com NMDA é capaz de estimular as células gliais de Müller a entrar novamente no ciclo celular e proliferar. Para confirmar que em nosso tratamento as células capazes de proliferar eram células gliais de Müller foi utilizado o anticorpo anti-glutamina sintetase. Este anticorpo foi utilizado como um marcador específico de células gliais de Müller por reconhecer a enzima glutamina sintetase, que na retina é expressa apenas por este tipo celular.

A imunomarcagem obtida com anti- glutamina sintetase estendeu-se por toda a retina, podendo ser observada em corpos celulares e em processos espessos radiais. Esses processos se dirigiam e ultrapassavam as camadas nuclear externa e de células ganglionares, onde as células de Müller formam as membranas limitante externa e interna, respectivamente (Figura 7).

Em retinas tratadas com NMDA e com administração de BrdU após 48 horas foi possível observar que os núcleos BrdU-positivos estavam localizados no interior de corpos celulares imunomarcados com anti- glutamina sintetase (Figura 7). Em retinas controle (injeção de PBS e BrdU após 48 horas) não observamos células proliferando, como descrito anteriormente. Desta maneira foi possível concluir que o tratamento com NMDA estimulou a proliferação de células gliais de Müller.

Figura 7 – **Após lesão com NMDA ocorreu proliferação de células gliais de Müller.** Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A). Fotomicrografia representativa de retinas tratadas com PBS ou NMDA e com administração de BrdU após 48 horas, processadas para imunohistoquímica anti-BrdU(vermelho) e anti-glutamina sintetase (verde) após 72 horas da injeção inicial (B e C). Pode ser observado que a marcação anti-BrdU está circundada pela marcação anti- glutamina sintetase (cabeça de seta, D). Escala (B e C) 30 μ m, (D) 20 μ m. Abreviaturas: INL, camada nuclear interna; ONL, camada nuclear externa; GCL, camada de células ganglionares.

4.3 O padrão de imunomarcção de Rac1 sofreu desorganização após lesão com NMDA

A expressão de Rac1 na retina foi analisada por imunohistoquímica em secções transversais obtidas de retinas que receberam injeções de PBS e retinas tratadas com dose excitotóxica de NMDA. Foi observado que em retinas provenientes de olhos injetados apenas com PBS, Rac1 esteve presente nos segmentos de fotorreceptores; em corpos celulares na camada nuclear interna, predominantemente no terço mais interno desta, e em corpos celulares presentes na camada ganglionar. Os corpos celulares marcados na camada de células ganglionares pertencem a células ganglionares e/ou células amácrinas deslocadas, enquanto que a imunomarcção observada na camada nuclear interna têm localização e morfologia condizente com células amácrinas (corpo celular volumoso, arredondado e próximo à camada plexiforme interna), bem como com células gliais de Müller (células fusiformes, com o corpo celular próximo à região central da camada nuclear interna). Além dos corpos celulares acima descritos, também foi possível observar processos espessos provenientes de células pertencentes à camada nuclear interna que se estendiam pela camada plexiforme interna e em direção à camada plexiforme externa. Após tratamento com NMDA, a imunomarcção de Rac1 em segmentos de fotorreceptores e corpos celulares localizados na camada de células ganglionares permaneceu semelhante. Entretanto, houve uma desorganização no padrão de marcação de Rac1 na camada nuclear interna, principalmente na região mais próxima à camada plexiforme interna, correspondente a células de corpo celular arredondado normalmente observadas em retinas não tratadas (PBS, Figura 8).

Figura 8 - **Tratamento excitotóxico com NMDA promoveu desorganização no padrão de expressão de Rac1.** Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A). Figura representativa da marcação com anticorpo anti-Rac1 (verde) na retina de olhos controle (PBS) e de olhos que receberam injeção de NMDA (B). Escala 20 μ m. Abreviaturas: INL, camada nuclear interna; ONL, camadanuclear externa; GCL, camada de células ganglionares.

4.4 A administração de duas doses de 100µM ou dose única de 200µM do inibidor de Rac1 (NSC23766) afetou a proliferação de células gliais de Müller

A importância de Rac1 no processo de proliferação de células gliais de Müller após a lesão com NMDA foi avaliada a partir da administração de NSC23766.

O efeito da inibição de Rac1 em nosso modelo foi testado a partir de três concentrações de NSC23766: 1) dose única de 100µM; 2) duas doses de 100µM e 3) dose única de 200µM.

A análise de retinas do grupo que recebeu injeção inicial de salina (PBS) e quaisquer das doses mencionadas de NSC23766 demonstrou que este inibidor não estimulou a proliferação de células da retina.

A contagem de núcleos BrdU-positivos em retinas tratadas com NMDA e injeção subsequente de salina (PBS) demonstrou que há 1913 ± 362 células/ mm^2 e que NSC23766 na concentração de 100µM não alterou significativamente este valor (2150 ± 326 células/ mm^2). Entretanto, duas doses de 100µM e dose única de 200µM apresentaram quantidades semelhantes de células proliferando (843 ± 333 e 967 ± 208 respectivamente), e estes valores correspondem a cerca de 50% (***) $p < 0,001$) do observado em retinas tratadas com NMDA e PBS (Figura 9). Para análise mais aprofundada do efeito da inibição de Rac1 sobre proliferação das células gliais de Müller foi escolhida a utilização de duas doses de 100µM de NSC23766.

