PALOMA GAVA KREMPEL

**Análise imunocitoquímica e de expressão gênica de
efeitos do bevacizumabe em explantes de retina de ratos
lister e em linhagem celular de glia de Müller humana**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Programa: Oftalmologia
Orientador: Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro
Co-orientadora: Dra. Monique Matsuda**

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Krempel, Paloma Gava

Análise imunocitoquímica e de expressão gênica de efeitos do bevacizumabe em
explantes de retina de ratos *lister* e linhagem celular de glia de Müller humana /

Paloma Gava Krempel. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.

Orientador: Mário Luiz Ribeiro Monteiro.

Descritores: 1.Bevacizumabe 2.Fator A de crescimento do endotélio vascular
3.Neurocam 4.Proteínas tirosinas fosfatases classe 5 semelhantes a receptores
5.Sindecana-3 6.Retina 7.Células endimogliais 8.Proteína glial fibrilar astrócita
humana 9.Vimentina 10.Caspase-3 11.Proteína Becn1 de rato

USP/FM/DBD-044/15

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Aos meus pais, Jarbas e Divani, pelo amor incondicional, paciência interminável e palavras certas e carinhosas que sempre estimulam. Vocês são meu espelho, meu orgulho e meus amores.
Por toda paciência, plenitude, calma e investimento durante os anos de desenvolvimento deste projeto. Sem vocês nada disso teria sentido.

Aos meus irmãos, Frederico e Gláucia,
pelas conversas, risadas e cumplicidade.

Aos meus sobrinhos, Thaís, Letícia e Frederico, por me mostrarem a simplicidade da vida e a minha importância em suas vidas por um sorriso e um abraço depois de algum tempo sem me ver.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro, orientador e chefe do programa de Pós-Graduação do Departamento de Oftalmologia, por ter autorizado meu ingresso no doutorado e pela orientação na publicação deste trabalho.

Á minha co-orientadora, Dr^a Monique Matsuda, pela ajuda, amizade e convívio diário.

Á minha prima, amiga e colaboradora do projeto, Dr^a Mônica Valéria Marquezini que, além de ter me ensinado muito do que sei, acolheu-me em sua casa no primeiro ano deste trabalho e me ensinou que a inteligência emocional é tão importante quanto capacidade profissional. Agradeço imensamente a orientação e a escrita deste trabalho.

Á Dr^a Odaly Toffoletto, pela ajuda na formatação da tese e análise crítica e científica dos resultados e principalmente por agregar novas visões deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Nádia Campos de Oliveira Miguel, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por sua colaboração no projeto e convivência durante este período.

Aos colegas de laboratório Renato Batista Paceli, Robson Seriani e Bryan Hudson Hossy, que compartilharam comigo os melhores anos profissionais da minha vida, contribuindo para meu crescimento intelectual.

Á Maria Paula Elias Martins, Paulinha, pelas conversas em dias difíceis e pela paciência em me escutar muitas vezes sem precisar falar.

À Regina Ferreira de Almeida, secretária da pós-graduação, pela atenção e pontualidade nas informações discentes necessárias para esta tese.

Ao Ricardo Issa, por ter me acolhido em sua casa, pela companhia e parceria nos meus momentos difíceis.

Aos laboratórios que cederam seus espaços para que pudéssemos realizar parte dos nossos experimentos: ao laboratório de Oncologia, por ter disponibilizado o aparelho de PCR *Real Time*; ao laboratório de Neurologia que, por muitos anos, nos permitiu o uso do aparelho de nanoespectrofotometria, ao laboratório de Nefrologia experimental, pelo uso irrestrito do fotodocumentador para Western Blotting e ao laboratório de Neuro-histologia e

Ultraestrutura da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, pela realização integral das reações de imunocitoquímica e análise por microscopia confocal a laser.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro por meio da bolsa de Doutorado demanda social.

Às Fundações de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, N° 2011/12271-3) e do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, N° E-26/111.777/2012) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq N°476392/2011-0 e N°306487/2011-0) pelo suporte de fomento a pesquisa para a realização deste trabalho.

SUMÁRIOS E LISTA

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Sumário	ix
Sumário de Tabelas	xii
Sumário de figuras	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xix
Abstract	xxii
1 Introdução	1
1.1 Considerações relevantes	2
1.2 Ação do VEGF e sua interação com o BVZ.....	3
1.3 O BVZ e sua influência na apoptose e autofagia	6
1.4 Microambiente da retina: papel das células de Müller	9
1.5 Proteoglicanos Neurocam e Fosfacam na retina	12
2 Justificativa.....	15
3 Objetivos	18
3.1 Gerais.....	19
3.2 Específicos	19
4 Métodos	20
4.1 Modelos experimentais.....	21
4.1.1 Linhagem celular imortalizada de glia de Müller de humano adulto	21
4.1.2 Modelo de explante de retina de ratos recém-natos.....	22
Cultura de Tecidos	22
Considerações Éticas.....	22
4.2 Metodologia	23
4.2.1 Teste Preliminar de Viabilidade Celular – Corante vital Azul de Tripan	23
4.2.2 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular – MTT	24
4.2.3 Extração de RNA total da linhagem celular MIO-M1.....	25
4.2.4 Extração de RNA total dos explantes de retinas de ratos	25
4.2.5 RT-PCR.....	26
PCR qualitativo	26
PCR em tempo real	27
Curva Padrão dos genes alvo	27

4.2.6	Imunocitoquímica para MIO-M1	31
4.2.7	Imunohistoquímica para explantes de retinas de ratos	32
	Obtenção dos cortes de retina	32
	Imunofluorescência	32
4.2.8	Western Blotting	33
4.3	Análise Estatística	34
5	Resultados	35
5.1	O BVZ manteve as células viáveis após 48 horas, como avaliado por MTT	36
5.2	Análise da expressão gênica e síntese proteica na linhagem celular e no explante de ratos <i>lister</i> recém nascidos.....	37
5.2.1	Transcrição e tradução dos genes VEGF, GFAP, VIM, BECL-1, CASP-3, fosfacam e neurocam na linhagem celular MIO-M1.....	37
	A adição de BVZ levou a um discreto aumento da transcrição de VEGF somente após 24 horas de incubação com 0,50mg.mL ⁻¹	37
	O BVZ aumentou a transcrição em 24 horas e diminuiu a proteína GFAP nas células MIO-M1.....	41
	O BVZ aumentou a transcrição da vimentina em 0,50 mg.mL ⁻¹ quando tratada por 24 horas.	45
	O BVZ diminuiu a transcrição e modulou a beclina-1 em relação ao tempo de tratamento	49
	O BVZ diminuiu a transcrição e aumentou a intensidade de marcação da caspase-3 em 12 e 24 horas de tratamento	53
	O BVZ diminuiu a transcrição do fosfacam após o tratamento com 0,50 mg.mL ⁻¹ em 24 horas.	57
	O BVZ diminuiu a transcrição e a aumentou na intensidade de marcação do neurocam após o tratamento.	61
5.2.2	Transcrição e tradução de VEGF em explante de retinas de ratos <i>Lister</i>	65
	A transcrição das isoformas de VEGF ₁₂₀ e VEGF ₁₆₄ diminuíram após tratamento com BVZ bem como sua síntese proteica	65
5.3	Resumo dos resultados	69
6	Discussão.....	73
7	Conclusão	82
8	Referências	84
9	ANEXOS	94
	ANEXO I - Sequências de <i>primers</i> humanos e números no gene bank dos mesmos usados nos experimentos de PCR em Tempo Real para a linhagem celular humana MIO-M1 e ratos <i>lister</i>	94
	ANEXO II - Tampões utilizados na técnica de Western Blotting	96
	Tampão de Extração	96