A

Grupo 1: Dose única de 100µM

Grupo 2: Duas doses de de 100µM

Grupo 3: Dose única de 200µM

Figura 9 – **O inibidor NSC23766 alterou a proliferação de células gliais de Müller.** Esquema dos protocolos dos tratamentos utilizados para esta análise (A). Histograma ilustrando a quantidade de células proliferando (BrdU-positivas) observadas em cada um dos tratamentos. A dose única de 100µM de NSC23766 não teve efeito sobre a proliferação celular obtida apenas com NMDA e salina (PBS), mas duas doses de 100µM ou dose única de 200µM diminuíram pela metade o número de células em proliferação (** $p < 0,001$, $\pm$ desvio padrão) (C).

4.5 O inibidor de Rac1 NSC23766 não foi tóxico para retina

Para avaliar se a inibição de Rac1 *per se* poderia ser deletéria para o tecido retiniano, retinas íntegras foram submetidas a duas injeções de NSC23766 na concentrações de 100µM, com intervalo de 12 horas entre si. Os animais foram sacrificados 12 horas após a ultima injeção e as retinas foram processadas para o método de TUNEL.

A avaliação de retinas controle, que receberam apenas PBS e retinas tratadas com o inibidor de Rac1 demonstrou que a marcação de células apoptóticas estava ausente em ambos os casos (Figura 10). Portanto, este dado demonstrou que NSC23766 não era tóxico para a retina nestas condições.

Figura 10 - **A administração de NSC23766 não provocou danos à retina.** Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A). Figura obtida após método de TUNEL, demonstrando a ausência de apoptose na retina de olhos controle (PBS) e de olhos que receberam injeção NSC23766 (B). Escala 30µm. Abreviaturas: INL, camada nuclear interna; ONL, camada nuclear externa; GCL, camada de células ganglionares.

4.6 Rac1 esteve envolvida na progressão do ciclo celular após lesão

A partir da contagem de células BrdU-positivas, 54 horas após a injeção de NMDA, foi possível observar extensa síntese de DNA (correspondente à fase S do ciclo celular) em núcleos localizados na porção central da camada nuclear interna (876 ± 284 células/ mm^2). Retinas tratadas com NMDA e adição de NSC23766, inibidor de Rac1, não apresentaram diferença na quantidade ou localização de células que entraram novamente no ciclo celular (893 ± 497 células/ mm^2). Desta maneira assume-se que a inibição de Rac1 com a administração de NSC23766 não afetou o início da proliferação de células gliais de Müller (Figura 11).

A avaliação realizada 72 horas após a injeção de NMDA demonstra aumento de cerca de 2 vezes na quantidade de células marcadas com BrdU (1913 ± 362 células por mm^2). Como o BrdU é eliminado do olho após 6 horas (Fisher e Reh 2000), o aumento na quantidade de células marcadas correspondente à divisão celular. Estas células localizam-se predominantemente na camada nuclear interna, mas há abundante presença de células BrdU-positivas na camada nuclear externa, relativo à migração nuclear. Entretanto, retinas tratadas com NMDA e com inibição de Rac1 por NSC23766 apresentam cerca de 40% de células BrdU-positivas (843 ± 333 células por mm^2 , $***p < 0,001$), ou seja, valores próximos aos observados no dia anterior (Figura 10). Nestas retinas a grande maioria dos núcleos marcados localiza-se na camada nuclear interna, mas é possível observar núcleos BrdU-positivos na ONL. Este dado representa a importância de Rac1 para a progressão do ciclo celular.

Para analisar se a inibição de Rac1 era capaz de bloquear ou atrasar a progressão do ciclo celular, as retinas foram coletas mais tardiamente, 96 horas após a injeção de NMDA. Neste tempo avaliado as retinas submetidas ao tratamento apenas com NMDA e retinas submetidas ao tratamento com NMDA e inibição de Rac1 (NSC23766) apresentam a mesma quantidade de células BrdU-positivas (2599 ± 776 e 2654 ± 1472 células por mm^2 , respectivamente). Estes valores não apresentam diferenças com relação ao observado em retinas tratadas com NMDA (72h). Desta maneira, conclui-se que o grupo que sofreu inibição de Rac1 teve um atraso na divisão das células gliais de Müller, observado em NMDA+NSC (72h), mas os valores foram restabelecidos em NMDA+NSC (96h).

A

B

C

Figura 11 - **A inibição de Rac1 por NSC23766 afetou a a divisão de células gliais de Müller.**

Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A). Fotomicrografias representativas de retinas imunomarcadas com o anticorpo anti-BrdU para detecção de células que entraram novamente no ciclo celular, após cada um dos tratamentos. A lesão com NMDA promoveu entrada no ciclo celular – NMDA (54h) – e a administração de NSC23766 não alterou este processo. Após 72 horas da injeção intraocular de NMDA (72h) foi possível observar que houve um aumento de 2x na quantidade de células BrdU-positivas em relação ao observado anteriormente, em NMDA (54h). Entretanto, no grupo tratado com o inibidor de Rac1 – NMDA+NSC(72h) - não houve divisão das células BrdU+ e portanto a quantidade de células marcadas corresponde a metade do observado em NMDA(72h). Após 96 horas a quantidade de células proliferando é igual entre os grupos NMDA(72h), NMDA(96h) e NMDA+NSC(96h) (B). Escala 30µm. Histograma ilustrando a quantidade de células proliferando (BrdU-positivas) presentes na camada nuclear interna (**p < 0,001 , ± desvio padrão) (C). Abreviaturas: INL, camada nuclear interna; ONL, camada nuclear externa; GCL, camada de células ganglionares.

4.7 A inibição de Rac1 não alterou o deslocamento nuclear das células proliferantes

A literatura descreve que 72 horas após lesão com NMDA é possível observar núcleos BrdU positivos que se deslocaram da camada nuclear interna para a camada nuclear externa (ONL) de maneira semelhante à migração nuclear intercinética de progenitores neurais durante o desenvolvimento embrionário. Este evento é considerado passo integrante da proliferação das células gliais de Müller e, portanto, foi avaliado após a inibição de Rac1. A contagem de núcleos BrdU-positivos na ONL em relação ao total de células BrdU-positivas (camada nuclear interna+ONL) foi de aproximadamente $24,3\% \pm 14,7$ no grupo tratado com NMDA e de $20,8\% \pm 14,5$ no grupo tratado com NMDA e NSC23766, não revelando diferença significativa entre ambos (Figura 12).

Figura 12 - **A inibição da atividade de Rac1 com a administração de NSC23766 não influencia o deslocamento nuclear.** Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A) Histograma ilustrando porcentagem de células BrdU-positivas presentes na camada nuclear externa (ONL), 72 horas após a injeção de NMDA ($\pm$ desvio padrão, B).

4.8 A inibição de Rac1 após administração de NMDA não influenciou a morte neuronal

Sabe-se que é necessária uma extensa lesão para estimular a proliferação das células gliais de Müller e que uma redução na morte neuronal pode afetar esta resposta. Portanto, para avaliar se a redução na quantidade de células proliferando após a inibição de Rac1 foi devida a uma possível diminuição na morte neuronal, determinamos de maneira temporal a quantidade de células em apoptose em cada um dos tratamentos pelo método de TUNEL. Para tanto, foram utilizados dois grupos: 1) 24 horas após NMDA dose única de NSC 23766 (100 μ M) e sacrifício 36 horas após NMDA; 2), duas doses de NSC 23766 (100 μ M), 24 e 36 horas após NMDA e sacrifício 48 horas após NMDA.

A administração de NMDA provocou apoptose celular na camada nuclear interna, principalmente na porção mais próxima à IPL. Após 36 horas, a quantidade de células TUNEL-positivas em relação ao total de células marcadas com DAPI revelou que $25,2\% \pm 1,9$ das células presentes na camada nuclear interna estavam em processo apoptótico. Por sua vez, a análise de células TUNEL-positivas tratadas com NMDA e com inibidor de Rac1 (NSC23766, $28,6\% \pm 12,2$) não apresentou diferença significativa quando comparada a retinas tratadas apenas com NMDA (Figura 12).

A porcentagem de células TUNEL positivas observadas 48 horas após a injeção de NMDA revelou que a administração de duas doses de NSC23766 não alterou a quantidade de células apoptóticas ($14\% \pm 4,7$ e $14\% \pm 3,9$, respectivamente). Isso demonstra que há um decréscimo na quantidade de células apoptóticas com o decorrer do tempo, mas sem alteração acarretada pela inibição de Rac1. Portanto, o efeito de NSC23766 sobre a proliferação não é decorrente de influência na morte neuronal.

Figura 12 - A inibição de Rac1 não influencia a morte neuronal provocada por NMDA. Esquema do protocolo de tratamento utilizado para esta análise (A) Fotomicrografias representativas de retinas processadas para o método de TUNEL para detecção de células apoptóticas, 12 horas após a última injeção de NSC2377 ou PBS. A injeção intraocular de NMDA ou de NMDA com o inibidor de Rac1 provocaram a morte de células da retina de maneira semelhante (B). Escala 30µm. (C) Histograma mostrando a porcentagem de núcleos apoptóticos (TUNEL-positivos) em relação ao total de núcleos (DAPI) presentes na camada nuclear interna. Abreviaturas: INL, camada nuclear interna; ONL, camada nuclear externa; GCL, camada de células ganglionares.

5 DISCUSSÃO

A morte celular por excitotoxicidade é uma característica comum de doenças isquêmicas e neurodegenerativas do Sistema Nervoso Central, incluindo as que afetam a retina, como por exemplo o glaucoma. A ativação excessiva dos receptores de glutamato, em especial dos receptores ionotrópicos tipo NMDA leva à morte neuronal, sendo que diversos modelos animais têm sido utilizados com o intuito de tentar impedir a progressão da lesão e reverter este quadro.

Na retina de aves e roedores, após lesão provocada por doses excitotóxicas de NMDA é possível observar células que entram novamente no ciclo celular. Estas células são capazes de incorporar BrdU, um análogo sintético da timidina, além de expressar marcadores como PCNA e Ki67, processo que pode ser precocemente caracterizado pela regulação negativa da CKI p27^{kip1}. Após a mitose voltam ao estado quiescente por meio da regulação negativa da ciclina D3 (Dyer e Cepko, 2000).

Este é o quadro típico observado na gliose proliferativa na retina, que é caracterizado pela proliferação de células gliais de Müller. A gliose reativa pode originar um tecido cicatricial capaz de limitar a restauração do local lesionado e desencadear mecanismos citotóxicos capazes de causar degenerações secundárias (Jadhav et al., 2009; Sofroniew, 2005; García e Vecino, 2003; Dyer e Cepko, 2000). Entretanto, sabe-se que além do papel desempenhado na gliose reativa, as células gliais de Müller são capazes de proliferar, desdiferenciar e originar novos neurônios, participando da regeneração retiniana.