Tampão de amostra	96
Lower (pH=8,8).....	96
Upper (pH=6,8)	97
Tampão de corrida (pH=8,8)	97
Acrilamida/Bis	97
Gel SDS-PAGE 6%	97
Tampões de lavagem	98
Solução TBS 1x	98
10 APÊNDICES.....	99
ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DESTE TRABALHO	100
2012	100
2014	108

Sumário de Tabelas

Tabela 1.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do VEGF nas células MIO-M1.....	38
Tabela 2.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do VEGF nas células MIO-M1.....	38
Tabela 3.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do GFAP nas células MIO-M1.	42
Tabela 4.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do GFAP nas células MIO-M1.	42
Tabela 5.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da VIM nas células MIO-M1.	46
Tabela 6.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da VIM nas células MIO-M1.	46
Tabela 7.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da BECL-1 nas células MIO-M1.....	50
Tabela 8.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da BECL-1 nas células MIO-M1.....	50
Tabela 9.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da CASP-3 nas células MIO-M1.....	54
Tabela 10.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da CASP-3 nas células MIO-M1.....	54
Tabela 11.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do fosfacam nas células MIO-M1.	58
Tabela 12.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do fosfacam nas células MIO-M1.	58
Tabela 13.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do neurocam nas células MIO-M1.....	62
Tabela 14.	Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do neurocam nas células MIO-M1.....	62
Tabela 15.	Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição das isoformas de VEGF 120 e 164 nos explantes de retinas de ratos lister após 48 de tratamento com BVZ.....	66

Tabela 16. Estatística descritiva dos resultados de imunohistoquímica para a transcrição das isoformas de VEGF 120 e 164 nos explantes de retinas de ratos lister após 48 de tratamento com BVZ.	66
Tabela 17. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos com a linhagem celular MIO-M1 por ANOVA. (1, controle; 2, 0,25 mg.mL ⁻¹ ; 3, 0,5 mg.mL ⁻¹).	70
Tabela 18. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos com a linhagem celular MIO-M1 por teste t.	71

Sumário de figuras

Figura 1.	Vias de sinalização do VEGF.....	6
Figura 2.	Esquema da retina representando as células presentes no tecido e suas inter-relações.....	10
Figura 3.	Metabolização do MTT pelas células controle MIO-M1 após tratamento com BVZ por 12 e 24 horas.....	25
Figura 4.	Curvas padrão de PCR em tempo real da linhagem celular MIO-M1.	29
Figura 5.	Representações gráficas das curvas padrão para os explantes de retinas de ratos <i>lister</i> , controle em 48 horas, para os genes:	30
Figura 6.	Representação gráfica das médias e valores individuais obtidos após metabolização do MTT em células MIO-M1..	36
Figura 7.	Análises de VEGF nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	39
Figura 8.	Análises de GFAP nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	43
Figura 9.	Análises de VIM nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento de BVZ.....	47
Figura 10.	Análises de BECL-1 nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	51
Figura 11.	Análises de CASP-3 nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	55
Figura 12.	Análises de fosfacam nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	59
Figura 13.	Análises de neurocam nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ.....	63
Figura 14.	A. Análises de VEGF nos explantes de retinas de ratos <i>lister</i> após 48 de tratamento com BVZ.....	67
Figura 15.	Resumo da análise estatística dos resultados obtidos para a análise da expressão gênica da linhagem celular MIO-M1 em relação controle.....	72
Figura 16.	Resumo da análise estatística dos resultados obtidos para a análise de imunocitoquímica da linhagem celular MIO-M1 em relação controle.....	72

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de Variância
ARBP	Proteína Ribossômica ácida
ARVO	Associação de Pesquisa em Visão e Oftalmologia
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
BECL-1	Beclina-1
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto-2
BME	Meio basal
BSA	Albumina sérica bovina
BVZ	Bevacizumabe
CASP-3	Caspase-3
cDna	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CMF	Solução salina livre de cálcio e magnésio
CO2	Gás carbônico
CSPG	Proteoglicanos de condroitim sulfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
D-MEM	Meio de cultura Dubbeco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPG	Proteoglicanos de dermatan sulfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPR	Eptélio pigmentar da retina
FCS	Soro fetal de vitela
FDA	Administração de Drogas e Alimentos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAG	Glicosaminoglicanos

GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCL	Camada de células ganglionares
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
GNDF	Fator neurotrófico derivado de glia
HB-GAM	Molécula associada ao crescimento-ligante de heparina
HSPG	Proteoglicanos de heparam sulfato
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
LIM	Laboratório de investigações médicas
MEC	Matriz extra-celular
MIO-M1	Instituto de Oftalmologia Moorsfield-Muller ¹
MTT	Brometo de (3-(4,5-Dimetilazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio
N-CAM	Molécula de adesão neuronal
Ng-CAM	Molécula de adesão glial-neuronal
P2	Dois dias de nascimento
P7	Sete dias de nascimento
PBS	Tampão salina-fostato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PG	Proteoglicanos
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROP	Retinopatia da prematuridade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBE	Tris-borato-EDTA
TBS	Solução salina e Tris

TGF- β	Fator de crescimento transformante-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIM	Vimentina

RESUMO

Resumo

INTRODUÇÃO: As doenças retinianas associadas à neovascularização, tais como a degeneração macular relacionada à idade e as retinopatias diabética e da prematuridade são as principais e mais importantes causas da cegueira em todo o mundo. Nos últimos anos, injeções intravítreas de fármacos com ação antiangiogênica, como o bevacizumabe (BVZ), têm sido de grande valia tanto em pacientes na fase adulta quanto nos recém-natos. Todavia, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* sugerem que essas drogas promovam efeitos adversos sobre alguns processos celulares, interferindo diretamente em mecanismos fisiológicos que mantêm a homeostase do tecido retiniano, incluindo os mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular. **OBJETIVO:** investigar o efeito do BVZ nos processos de transcrição e tradução de marcadores da gliose: GFAP e vimentina, de morte celular, caspase-3 e beclina-1, e dos proteoglicanos relacionados à manutenção e desenvolvimento de tecido retiniano: neurocam, fosfacam e sindecam-3. **MÉTODOS:** Dois modelos experimentais foram usados nesse estudo: 1) linhagem celular de Müller de Glia humana adulta (MIO-M1), cultivada em meio de cultura D-MEM na presença e ausência de BVZ por 12 e 24 horas nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL e 2) explantes de retinas de ratos 2 dias pós-nascidos submetidos à 0,50 mg/mL da droga por 48 horas. Durante este período foram mantidos a 5% de dióxido de carbono à temperatura de 37°C. A análise de proteínas foi realizada por imunocitoquímica e Western Blotting e a expressão de RNAm, pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR *Real Time*). Foi utilizado o Teste de ANOVA – fator único para a comparação entre os grupos controle e tratados com BVZ de um mesmo período (12h ou 24h) e o teste t de Student para a comparação entre as mesmas concentrações de 12h e 24h, e para a comparação entre os grupos controle e tratado com BVZ dos explantes ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** Nas células MIO-M1, o BVZ, aumentou a expressão gênica e diminui a tradução de VEGF na concentração de 0,50 mg/mL em 24h comparado a 12h. Para o GFAP, houve um aumento da transcrição em 0,50 mg/mL em 24h comparado a 12h e aos outros grupos em 24h. Entretanto, houve