Já foi relatado que as células de Müller na retina de peixes desempenham um admirável papel na regeneração (Bernardos et al., 2007), observada também em menor grau em aves (Fisher e Reh, 2001) e, de maneira limitada, em mamíferos. Estudos demonstram que a base celular para regeneração está presente inclusive em humanos (Bhatia et al., 2009).

Assim, embora as degenerações que acometem a retina possam ser exacerbadas pela proliferação exagerada das células de Müller durante a gliose reativa, a manipulação apropriada dessas células gliais pode levar à regeneração da retina. Em ambos os eventos, o equilíbrio na proliferação das células gliais de Müller é essencial.

Excitotoxicidade provocada por NMDA estimulou a proliferação de células gliais de Müller

A injeção intraocular de NMDA foi utilizada para provocar extensa lesão excitotóxica. Em aves, as células amácrinas são particularmente mais suscetíveis a este tratamento e diminuição na espessura da retina também é observada (Fisher et al., 1998). Nossos resultados corroboram os de outros grupos que mostraram a proliferação de células gliais de Müller em aves (Fisher e Reh, 2001) e também em mamíferos (Karl et al., 2008; Ooto et al., 2004). Já foi demonstrado também que existe um paralelismo entre a extensão da lesão e a quantidade de células que entram novamente no ciclo celular (Fischer et al., 2004).

De maneira geral, foi observado que após lesão com NMDA na retina de aves, as células gliais de Müller entram novamente no ciclo celular e apresentam o pico de proliferação após 48 horas. Estas células sofrem uma divisão mitótica que pode ser observada 72 horas após a lesão. Neste momento, alguns núcleos migram para camada nuclear externa e pode ser observada, a expressão protéica dos fatores de transcrição Pax6 e Chx10, que co-expressos indicam desdiferenciação em células progenitoras. Uma semana depois, algumas destas células começam a expressar proteínas típicas de neurônios ou células gliais de Müller, mas a maioria permanece em um estado indiferenciado (Fischer e Reh, 2001).

Posteriormente à descrição dos passos básicos inerentes ao processo regenerativo, alguns dos mecanismos e fatores participantes estão sendo mais detalhados e elucidados. Neste sentido, destaca-se o FGF (fator de crescimento de fibroblasto), um fator de crescimento liberado após lesão que estimula a proliferação de células gliais de Müller de coelho (Lewis et al., 1992), aves (Fischer e Reh, 2002) e linhagens humanas (Hollborn et al., 2004). Em aves, o FGF ativa a via MAPK e esta ativação deve ser sustentada para que ocorra a proliferação de células gliais de Müller (Fischer et al., 2009b). Essa via de FGF/MAPK depende da via Notch (Ghai et al., 2010), que tem função temporal específica. É importante que esta seja ativada para que ocorra a desdiferenciação em células progenitoras e que seja inibida para que ocorra a diferenciação em novos neurônios (Hayes et al., 2007).

Recentemente, Ghai et al. (2010) propuseram que a população de células gliais de Müller é heterogênea, sendo que em retinas íntegras foi possível observar a expressão de Notch em algumas destas células. Segundo os autores, essas células

capazes de expressar Notch possuem maior potencial para serem ativadas após lesão e participam do processo regenerativo.

Após lesão com NMDA o padrão de imunomarcacão de Rac1 sofreu desorganizaçã

A imunomarcacão com anticorpo contra Rac1 na retina controle (PBS) revelou predominantemente corpos celulares localizados na camada nuclear interna e camada de células ganglionares, além de processos observados na camada plexiforme interna e em direçã à camada plexiforme externa. A análise da expressã desta proteína em idades avaliadas no presente estudo (após P9) é consistente com resultados apresentados por Santos-Bredariol et al. (2002) na retina de pintos durante o desenvolvimento. Este estudo apontou uma peculiaridade na expressã de Rac1 em células gliais de Müller - a imunomarcacão só estava presente neste tipo celular após eclosã do animal, enquanto outros tipos celulares apresentam padrão semelhante na retina embrionária e adulta. Desta maneira, observa-se uma diferença temporal na expressã desta proteína em células gliais de Müller que ainda não teve sua funçã elucidada.

A análise da expressã de Rac1 após a injeçã intraocular de NMDA, revelou diferenças em comparaçã com a retinas tratadas apenas com PBS. Rac1 estava presente de maneira desorganizada em corpos celulares da camada nuclear interna. Este dado por ser explicado pelo fato de que parte da marcaçã obtida com anticorpo anti-Rac1 se refere a células amácrinas (Santos-Bredariol et al., 2002) e o tratamento com doses excitotóxicas de NMDA em pintos acarreta extensa morte deste tipo neuronal, que atinge um pico após 24 horas (Fisher et al., 1998; Saito, 2006). Deste modo, grande parte da populaçã de células amácrinas já havia entrado em processo apoptótico no momento da análise (72 horas após injeçã intra-ocular de NMDA).

A inibiçã de Rac1 por NSC23766 alterou a proliferaçã de células gliais de Müller

NSC23766 é um inibidor de Rac1, capaz de se ligar a esta GTPase em um sulco específico para reconhecimento de fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs). Desta maneira, não ocorre a interaçã dos GEFs TrioN e Tiam1 com Rac1 e esta GTPase permanece inativa (Gao et al., 2004). No sistema nervoso

central estes GEFs estão envolvidos na indução do crescimento de neuritos (Koh, 2006) além de, por exemplo, Tiam1 atuar na formação da árvore dendrítica após ativação do receptor de NMDA (Tolias et al., 2005), enquanto TrioN é importante para orientação axonal de fotorreceptores da retina de *Drosophila* (Newsome et al., 2000).