diminuição da tradução para estes mesmos períodos e condições. Para a vimentina, houve aumento na transcrição em 0,50 mg/mL após 24h. Os achados de beclina-1 revelaram uma diminuição da transcrição e tradução em 0,25 mg/mL em 24h comparado a 12h. A transcrição entre os grupos do mesmo período aumentou nos grupos tratados com BVZ tanto em 12h quanto em 24h. A tradução da beclina-1 diminuiu em 0,25 mg/mL, mas aumentou em 0,50 mg/mL em 24h em relação à 12h. A comparação entre os grupos de 24h revelou aumento da tradução em 0,50 mg/mL. Para a caspase-3, houve diminuição da transcrição em 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL em 24h em relação a 12h e entre os grupos tratados com BVZ em 24h. A tradução revelou um aumento em 0,50 mg/mL em 24h em relação a 12h. No fosfacam, houve diminuição da transcrição em 0,50 mg/mL em 24h comparado a 12h e entre os grupos tratados com BVZ e controles para 12h e 24h. A transcrição de neurocam diminuiu em 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL em 24h comparado a 12h e entre os grupos tratados com BVZ e controles em 12h e 24h. A tradução aumentou em 0,50 mg/mL em 24h em relação a 12h, mas diminuiu entre os grupos em 24h. Nos explantes, a transcrição e tradução de VEGF diminuíram no grupo tratado com BVZ após 48h.

CONCLUSÃO: Nossos resultados relacionados às células MIO-M1 e ao explante de ratos, *in vitro*, nos permitem aventar o possível comprometimento ocasionado pela depleção do VEGF pelo BVZ na homeostase do tecido retiniano, *in vivo*, interferindo nas moléculas envolvidas na morte e diferenciação celular e na neuroproteção em indivíduos em fase adulta e recém-nato.

Descritores: 1. Bevacizumabe 2. Fator A de crescimento do endotélio vascular 3. Neurocam 4. Proteínas tirosinas fosfatases classe 5 semelhantes a receptores 5. Sindecana-3 6. Retina 7. Células endimogliais 8. Proteína glial fibrilar astrócita humana 9. Vimentina 10. Caspase-3 11. Proteína Becn1 de rato.

SUMMARY

Abstract

BACKGROUND: Vasoproliferative retinal disorders such as age-related macular degeneration, diabetic retinopathy and retinopathy of prematurity are major causes of blindness in the world. In recent years, intravitreal injections of drugs with antiangiogenic action, as bevacizumab, have been very useful for both patients in adulthood and in newborns. However, experimental studies, *in vivo* and *in vitro*, suggest that antiangiogenic drugs may promote side effects in cellular proceedings, interfering directly in physiological mechanisms of cellular proliferation, differentiation and death. **POURPOSE:** Investigate the bevacizumab effects in transcription and translation processes of gliosis, GFAP and vimentin, cellular death markers, caspase-3 and beclin-1, and proteoglycans involved in retinal tissue maintenance and development, neurocan, phosphacan and syndecan-3. **METHODS:** Two experimental models were used on this research: cellular lineage of adult and human Müller glial cell(MIO-M1) were cultivated on D-MEM medium with 0,25 and 0,50 mg/mL bevacizumab for 12 and 24 hours, and two days old rat retinal explants submitted to 0,50 mg/mL for 48 hours. During this period were stored in laboratory ovens at 5% carbon dioxide pressure and 37 °C average temperature. Molecular techniques were used to evaluate gene expression and protein content. Protein assessments were performed by immunocytochemistry and western blotting analysis, while Real Time PCR was used to measure mRNA content. ANOVA tests one factor were applied to compare the control and BVZ groups of the same period (12h or 24h) and t test from Student to compare the same conditions of 12h and 24h, and to compare the control and BVZ retinal explants groups ($p<0.05$). **RESULTS:** At MIO-M1 cells, BVZ increased the gene expression and reduced the translation of VEGF at concentration of 0.50 mg / mL in 24 hours compared to 12 hours. For GFAP, there was an increase of transcription at 0.50 mg / mL in 24 hours compared to 12 hours and to the other groups at 24 hours. However, there was a decrease in translation for these same periods and conditions. For vimentin, there was an increase in transcription at 0.50 mg / mL after 24 hours. The beclin-1 findings revealed a decrease of transcription and

translation at 0.25 mg / ml compared at 24 h compared to 12h. Transcription among groups increased in BVZ treated groups at 12h and 24h. The translation of beclin-1 decreased at 0.25 mg / ml, but increased at 0.50 mg / mL at 24 hours compared to 12 hours. The comparison between the groups at 24h revealed an increased in translation at 0.50 mg / mL. For caspase-3, there was a decrease in transcription at 0.25 mg / ml and 0.50 mg / ml at 24 compared to 12 hours and among BVZ treated groups at 24h. Translation revealed an increase at 0.50 mg / mL at 24 hours compared to 12 hours. For fosfacam, there was a decreased in transcription at 0.50 mg / mL in 24 hours compared to 12 hours and among BVZ treated groups and controls at 12h and 24h. The transcription of neurocam decreased at 0.25 mg / ml and 0.50 mg / ml at 24 hours compared to 12 hours and among BVZ treated groups and controls at 12h and 24h. Translation increased at 0.50 mg / mL at 24 compared to 12 hours, but decreased among the groups at 24 hours. For explants, transcription and translation of VEGF decreased in the BVZ group treated after 48h. **CONCLUSION:** Our results related to the MIO-M1 cells and explants of rats, *in vitro*, allow us to suggest the possible impairment caused by depletion of VEGF by BVZ in the homeostasis of retinal tissue, *in vivo*, interfering in the molecules involved in cell death and cell differentiation and neuroprotection in individuals in adulthood and newborns.

Descriptors: 1. Bevacizumab 2. vascular endothelial growth factor A 3. neurocan 4. receptor-like protein tyrosine phosphatases class 5 5. syndecan-3 6. retina 7. ependymoglia cells 8. glial fibrillary astrocytic protein human 9. vimentin; 10. caspase-3 11. Becn1 protein, rat.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações relevantes

As doenças retinianas associadas à neovascularização, tais como a degeneração macular relacionada à idade, a retinopatia diabética e a retinopatia da prematuridade (ROP) são importantes causas de perda visual em todo o mundo ^(1, 2).

Em fases avançadas, essas afecções podem ser caracterizadas por uma sequência de eventos deletérios como hemorragia, falta de aporte sanguíneo por obstrução vascular, seguida do estímulo para a formação de novos vasos sanguíneos e eventual descolamento da retina, que podem levar à cegueira irreversível ou grave deficiência visual ^(1, 3).

Com relação ao tratamento, a administração de drogas através de injeção intravítrea tem sido uma das principais opções utilizadas para o controle de doenças vítreoretinianas, e entre estas, as drogas antiangiogênicas como o bevacizumabe (BVZ) (Avastin; Genetech Inc., São Francisco, Califórnia, E.U.A.) têm sido intensamente usadas no combate à formação de neovasos ^(4, 5).

Embora essas medicações tenham se mostrado eficazes na redução da neovascularização, tanto em estudos clínicos como experimentais ⁽⁶⁻⁸⁾, por sua ação inibidora do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), pouco se conhece sobre a sua ação molecular sobre as células da retina tanto na fase de desenvolvimento como na idade adulta.

Os possíveis efeitos adversos são particularmente importantes na utilização de antiangiogênicos em recém-nascidos com ROP, cuja retina está em desenvolvimento ou nos casos de tratamento com injeções repetidas mesmo em indivíduos adultos.

Estudos com esta abordagem demonstram a importância do VEGF não só sobre a angiogênese e desenvolvimento vascular, mas também na promoção de proliferação, diferenciação e sobrevivência dos neurônios e células da glia, os quais expressam os receptores do VEGF ^(9, 10).

Em estudo prévio avaliando os efeitos do BVZ sobre a retina de coelhos juvenis, Fusco e col., 2012⁽¹¹⁾, observaram uma redução na morte celular programada e um aumento na proliferação glial apesar da ausência de alterações clinicamente evidenciáveis.

Desta forma, a geração de informações qualificadas sobre os efeitos dos antiangiogênicos é um requisito fundamental para a elaboração de novos medicamentos e sua utilização criteriosa de tal forma a obter maior eficácia com menores efeitos colaterais possibilitando a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Estudos moleculares são, portanto, necessários para determinar quais as principais alterações gênicas e proteicas causadas pelo tratamento para melhor compreender o seu modo de ação e dar suporte a estratégias que minimizem os efeitos deletérios.

1.2 Ação do VEGF e sua interação com o BVZ

Sabe-se que a angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos e ocorre fisiologicamente durante o crescimento embrionário, a cicatrização de ferimentos ou em situações patológicas na idade adulta⁽¹²⁾.

Neste último cenário, o VEGF tem sido considerado o principal indutor da angiogênese na retina, atuando na proliferação de vasos sanguíneos, bem como exercendo efeitos sobre vários tipos celulares, como por exemplo, na migração e modulação de monócitos/macrófagos e de neurônios⁽¹²⁾, atuando na neuroproteção⁽¹³⁾, na proliferação das células gliais e no crescimento de neuritos⁽¹⁴⁾.

Os diversos tipos de VEGF, originados a partir de *splicing* alternativo ou clivagem proteolítica, são caracterizados por interação receptor-específico com a matriz extracelular (MEC). Estas isoformas são conhecidas por darem origem a um espectro de padrões de angiogênese marcado por diferenças na ramificação dos vasos, o que tem implicações funcionais nos tecidos⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

A família de VEGF engloba as isoformas A, B, C, D, e fator de crescimento placentário (PlGF), sendo o VEGF-A a isoforma estudada neste trabalho. O VEGF é traduzido em inúmeras isoformas, onde as mais presentes em humanos são VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉, e em ratos, VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Estas isoformas apresentam diferenças nas suas

propriedades bioquímicas, tais como as suas afinidades para os receptores do VEGF e proteoglicanos de sulfato de heparam (HSPGs), resultando em efeitos diferentes sobre o crescimento dos vasos ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Os VEGFs se ligam de forma seletiva com afinidades diferentes a pelo menos cinco receptores distintos (VEGFR): receptor-1, VEGFR-1 ou Flt-1; receptor-2, VEGFR-2, KDR ou Flk-1; receptor-3, VEGFR-3 ou Flt-4, neuropilina-1 e -2. Os VEGFRs são membros da superfamília dos receptores tirosina quinase e a sua ligação aos domínios extracelulares induz a dimerização dos receptores ^(16, 17).

O VEGFR-2 é o receptor responsável por mediar os efeitos angiogênicos. O papel do VEGFR-1 na angiogênese permanece controverso, uma vez que sua ativação demonstra tanto estimular quanto suprimir a angiogênese. O VEGFR-1 solúvel inibe a angiogênese retiniana, VEGFR-3 é altamente expresso nas ramificações angiogênicas, e assim como o VEGFR-2, sua sinalização media a angiogênese. As neuropilinas são receptores específicos para VEGF-A₁₆₅, PlGF e VEGF-B e formam complexos de receptores com VEGFRs ⁽¹⁶⁾.

Em situações normais e saudáveis, as isoformas de VEGF são sequestradas por HSPGs da MEC e estão sujeitas às ações de vários inibidores de VEGF e envolvidas na quiescência vascular ⁽¹⁶⁾.

Durante a inflamação e a tumorigênese, o VEGF sequestrado pode ser liberado por proteases, como as metaloproteinases de matriz dependentes de zinco (MMPs). Sabemos que as proteases extracelulares podem agir na clivagem da MEC, dos inibidores solúveis e gerar novas isoformas do VEGF, conduzindo a diferentes resultados biológicos ⁽¹⁵⁾.

O VEGF tem um papel chave na formação dos vasos sanguíneos fisiológicos e patológicos durante a angiogênese, crescimento de tumores e doenças isquêmicas. A hipóxia é um potente indutor de VEGF *in vitro*. O aumento de VEGF solúvel durante a hipóxia é devido a sua taxa de transcrição que é mediada pela ligação do fator indutor de hipóxia-1, HIF-1, ao seu fator de transcrição, PAS, que interage com o receptor translocador nuclear A, ARNT ⁽¹⁸⁾.

A proteína Hu antígeno R, Hur, se liga com alta afinidade e especificidade com o segmento regulatório de VEGF, VRS, que regula a estabilidade do RNAm. Além disso, um

local de entrada de ribossomo interno (IRES) assegura a tradução de maneira eficiente do RNAm, mesmo em condições de hipóxia. A proteína supressora de tumor, VHL, (von Hippel-Lindau) regula também a expressão de VEGF em um nível pós-transcricional, degradando o RNAm (figura. 1A) ⁽¹⁹⁾.

Uma vez traduzido, o VEGF fica livre na MEC disponível para desenvolver suas atividades biológicas. A ligação com seus receptores específicos vão desencadear vias de sinalização relacionadas aos múltiplos passos essenciais da angiogênese, como sobrevivência, migração, proliferação celular, rearranjo do citoesqueleto e vasopermeabilidade, figura 1B ⁽¹²⁾.

Figura 1. Vias de sinalização do VEGF. A sinalização mais relevante para a angiogênese é mediada através do receptor VEGFR-2 ou KDR. A ativação do receptor ocorre pela dimerização induzida por VEGF seguida da autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina no domínio intracelular desencadeando, na célula, vários eventos relacionados à angiogênese. Adaptado de http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_vegfPathway.php, acessado em 14 de janeiro de 2015⁽²⁰⁾.

Como mencionado anteriormente, o BVZ é capaz de se associar ao VEGF, impedindo a sua ligação com os seus receptores dispostos na superfície celular das células alvo deste pró-angiogênico⁽⁵⁾.

Entretanto, a neutralização do VEGF pelo BVZ diminui a oferta deste fator de crescimento para os neurônios que, supridos desta citocina essencial para a neurogênese, neuroproteção e crescimento glial, podem comprometer a fisiologia do tecido^(4, 5, 13, 14, 21).

Sendo assim, os estudos mostram claramente que, se por um lado o BVZ tem impacto positivo no tratamento por inibir a neovascularização, por outro pode interferir em funções vitais importantes para a manutenção e sobrevivência das células retinianas.

Para o melhor entendimento dos processos celulares, tornam-se cada vez mais necessários estudos que possam avaliar o efeito das drogas antiangiogênicas sobre o microambiente da retina de tal forma a melhor compreender e possibilitar maior chance de sucesso terapêutico⁽²²⁾.

1.3 O BVZ e sua influência na apoptose e autofagia

Nos últimos anos tem ocorrido uma intensa investigação a respeito de drogas antiangiogênicas no combate à formação de neovasos nas doenças vasculares, processo conhecido como neoangiogênese. Entre estas drogas, o BVZ, mostrou eficácia considerável na resposta ao tratamento de pacientes com câncer metastático de colorretal^(5, 13) e posteriormente nas doenças crônicas oculares que cursam com neovascularização, passando a ser usado como medicamento de escolha em várias doenças retinianas em adultos e recém-natos^(2, 4).