No presente estudo foi observado que NSC23766 alterou a proliferação estimulada por NMDA com duas doses de 100µM, ou dose única de 200µM. Gao et al. (2004) já haviam descrito que o NSC23766 atua de maneira dose-dependente e que em cultura de fibroblastos NIH 3T3, a adição de 50µM deste inibidor reduziu a atividade de Rac1 em 50%, e a utilização de 100µM diminuiu a quantidade de Rac1 ativo a níveis abaixo dos basais.

A meia vida deste composto químico no olho ainda não é conhecida. Todavia, ao ser administrado intraperitonealmente em camundongos (2,5mg/kg) sua atividade foi indiretamente avaliada a partir da análise da quantidade de Pak1 fosforilado (efetor de Rac1) presente na medula óssea do fêmur destes animais. Pak1 fosforilado atingiu quantidade mínima 6 horas após administração do inibidor, com níveis retornando ao normal após 24 horas (Cancelas et al., 2005). Caso exista um paralelo entre a meia-vida da atividade sistêmica e intra-ocular deste fármaco é possível que, no presente estudo, duas doses de 100µM administradas com intervalo de 12 horas entre si possam ter sua concentração somada, explicando assim a ausência de efeito com dose única de 100µM e efeito equivalente ao observado com dose única de 200µM. Entretanto, a hipótese de que o intervalo de 12 horas tenha sido suficiente para que o inibidor fosse eliminado do olho não pode ser descartada. Após uma droga ser administrada no interior do vítreo do animal ela pode ser eliminada por duas rotas: posterior e anterior. A rota anterior inclui a difusão pelo vítreo até a câmara posterior, onde todos os compostos serão eliminados pela renovação do humor aquoso e fluxo sanguíneo da úvea. Já a rota posterior é adequada apenas para pequenas moléculas, pois depende de permeabilidade passiva ou transporte ativo para ultrapassar a barreira composta pelo epitélio pigmentado e endotélio dos capilares (Urtti, 2006). Tendo em vista que não podemos descartar a hipótese de que o inibidor tenha sido eliminado em intervalo inferior a 12 horas, como ocorre por exemplo com BrdU, que é eliminado após 6 horas (Fisher et al., 2000), foi feita a opção pelo protocolo utilizando duas doses de 100µM.

Rac1 está envolvida na progressão do ciclo celular após lesão

A injeção de NMDA provocou extensa lesão retiniana, capaz de estimular a proliferação de células gliais de Müller, como já descrito por Fischer e Reh (2001). A proliferação foi avaliada a partir da incorporação de BrdU durante a fase S do ciclo celular. Após 54 horas, as células BrdU-positivas estavam presentes na camada nuclear interna, condizente com a localização do corpo celular de células gliais de Müller. A administração do inibidor de Rac1 (NSC23766) não alterou a quantidade e localização destas células. Este dado demonstra que a inibição de Rac1 não impede a entrada no ciclo celular, visto que não há diferença na quantidade de células na fase S, no momento que o BrdU foi administrado.

A avaliação realizada 72 horas após a injeção de NMDA revelou um aumento de 2x na quantidade de células BrdU-positivas, localizadas nas camadas nuclear interna e externa. Por sua vez, retinas que receberam injeção com o inibidor mantiveram a mesma quantidade de células BrdU-positivas que o grupo de 54 horas, sugerindo que Rac1 participa da progressão do ciclo celular.

Para elucidar se a proliferação de células gliais de Müller foi bloqueada ou retardada após inibição de Rac1, as retinas foram coletadas mais tardiamente, 96 horas após a injeção de NMDA. Neste tempo de sobrevivência, as retinas tratadas apenas com NMDA e retinas tratadas com NMDA e inibidor de Rac1 apresentam a mesma quantidade de células BrdU-positivas. Este valor não apresentou diferenças com relação ao observado em retinas tratadas com NMDA (72h). Estes dados conduzem à conclusão de que o grupo que sofreu inibição de Rac1 teve um atraso na divisão das células gliais de Müller, observado em NMDA+NSC (72h), mas os valores foram restabelecidos em NMDA+NSC (96h). Entretanto, a possibilidade de um completo bloqueio na proliferação após inibição de Rac1 não pode ser excluído, tendo em vista que foram realizadas apenas duas injeções do inibidor. Desta maneira, o efeito de inibição prolongada (a partir da utilização crônica deste inibidor, ou modelos animais com deleção de Rac1) sobre a proliferação de células gliais de Müller é desconhecido. De fato, alguns dados da literatura demonstram que em outros modelos há a saída do ciclo celular após deleção de Rac1 (Leone et al., 2010; Fuchs et al., 2009).

Com base em nossos resultados pode-se levantar a hipótese de que a fase do ciclo celular afetada pela inibição de Rac1 está entre G2/M. Isto, pois a entrada no ciclo celular, progressão de G1/S não foi afetada, tendo em vista a incorporação

de BrdU pelas células. Neste mesmo sentido, Moore et al. (1997) demonstraram que a expressão de dominante negativo de Rac1 por fibroblastos da linhagem Rat2 impediu a proliferação deste tipo celular, que permaneciam em G2/M. Ando et al. (2007) observaram que o bloqueio das GTPases Rho utilizando Toxina B interferiu em vários eventos associados à progressão da fase G2/M em células HeLa. Este efeito é reflexo do atraso na ativação da via cdc25-ciclinaB/Cdk1 e também na ativação de PAK, efetor de Rac1 e Cdc42. De fato, Rac1 parece ser a GTPase mais atuante neste processo, visto que a utilização do fármaco Y27632 para inibição de Rock (efetor de Rho), assim como a inibição de Cdc42 por RNAi não promoveram retardo na progressão do ciclo. Adicionalmente, outro estudo (Schmidt et al., 2007) incluiu o efetor PRK2/PKN2, que pode atuar downstream a Rac1 e Rho na transição de G2/M, também ativando cdc25 neste mesmo tipo celular.