Comercialmente conhecido como Avastin®, o BVZ é uma droga capaz de prevenir de forma eficaz as várias etapas do processo angiogênico, atuando na inibição de todas as isoformas do VEGF⁽⁵⁾. A administração por via intravítrea passou a ser utilizada de forma *off*

label, já que sua aprovação foi solicitada e obtida no FDA (*Food and Drug Administration*) americano para tratamento de diversos cânceres^(8, 23).

O BVZ é um anticorpo monoclonal humanizado com peso molecular de 149 kDa desenvolvido em camundongos que demonstrou alta afinidade por todas as isoformas de VEGF-A e alta capacidade de inibição de crescimento tumoral em humanos⁽⁵⁾. Os anticorpos humanizados consistem em moléculas quiméricas com regiões constantes de imunoglobulinas humanas fusionadas às regiões variáveis dos anticorpos murinos produzidos pelo hibridoma. A estratégia da humanização envolve a substituição progressiva das sequências murinas por sequências humanas homólogas, visando ter moléculas com maior número de resíduos humanos^(24, 25).

Modelos de ratos são, muitas vezes, indispensáveis para compreender a biologia de muitas doenças. Liang e col., 2006⁽²⁶⁾, demonstraram que o bloqueio do VEGF pelo BVZ numa fase precoce de tumorigênese foi suficiente para inibir sua progressão e, assim, a sua aplicação foi validada para avaliar o papel do VEGF em diferentes modelos de xenoenxertos.

Apesar dos relatos observados sobre a relação do uso do BVZ na prática clínica, poucos estudos ainda esclarecem as alterações moleculares induzidas por drogas antiangiogênicas, haja vista, que estas podem interferir nos processos de neovascularização, neurogênese, ou mesmo na retina do paciente adulto em tratamento continuado por longo prazo^(11, 27).

Pesquisas clínicas apontam para o sucesso do emprego destas drogas, demonstrando que os pacientes podem contemplar uma diminuição da ocorrência de hemorragia ocular e a melhora da acuidade visual, principalmente no início do tratamento e por curtos períodos de tempo^(6, 7, 28, 29). Em estudos experimentais, a injeção intravítrea mostrou-se capaz de inibir a permeabilidade vascular e a neovascularização coroidal na retina de modelos animais^(8, 30).

Outros estudos começam a sinalizar importantes efeitos adversos no decorrer do tratamento de pacientes, principalmente quando injeções repetidas são realizadas. Observaram-se, nesses casos, efeitos adversos após várias sessões de aplicações intravítrea com o BVZ, como inflamações, oclusão arterial, extravasamento vascular ou descolamento da retina, especialmente nos casos de retinopatia diabética proliferativa⁽³¹⁻³⁶⁾.

O BVZ parece ser bem tolerado durante o primeiro ano de tratamento ⁽⁶⁾, o que sugere que critérios para o seu uso devam ser melhores definidos e que em determinados estágios, da patogênese do tecido retiniano ou em certas etapas do tratamento clínico, o seu uso deve ser investigado e melhor compreendido.

Como permanecem dúvidas a respeito do seu uso, acredita-se que o estudo de biomarcadores possa elucidar, ou até mesmo discriminar, o uso do BVZ na conduta terapêutica desses pacientes.

Paralelamente ao que ocorre com os estudos clínicos, os experimentais divergem quanto aos efeitos do BVZ sobre a retina. Apesar de demonstrado na literatura que a neutralização do VEGF pelo BVZ não causa danos na permeabilidade ou perfusão vascular observa-se em outros estudos, intensa morte celular nas camadas nuclear interna e externa, bem como em outros tipos celulares da retina ^(8, 10, 23, 37, 38).

Recentemente, demonstrou-se que as células gliais de Müller expressam receptores para o fator de crescimento VEGF e sofrem apoptose quando este é neutralizado, evidenciando um papel autócrino das células gliais em modelo animal ⁽¹⁰⁾. Além disso, sugere-se que o BVZ prejudica moderadamente a proliferação celular e altera a função fagocítica do epitélio pigmentar da retina (EPR), produzindo efeitos na permeabilidade ou seletividade do EPR ⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

Os eventos celulares de proliferação, diferenciação, migração celular, crescimento axonal-dendrítico e morte celular programada são processos fundamentais na geração do sistema nervoso e, por isso, estudados intensamente durante o desenvolvimento neural ⁽⁴²⁾.

Dois principais aspectos de morte celular programada extensamente descritos na literatura são apoptose, evidenciada pela expressão das proteínas caspase-3 (CASP-3) e caspase-9 e autofagia, e pela beclina-1 (BECL-1) ⁽⁴³⁾. Ambos os processos estão intimamente ligados e sabe-se que o controle e a regulação desses eventos apoptóticos mitocondriais ocorre por meio dos membros da família de proteínas BCL-2 (*B cell lymphoma protein 2*) ^(44, 45).

A apoptose é amplamente estudada por grupos que avaliam a segurança e toxicidade do BVZ na retina, seja por estudos de fragmentação de DNA (TUNEL) ou pela expressão

gênica e imunomarcção das caspase-3 e caspase-9^(36, 46-51). Estes estudos reforam o papel neuroprotetor do VEGF no ambiente retiniano, que estimula a produao de BCL-2, proteína anti-apoptótica⁽⁵²⁻⁵⁵⁾.

A autofagia ou macroautofagia é a única via intracelular para a degradação em massa e reciclagem de proteínas de longa duração e organelas citoplasmática, sendo essencial para a viabilidade celular⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾.

Indiscutivelmente, a beclina-1 é requisitada para a autofagia e a BCL-2 regula a apoptose. A relação entre autofagia e morte celular, principalmente a apoptose dirigida por BCL-2, tem sido motivo de intensos estudos durante os últimos anos^(60, 61).

1.4 Microambiente da retina: papel das células de Müller

A retina é composta tanto por células neuronais quanto por células da glia e pela matriz extracelular (MEC), figura 2. A glia é composta por células de Müller, de Schwann, astrócitos e oligodendrócitos. Este arcabouço complexo, que é a MEC, é sede de inúmeros processos celulares, os quais são importantes pelo fornecimento do suporte estrutural aos neurônios, pela sinalização para a produção e distribuição de citocinas e fatores de crescimento para a manutenção e sobrevivência dos diversos tipos celulares presentes, bem como manter a homeostase iônica deste órgão^(62, 63).

Figura 2. Esquema da retina representando as células presentes no tecido e suas inter-relações. A retina é dividida em camadas de células com atividades distintas. São elas: camada pigmentar, camada de bastonetes e cones que se projeta na camada pigmentar, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada ganglionar, camada fibrosa do nervo óptico e membrana limitante interna. A célula de Muller comunica-se com todas as células das diferentes camadas devido a sua disposição radial. <http://www.infoescola.com/visao/retina/> acessado em 10/07/2014.

No que se refere às células gliais, se por décadas esse tipo celular não recebeu a devida atenção dos pesquisadores em todo o mundo, recentemente acredita-se que são mais numerosas do que os neurônios e estão envolvidas em quase todas as funções neurais devido à sua abrangência por toda a camada retiniana ⁽⁶³⁾.