Em nosso estudo não observamos efeito sobre a transição G1/S, como já mencionado. Entretanto, a possibilidade de Rac1 atuar nessa fase não pode ser descartada tendo em vista limitações na metodologia utilizada para inibir esta GTPase. Foi utilizado o inibidor farmacológico NSC23766, capaz de inibir competitivamente a ativação de Rac1 por dois de seus GEFs, TrioN e Tiam1 (Gao et al., 2004). Portanto, caso a dose utilizada não tenha sido suficiente é possível que ainda houvesse Rac1 disponível; entretanto, contradizendo esta sugestão observamos que mesmo utilizando maior concentração (200µM) os resultados não apresentam diferenças. Também é possível que Rac1 regulada por outros GEFs estivesse ativada. Por exemplo, em cultura de células musculares lisas da aorta de ratos foi realizado o silenciamento de 27 GEFs, entretanto, apenas o silenciamento do GEF Vav3 teve efeitos sobre a proliferação destas células. Os autores descrevem que neste modelo a proliferação induzida por soro fetal bovino (10%) tem o envolvimento do GEF Vav3, que ativa Rac1 e seu efetor Pak (Toumaniantz et al. 2010). Portanto, em nosso trabalho mesmo após utilização de NSC23766 pode haver participação de outros GEFs na ativação de Rac1. Desta maneira, seria necessária uma quantificação do grau de inibição de Rac1 por NSC23766.

Outra hipótese refere-se ao momento da administração do inibidor, 24 e 36 horas após NMDA, que pode ter sido tardia. Sabe-se que a ação de Rac1 na proliferação de outros modelos está ligada principalmente à regulação dos níveis de ciclina D ou CKIs (cyclin-dependent kinases inhibitors) - dois dos maiores determinantes da atividade de CDKs (cyclin-dependent kinases) (revisto por

Villalonga e Ridley, 2006) - e que ambos são decisivos para que as células ultrapassem a transição G1/S. Portanto, a possibilidade de que uma parte da população celular já havia ultrapassado este ponto antes da inibição de Rac1 não pode ser excluída.

Trabalhos anteriores descreveram a influência de Rac1 na proliferação utilizando V12Rac1, um mutante constitutivamente ativo capaz de induzir a proliferação de fibroblastos 3T3 quiescentes (Olson et al., 1995), bem como em células da retina neural de embriões de galinha (Peyssonaux et al., 2000). Recentemente, o sistema Cre-Lox foi utilizado para deletar Rac1 em células da crista neural de camundongos (Fuchs et al., 2009), e da zona subventricular (Leone et al., 2010). Nos dois casos houve diminuição na proliferação de células progenitoras neurais, decorrente da deleção de Rac1. Estes estudos assemelham-se aos resultados observados em nossos experimentos, visto que células de Müller após lesão por NMDA também exibem características de células progenitoras neurais com participação de Rac1 na proliferação. De fato, o trabalho de Fuchs et al. (2009) apresenta outras possíveis semelhanças com nosso estudo. Estes autores descrevem que a deleção de Rac1 em células da crista neural de camundongos tem efeitos sobre a proliferação apenas de progenitores tardios. Esta especificidade deve-se à diferença temporal na expressão do receptor de EGF (fator de crescimento epidermal), desta maneira, mediando uma transição entre a resposta mitogênica de FGF para EGF. Neste modelo o EGF estimula a proliferação via Rac1 que ativa Cdc42, outra GTPase Rho. A deleção de cada uma destas GTPases promoveu superexpressão do transcrito $p21^{Cip1}$, que culminou em diminuição na quantidade de células mitóticas e aumento na quantidade de células que saíram do ciclo celular.

Interessantemente, também em camundongos, a lesão retiniana estimulada por luz aumenta a expressão do receptor para EGF em células gliais de Müller. A partir disto, estas células tornam-se reponsivas ao EGF exógeno e proliferam (Close et al., 2006). Partindo dessa suposição, Karl et al. (2008) lesaram a retina de camundongos com NMDA e observaram que este tratamento também deixou as células gliais de Müller mais suscetíveis a proliferar após administração de EGF. Tendo em vista que: 1) Rac1 atua na proliferação de progenitores da crista neural após estímulo por EGF, 2) a proliferação de células gliais de Müller de camundongos após lesão é maximizada por administração com EGF e 3) em nosso estudo

observamos que Rac1 participa da proliferação de células gliais de Müller de aves após lesão, surge a hipótese de que Rac1 poderia agir downstream ao receptor de EGF na proliferação células gliais de Müller.

A inibição de Rac1 não altera a migração nuclear intercinética

No presente estudo, a contagem de núcleos BrdU-positivos na camada nuclear externa em relação ao total de células BrdU-positivas foi de aproximadamente 25% no grupo tratado com NMDA e de 23,7% no grupo tratado com NMDA e NSC23766, não revelando diferença entre ambos. Dados da literatura mostram que 72 horas após lesão com NMDA é possível observar marcação positiva para BrdU não apenas na camada nuclear interna, mas também na camada nuclear externa devido ao deslocamento nuclear durante a proliferação das células gliais de Müller. Este evento é considerado passo integrante da progressão do ciclo celular destas células e assemelha-se à migração nuclear intercinética observada em progenitores do sistema nervoso central, inclusive da retina (Taverna e Huttner, 2010; Baye e Link, 2008).