Outros estudos atuais indicam que a glia também tem um papel regulador nas conexões sinápticas entre os neurônios, e que essas células não-neuronais enviam mensagens entre si, gerando uma interdependência dos neurônios para se comunicarem. Os relatos indicam que a glia está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo cerebral uma vez que emite sinalização por meio de neurotransmissores ^(62, 63).

A célula de Muller é o principal tipo glial na retina de vertebrado adulta e está localizada ao longo da espessura da retina interna. Possui papéis reguladores não só pela sua

morfologia, como também pela função secretora na síntese de fatores angiogênicos como o VEGF, além de modular respostas inflamatórias e imunológicas sob condições patológicas⁽⁶⁴⁾.

Neste cenário, o dano ao tecido retiniano induz as células de Müller à divisão celular assimétrica e dão origem às células progenitoras que migram para a retina no local da lesão onde se diferenciam e proliferam⁽⁶⁵⁾.

A denominação para este processo é a gliose, uma resposta desencadeada para toda alteração patológica que acomete a retina. Os marcadores celulares para o processo de gliose na retina é a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês “*glial fibrillary acidic protein*”) e a vimentina⁽⁶⁴⁾.

Segundo os estudos prévios na literatura, um aumento de expressão de GFAP em células de Muller foi observado na retina *in vivo* após a injeção intravítrea de BVZ em alta concentração, sendo que nenhuma evidência de toxicidade nos modelos animais foi observada⁽¹¹⁾.

A superexpressão inicial de GFAP nas células de glia de Müller frente à presença de BVZ pode ser comparada a uma “tentativa” de neuroproteção com o reparo da lesão através da liberação de fatores neurotróficos, na degradação de citocinas e de glutamato e na conversão para glutathione⁽⁶⁶⁾.

A vimentina (VIM) é expressa em processos das células gliais de Müller e em astrócitos retinianos desde estágios precoces após o nascimento até a idade adulta⁽⁶⁷⁾. O aumento da VIM e a supressão da expressão do gene do GFAP observados no estudo de Miguel e col., 2012, sugerem que o BVZ provoca atraso na maturação das células gliais do rato recém-nascido⁽²⁷⁾.

Com o decorrer do tempo, no entanto, a gliose interfere na habilidade das células Muller em manter a homeostase do meio extracelular retiniano⁽⁶⁸⁾, alterando o metabolismo neuroquímico e resultando na morte dos neurônios⁽⁶⁹⁾.

Esta constante comunicação entre as células gliais, neuronais e da coróide (vasculares) em busca da homeostase para o tecido se estabelece por interações de moléculas de adesão e MEC. O microambiente que se cria e as interações célula-célula e

célula-matriz desencadeiam vias sinalizadoras que estimulam o crescimento, a angiogênese e a produção de fatores anti-apoptóticos, todos envolvidos na manutenção e sobrevivência das células neuronais⁽⁷⁰⁾.

Entre as moléculas de adesão e de MEC participantes na manutenção da homeostase do tecido retiniano foi evidenciada a expressão dos membros da família dos proteoglicanos que tem sido considerada como imprescindível na proliferação, migração e morfogênese das células endoteliais, neuronais e não-neuronais⁽⁷¹⁾.

Os proteoglicanos mais abundantes no sistema nervoso central são heparan e condroitim sulfatados que estão, principalmente, relacionados ao processo de neovascularização e modulação do crescimento do neurito, respectivamente⁽⁷¹⁻⁸⁰⁾.

1.5 Proteoglicanos Neurocam e Fosfacam na retina

Muitos PGs de MEC e de superfície celular estão sendo identificados no tecido nervoso e vêm se destacando em funções como: interações célula-célula, célula-MEC, proliferação e diferenciação celular, indicando um envolvimento na neurogênese, neuroproteção e orientação para migração celular e dentre os de MEC destacamos o neurocam e o fosfacam^(72, 77, 79, 81).

Os proteoglicanos (PGs) são complexos macromolecular de múltiplas funcionalidades, constituídos por glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados ligados covalentemente ao seu corpo proteico central. Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares não-ramificados de peso molecular elevado, formado por repetidas unidades dissacarídeas. Possuem numerosos grupos carboxila e sulfato em suas moléculas, os GAGs são poliânions, e ligam-se por eletrovalência a elevado número de cátions que, por sua vez, atraem moléculas de água. Os principais tipos de GAGs que compõem os proteoglicanos são, condroitim sulfato, heparan sulfato, dermatam sulfato e queratam sulfato e por isso são chamados de proteocondroitim sulfato (CSPG) e assim, sucessivamente, para os demais^(82, 83).

Por sua hidratação e devido à sua ampla localização, eles têm um papel de destaque na manutenção da integridade estrutural dos tecidos conjuntivos, nos processos dinâmicos

de adesão, mobilidade/migração celular e também nos mecanismos de diferenciação e morfogênese, pois têm grande afinidade o pelos fatores de crescimento, em geral ^(81, 82, 84).

A MEC é um complexo supramolecular que constitui um veículo para a passagem de células, moléculas hidrossolúveis e íons diversos e essa matriz é formada por GAGs, PGs, glicoproteínas adesivas, fatores de crescimento e fibras e fibrilas colágenas e elásticas ⁽⁸⁵⁾.

Inicialmente os PGs eram classificados com base na composição dos GAGs e nas últimas décadas, com o avanço das metodologias de biologia molecular, a classificação passou a ser feita baseando-se na composição do seu corpo proteico ou na localização destas macromoléculas no tecido ⁽⁸⁶⁾.

Uma imensa variedade dessas moléculas, com estruturas constituídas de diferentes esqueletos proteicos e de diferentes classes, tamanhos, números e tipos de GAGs, certamente contribui para as distintas funções biológicas atribuídas a estes complexos. A interação destes PGs com moléculas específicas da MEC de cada um dos tecidos de que fazem parte, modula qualitativa e quantitativamente essas funções. Assim, a atividade de cada uma está relacionada não só com a sua estrutura molecular, mas também com sua localização ⁽⁸⁰⁾.

Com base neste último aspecto, os PGs são classificados em extracelulares (ou de matriz extracelular), de superfície celular e intracelular ⁽⁸⁷⁾. Os CSPG de MEC estão presentes principalmente em cartilagem e tecido ósseo e formam uma família de moléculas chamadas lecticana, que incluem o agrecam, versicam, brevicam, neurocam e fosfacam ^(73, 75, 76).

O VEGF é o principal fator de crescimento mediador da angiogênese e também está envolvido na manutenção das células neuronais e epiteliais da retina ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Estudos mostram que a atividade do VEGF requer a presença de HSPGs de superfície celular e MEC para sua atuação, via seus ligantes de heparina ^(72, 80, 81). Com respaldo em todos esses achados, acredita-se que os HSPGs sejam importantes não apenas no processo da neoangiogênese, como também nos mecanismos de proliferação e diferenciação das células de Müller e dos neurônios da retina.

O sindecam-3 (SDC-3) é um HSPG de superfície celular diretamente ligado ao desenvolvimento neurito, agindo como co-receptor para moléculas promotoras do

crescimento do neurito associadas à MEC (HB-GAM, *heparin-binding growth-associated molecule*, ou pleiotropina) mediada pelas cadeias de heparam sulfato presentes nos GAGs deste HSPG^(88, 89).

Estudos recentes têm demonstrado o papel fundamental dos HSPGs para a integridade estrutural e funcional do endotélio. Os HSPGs situados na porção basal dos vasos sanguíneos agem como receptores interagindo com várias proteínas da MEC, estando envolvidos no controle da angiogênese, na diferenciação e sobrevivência celular^(84, 90).

In vitro e *in vivo*, as células do tecido retiniano secretam predominantemente CSPG e DSPG para a MEC e HSPG para a membrana plasmática⁽⁷¹⁻⁷³⁾. O papel dos PGs na retina é importante para manter a homeostase do tecido neural, na qual as conexões neuronais devem estar estabelecidas. Para isso, os axônios são guiados por quimiocinas liberadas por moléculas da superfície de células neuronais e não-neuronais ou ainda na MEC, capazes de promover ou bloquear o crescimento do axônio ou neurito⁽⁸²⁾.

Os PGs têm a habilidade de promover e/ou bloquear a extensão do axônio, interferir na concentração de moléculas no meio e no tipo de neurônio que o PG está interagindo. Os HSPG são comumente associados à neuritogênese, ao contrário dos CSPG e DSPG que, *in vitro*, bloqueiam o crescimento dos neuritos; porém o contrário já foi relatado também⁽⁸²⁾.

O neurocam e fosfacam são os PG mais expressos no tecido neural durante o desenvolvimento. A expressão desses PG é detectável em níveis embrionários, tendo seu pico de expressão em 7 dias de nascimento e depois começam a decair a níveis imperceptíveis na idade adulta. Nesta fase, esses CSPG voltam a se expressar em condições patológicas, como em eventos isquêmicos, para inibir a comunicação de células afetadas com células sadias via moléculas de adesão neurônio-glia e neuronal^(82, 83, 91).

Até o momento, existe um trabalho evidenciando a influência do BVZ nestes PG. O nosso grupo⁽¹¹⁾ demonstrou que o BVZ tem um papel regulador tanto na transcrição quanto na tradução do neurocam em retinas de ratos prematuros, *in vivo*, e sugerimos que o desenvolvimento do tecido retiniano nestas condições pode estar comprometido, o que já tinha sido proposto por Miguel e col., 2012⁽²⁷⁾.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Como já descrito, a retina é composta tanto por células neuronais quanto por células da glia e MEC, imprescindíveis para a manutenção e sobrevivência do tecido retiniano, bem como para manter a homeostase iônica deste tecido.

O BVZ é um monoclonal “anti-VEGF” que apesar do seu uso, em cânceres e tratamento das retinopatias, há dúvidas em relação ao comprometimento dessa droga na retina, pois são poucos os relatos sobre sua atuação no que se refere, principalmente, aos processos de desenvolvimento e manutenção das células da retina.

Há uma preocupação eminente com o uso contínuo desta medicação que, apesar da sua eficácia no controle da neoangiogênese, pode levar a complicações para a retina como, por exemplo, a gliose.

Estudos com esta abordagem demonstram a importância do VEGF, não só, sobre a angiogênese e desenvolvimento vascular, mas também na promoção de proliferação, diferenciação e sobrevivência dos neurônios e células da glia, os quais expressam os receptores do VEGF ^(9, 10).

Sabemos que a homeostase iônica na retina é mantida pelo complexo supramolecular da MEC onde os PGs tem um papel de destaque, uma vez que estão associados aos processos de desenvolvimento e manutenção celular.

Recentemente, publicamos e fomos premiados em dois estudos em explantes de retinas de ratos *lister* tratados com 0,50 mg/mL de BVZ por 48 horas *in vitro*, que mostrou, que embora, não tenham alterações na morte celular, foi evidenciado uma diminuição significativa de neurocam e de GFAP e também um aumento importante na síntese da proteína vimentina, o que sugere uma interferência específica na diferenciação da glia nas retinas em desenvolvimento ^(27, 92).

Com base no exposto, entendemos que é essencial compreender os efeitos de drogas antiangiogênicas, como o BVZ, nas células gliais da retina, pois não há relatos sobre seus efeitos na expressão e síntese dos PGs da retina, fosfacam e neurocam, o que pode ser

relevante, uma vez que está bem estabelecida a relação dessas macromoléculas com o processo de angiogênese, desenvolvimento neuronal e homeostase da retina.

Baseado nos resultados do nosso grupo e também na literatura, acreditamos que o estudo em linhagem de células de Muller com o tratamento pelo BVZ seja uma ferramenta importante para pesquisas translacionais. Obter dados mais específicos sobre a resposta direta deste tipo celular em relação ao uso do BVZ e se haverá alguma ação de supressão ou superexpressão dos marcadores relacionados ao aumento da glia e homeostase do tecido retiniano pode ser um caminho relevante para novas abordagens terapêuticas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Estudar os efeitos do BVZ, de maneira distinta, avaliando se há supressão ou superexpressão dos marcadores de gliose, morte celular, estruturais de MEC e angiogênese nas células de Müller na linhagem MIO-M1 e na cultura de tecido organotípica de explantes de retina em desenvolvimento de ratos *Lister*, recém-nascidos.

3.2 Específicos

1. Nas células da linhagem MIO-M1: Investigar se a depleção do VEGF pelo BVZ é tempo dependente quando tratado por diferentes concentrações e como essa depleção se comporta frente a transcrições e traduções dos marcadores de gliose (GFAP e VIM), morte celular (BECL-1 e CASP-3), estruturais de MEC (fosfacam e neurocam) e angiogênese (VEGF); e
2. Analisar a transcrição e tradução do VEGF, como fator controle dessa depleção, nas células MIO-M1 e nos explantes de retinas de ratos *Lister* recém-nascidos.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

Os experimentos com cultura de células, extração de RNA, síntese de cDNA e Western Blotting foram executados no Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia – LIM33 da Faculdade de Medicina da USP.

4.1 Modelos experimentais

4.1.1 Linhagem celular imortalizada de glia de Müller de humano adulto

A linhagem celular usada neste estudo, MIO-M1 (*Muller 1, Moorfields Institute of Ophthalmology*), foi gentilmente cedida pela Dra. G. Astrid Limb do Instituto de Oftalmologia da Universidade de Londres (*University College London, Londres, Grã-Bretanha*)⁽⁶⁶⁾. São células de Müller isoladas e imortalizadas de glia adulta e humana, com características de células tronco, que foram cultivadas sob condições ótimas para seu desenvolvimento. As células foram cultivadas em frascos para cultura com dimensão de 25 cm³ (TPP, Switzerland) contendo meio de cultura Dubecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO BRL), 3,7 g de Bicarbonato de sódio/L, 100 µg/mL de Piruvato de Sódio, 25 mM Hepes/L (todos adquiridos da Sigma-Aldrich) e 1 µg/mL de Penicilina e Estreptomicina (GIBCO BRL). O meio de cultura foi substituído por meio novo a cada 3 ou 4 dias. Foram incubadas na estufa a 37°C e a CO₂ 5% por todo o período de experimentos. O fármaco BVZ foi acrescido nas concentrações e tempos determinados por testes de viabilidade celular – MTT. A condição controle conteve apenas o meio de cultura sem o BVZ.

Para definir as concentrações de BVZ e os tempos de incubação utilizados no estudo, foram executados ensaios iniciais com as concentrações de 0,25 mg/mL a 2 mg/mL de BVZ incubados por períodos de 12, 24, 48 e 72 horas em 1x10⁶ células. O critério de escolha das concentrações foi feito com base na viabilidade celular de, no mínimo, 60% (correspondendo cerca de 6x10⁵ células por frasco) para cada concentração e período. A

viabilidade acima de 60% permite que haja um número mínimo de células para a execução dos experimentos.

4.1.2 Modelo de explante de retina de ratos recém-natos

Foram utilizados 30 ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Lister hooded* recém-nascidos (2 dias de idade) e pesando, em média, 10 g. As matrizes foram mantidas sob um ciclo claro / escuro 12/12 horas, com livre acesso à água e comida (no caso, amamentação).