O tratamento com NSC23766 na zona ventricular de embriões de camundongos mostrou progressão do ciclo celular com retardo na migração nuclear intercinética destas células e bloqueio da citocinese (Minobe et al., 2009). Por sua vez, o bloqueio específico da migração nuclear intercinética (ao impedir a polimerização de actina com citocalasina B) não afetou a progressão do ciclo celular de progenitores retinianos e da zona subventricular de embriões de galinha (Murciano et al., 2002). Em conjunto, estes dados excluem a possibilidade de que o bloqueio da progressão do ciclo, após a inibição de Rac1, está relacionado a efeitos sobre o deslocamento nuclear.

A inibição de Rac1 após administração de NMDA não influencia a morte neuronal

A alteração na proliferação causada pela inibição de Rac1 aponta para uma importante função desta proteína neste processo. Entretanto, o inibidor de Rac1 foi injetado após a administração de NMDA e dados na literatura relacionam esta GTPase com morte celular (Aznar et al., 2001), inclusive em neurônios retinianos

(Haruta et al., 2009; Belmonte et al., 2006). Com os parâmetros utilizados no presente estudo não foi observada uma ação direta de Rac1 na morte de células retinianas, visto que NSC23766 não foi tóxico e aparentemente não exerceu efeito neuroprotetor após a excitotoxicidade induzida por NMDA ser iniciada. Neste mesmo sentido, a deleção de Rac1 em células da crista neural também não acarretou apoptose (Fuchs et al., 2009), assim como o tratamento crônico com NSC23766 por 60 dias não foi tóxico para nenhum dos diversos órgãos analisados, como cérebro, coração, fígado, entre outros. (Cancelas et al., 2005)

Em contrapartida, a ausência de influência de NSC23766 sobre a morte induzida por NMDA não descarta uma ação de Rac1 neste processo, visto que este resultado pode ser decorrente do momento em que o inibidor foi administrado. Fischer et al. (1998) descreveram que o início da marcação para células apoptóticas foi após 4 horas da injeção de NMDA, aumentando em quantidade ao longo do tempo e atingindo o pico após 24 horas. Desta maneira, o intervalo entre a injeção de NMDA e a injeção do inibidor (após 24 e 36 horas) foi decisivo para a indução da morte neuronal em sua totalidade. Portanto, exclui-se a possibilidade de que os efeitos observados sobre a proliferação sejam decorrentes de alterações na excitotoxicidade.

6 CONCLUSÕES

1. Após lesão com NMDA, Rac1 sofre alterações em seu padrão de expressão apenas na camada nuclear interna, decorrente da morte de células amácrinas.
2. A inibição de Rac1 24h após a injeção de NMDA não impede que células gliais de Müller entrem novamente no ciclo celular, ultrapassem a fase G1 e haja síntese de DNA.
3. Rac1 participa da progressão do ciclo celular e sua inibição retarda a mitose de células gliais de Müller.
4. A inibição de Rac1 não altera a migração nuclear de células em proliferação.
5. O efeito da inibição de Rac1 sobre a proliferação não é decorrente de alteração na excitotoxicidade por NMDA.

REFERÊNCIAS

Agathocleous M, Harris WA. From progenitors to differentiated cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:45–69.

Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that give rise to neurons and glia. *Brain Research* 1999;831:1-10.

Ando Y, Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Narumiya S. Inactivation of Rho GTPases with *Clostridium difficile* toxin B impairs centrosomal activation of Aurora-A in G2/M transition of HeLa cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(10):3752-63.

Baye LM, Link BA. Nuclear migration during retinal development. *Brain Res.* 2008;1192:29-36.

Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci.* 2007;27(26):7028-40.

Bhatia B, Singhal S, Lawrence J M, Khaw PT, Limb GA. Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res.* 2009;89(3):373-82.

Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F. p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth *Cell Cycle.* 2007;2;6(9):1053-61.

Boycot B, Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(7):1313-27.

Reichenbach A, Bringmann A. Müller cells in the healthy and diseased retina. 2010. Available from: < <http://books.google.com.br/books?id=ANfhqGSp5OsC&printsec> > [2011 Jan 11].

Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 2007;29(4):356-70.

Cajal SR. The Structure of the Retina. 1982. Available from: <<http://webvision.med.utah.edu/imageswv/CajalMuller.jpeg>>. [2008 Jun 15]

*De acordo com: International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

Cancelas JA, Lee AW, Prabhakar R, Stringer KF, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med.* 2005;11(8):886-91.

Close JL, Liu J, Gumuscu B, Reh, TA. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia* 2006;54(2):94-104.

Del Debbio CB, Balasubramanian S, Parameswaran S, Chaudhuri A, Qiu F, Ahmad I. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Müller cells in adult mammalian retina. *PLoS One.* 2010 Aug 26;5(8):e12425

Dreher Z, Robinson SR, Distler C. Müller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *J Comp Neurol.* 1992;323(1):59-80.

Dyer MA, Cepko CL. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury *Nat Neurosci.* 2000;9:873-80.

Echalier A, Endicott JA, Noble ME. Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(3):511-9.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420(6916):629-35.

Fischer AJ, Reh TA. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev Biol.* 2002;251(2):367-79.

Fischer AJ, Reh TA. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience* 2001;4:247-52.

Fischer AJ, Reh TA. Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 2003;43:70-6.

Fischer AJ, Schmidt M, Omar G, Reh TA. BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Müller glia in the retina. *Mol Cell Neurosci.* 2004;27(4):531-42.

Fischer AJ, Scott MA, Ritchey ER, Sherwood P. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia* 2009a;57(14):1538-52.

Fischer AJ, Scott MA, Tuten W. Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Müller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina. *Glia* 2009b;57(2):166-81.

Fischer AJ. Neural regeneration in the chick retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 2005;24:161–82.

Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(20):8287-92.

Fuchs S, Herzog D, Sumara G, Büchmann-Møller S, Civenni G, Wu X, Chrostek-Grashoff A, Suter U, Ricci R, Relvas JB, Brakebusch C, Sommer L. Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Cell Stem Cell* 2009;4(3):236-47.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2002;87:1433–8.

García M, Vecino E. Role of Müller glia in neuroprotection na regeneration in the retina. *Histol. Histopathol.* 2003;18:1205-18.

Ghai, K.; Zelinka, C.; Fischer, A. J. Notch signaling influences neuroprotective and proliferative properties of mature Müller glia. *J Neurosci.* 2010;(8):3101-12.

Gjoerup O, Lukas J, Bartek J, Willumsen BM. Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18812-8.

Hayes S, Nelson BR, Buckingham B, Reh TA. Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol,* 2007;312(1):300-11.

Hollborn M, Jahn K, Limb GA, Kohen L, Wiedemann P, Bringmann A. Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Muller cell line, MIO-M1 Graefes. *Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004;242:414–22.

Insua MF, Simón MV, Garelli A, de Los Santos B, Rotstein NP, Politi LE. Trophic factors and neuronal interactions regulate the cell cycle and Pax6 expression in Müller stem cells. *Journal of Neuroscience Research* 2008;86:1459–71.

Jadhav AP, Roesch K, Cepko CL. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 2009;4:249-62.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69.

Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(49):19508-13.

Koh CG. Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals.* 2006;15(5):228-37

Kolb H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2385-404.

Lamba D, Karl M, Reh T. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell* 2008;2(6):538-49.

Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigiç G, McKerracher L. Inactivation of Rho pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci.* 1999;19:7537-47.

Leone DP, Srinivasan K, Brakebusch C, McConnell SK. The rho GTPase Rac1 is required for proliferation and survival of progenitors in the developing forebrain. *Dev Neurobiol.* 2010;70(9):659-78.

Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Basic fibroblast growth factor: A potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina. *J Neurosci.* 1992;12:3968-78.

Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *TRENDS in Neuroscience* 2002;25:32-8.

Moore KA, Sethi R, Doanes AM, Johnson TM, Pracyk JB, Kirby M, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *Biochem J.* 1997;326:17-20.

Moshiri A, Close J, Reh TA. Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol.* 2004;48:1003-14.

Murciano A, Zamora J, López-Sánchez J, Frade JM. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2002;21(2):285-300.

Newman EA, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):307-12.

Newman EA. A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biology.* 2004a;1(3):245–52.

Newman EA. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 2004b;47:268–74.

Newsome TP, Schmidt S, Dietzl G, Keleman K, Asling B, Debant A, Dickson BJ. Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell.* 2000;101(3):283-94.

Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 1995;269(5228):1270-2.

Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, Takahashi M. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 2004;101(37):13654-9.

Peyssonaux C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychenne A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7068-79.

Reichenbach A, Bringmann A. Müller cells in the healthy and diseased retina. New York: Springer; 2010. 417 p.

Ruchhoeft M, Ohnuma S, McNeill L, Holt CE, Harris WA. The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by Rho family GTP-ases in vivo. *J Neurosci*. 1999;19:8454-63.

Saito KC. Excitotoxicidade na retina de pintos: possível envolvimento dos receptores de glutamato e proteínas tamponantes de cálcio na sobrevivência neuronal, [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2006.

Santos-Bredariol AS, Santos MF, Hamassaki-Britto DE. Distribution of the small molecular weight GTP-binding proteins Rac1, Cdc42, RhoA and RhoB in the developing chick retina. *J Neurocytol*. 2002;31(2):149-59.

Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 2005;11(5):400-7.

Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep*. 2010;4:243-55.

Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, Flannery, JG, Reichenbach A, Young MJ, Müller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Mol Vis*. 2009;15:1886-962.

Tanaka EM, Ferretti P Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(10):713-23.

Taverna E, Huttner WB. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*. 2010; 67(6):906-14.

Tolias KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, Weinberg RJ, Greenberg ME. The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*. 2005;45(4):525-38.

Toumaniantz G, Ferland-McCollough D, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Loirand G. The Rho protein exchange factor Vav3 regulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Cardiovasc Res*. 2010;86(1):131-40.

Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 ;58(11):1131-5.

Villalonga P, Ridley AJ. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 2006;24(3):159-64.

Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol.* 2001;11: 950-7.

Wong WT, Faulkner-Jones B, Sanes JR, Wong ROL. Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *Neurosci.* 2000;20:5024-36.

Wong WT, Wong ROL. Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr Op Neurobiol.* 2000;10:118-24.

Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Chen J, Khan T, Moon SY, Zhang B. Blockade of Rac1 activity induces G1 cell cycle arrest or apoptosis in breast cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(6):1657-68.