✓ Cultura de Tecidos

Explantos da retina foram preparados como descrito primeira e anteriormente por Linden e col. em 2003⁽⁹³⁾. Os animais, no 2º dia pós-natal (P2) foram sacrificados através da utilização de anestesia profunda com uma mistura éter/água (1:1). Em seguida, os olhos foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF), onde as retinas foram dissecadas e cortadas com auxílio de bisturi (lâmina nº 15), em explantes de aproximadamente 1 mm²⁽⁹³⁾. Estes foram transferidos para Erlenmeyers contendo 3 mL de meio de cultura basal completo (BME 5 % de FCS; glutamina 2 mM, penicilina-G 100 U/mL e sulfato de estreptomicina 100 µg/mL). Após um período de 4 horas, alguns explantes foram fixados para serem utilizados como controle e outros receberam meio de cultura completo com a droga ser testada.

Os frascos foram mantidos em um agitador orbital a 80-90 rotações/min e 37 °C por 48 horas. No grupo experimental foi adicionado 60 µL (1,5 mg ou 0.5 mg/mL) de solução de BVZ, a mesma dose é normalmente utilizada para tratar retinopatia da prematuridade (ROP)⁽⁹⁴⁾. Em seguida, estes explantes foram fixados para análise morfológica a qual incluiu microscopia óptica de rotina e imunohistoquímica para os marcadores de proliferação, morte celular e diferenciação da retina, bem como para os proteoglicanos e fator de crescimento.

Parte dos explantes submetidos aos experimentos com e sem BVZ foi destinada às análises de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e para a quantificação das proteínas por Western Blotting dos mesmos marcadores, proteoglicanos e fatores de crescimento.

✓ Considerações Éticas

Todos os animais foram tratados segundo as normas estabelecidas pela ARVO (*Statement for the use of animals in ophtalmic and vision research*) e pela Comissão de Ética com Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (CEUA-CCS) Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.2 Metodologia

4.2.1 Teste Preliminar de Viabilidade Celular – Corante vital Azul de Tripán

Para estabelecer concentrações e tempos ideais de exposição ao BVZ sem que haja perda celular significativa por toxicidade à droga, realizamos um ensaio-piloto para viabilidade celular com 0,25 mg/ml a 2,0 mg/ml de BVZ em 24, 48 e 72 horas por azul de Tripán. Foi definido como controle, o as células não cultivadas com a droga em seu meio de cultura. O critério de escolha foi baseado com base na viabilidade celular de, no mínimo, 60% (correspondendo cerca de 6×10^5 células por frasco) para todas as concentrações e períodos. A viabilidade acima de 60% permite que haja um número mínimo de células para a execução dos experimentos de extração de RNA e imunofluorescência.

Após o período de incubação, o meio de cultura do frasco foi substituído por 3 mL de Tripsina-EDTA 0.5% (GIBCO BRL) por aproximadamente 3 minutos para desprender as células do fundo do frasco de cultura. Terminado este tempo, foi adicionado 3 mL de DMEM suplementado com 10% SFB para de neutralizar a tripsina que, após 10 minutos, tem ação citotóxica. O total de 6 mL foi transferido para tubo Falcon de 15mL (TPP) estéril e este foi submetido à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos para decantar as células e deixar no sobrenadante o que é desprezível. Após a remoção deste sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 1 mL de DMEM. 10 μ L desta solução contendo células foram diluídos na proporção 1:1 com o corante vital Azul de Tripán 4% (Invitrogen) e então contadas na câmara de Neubauer. Esta contagem não foi excedida de 5 minutos após a diluição, conforme instruções do fabricante. Em um microscópio óptico de campo claro (Nikon, modelo TS-100), sob aumento de 100x, foram contadas as células dos quatro quadrantes laterais, inclusive as que estavam nas linhas delimitantes dos mesmos. As células que estavam coradas em azul e com bordas refringentes foram consideradas mortas. Foi

realizada média aritmética desta contagem e o resultado foi então multiplicado por 10 (volume da solução, em μL , que foi utilizado na câmara), fator de diluição com o azul de tripan que, neste caso foi 2 e por 10^3 , correspondente à área, em mm^3 , da mesma. A contagem foi feita em duplicata em teste duplo cego, a fim de evitar tendências na segunda leitura.

4.2.2 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular – MTT

Baseado nos resultados do ensaio-piloto com azul de tripan (dados não mostrados) foi realizado teste de viabilidade celular mais preciso e com maiores concentrações da droga em questão.

As células dos frascos de cultura foram transferidas para placas de 96 poços (TPP), na concentração de 5×10^3 células em 100 μL de DMEM suplementado. Após 48 horas para adesão celular, foi adicionado BVZ (exceto nos controles) nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL por 12 e 24 horas. A viabilidade celular foi então avaliada nos diferentes grupos pelo ensaio colorimétrico MTT, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio](Sigma-Aldrich), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis⁽⁹⁵⁾. Alíquotas de 10 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL diluídas em tampão fosfato salina (PBS) foi adicionado ao meio e incubado por 3 horas, período suficiente para que a célula metabolize o MTT, formando cristais intracelulares macroscopicamente visíveis pela notável coloração roxa (Figura 3). A placa foi vertida rapidamente sobre uma superfície absorvente para a retirada do meio DMEM e então foram acrescentados 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO, Invitrogen), agitado por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, foi feita a leitura em absorbância de 570 nm no leitor de ELISA modelo Expectamax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)⁽⁹⁶⁾. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e o DMSO também teve sua absorbância captada para descontar esse valor do obtido nas leituras das amostras. Os valores absolutos obtidos da densidade óptica foram convertidos em porcentagem e os controles foram considerados 100% de células viáveis.

Figura 3. Metabolização do MTT pelas células controle MIO-M1 após tratamento com BVZ por 12 e 24 horas nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg.mL⁻¹. À esquerda, no tempo 0 (t=0) da adição do MTT ao meio de cultura e, à direita, após 3 horas (t=3 h) da adição. Nota-se a presença de cristais de formazan sintetizados pela metabolização do MTT pelas enzimas mitocondriais de células viáveis (setas). t= tempo; h= horas.

4.2.3 Extração de RNA total da linhagem celular MIO-M1

Um total de 4×10^4 células tratadas com BVZ e controle nos tempos determinados foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Após homogeneização, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Deutschland, Alemanha) para cada mL de TRIzol utilizado, e em seguida a mistura foi submetida à centrifugação (12.000 g, 15 min, 4°C; Eppendorff modelo 5804R). Após separação da fase contendo RNA, acrescentamos 0,50 mL de isopropanol (Merck) para cada mL de TRIzol e novamente foi centrifugado, nas mesmas condições. O precipitado obtido (RNA total) foi lavado com etanol 75% e dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich).

4.2.4 Extração de RNA total dos explantes de retinas de ratos

Para a extração do RNA total dos explantes de retinas, foi utilizado minikit RNeasy (Qiagen, Courtabouef, France) de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA total de ambos os modelos experimentais foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro Nanodrop 3000 (Thermo Scientific, Ashcille, NC, E.U.A.). Consideramos que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 ng de RNA. A relação de absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm de RNA total foi calculada

para a certificação da ausência de contaminação protéica (260/280 nm; relação isenta de proteína = 1,8 a 2,2).

A integridade do RNA total dos explantes foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão tris-borato-EDTA 1X (TBE; 50 mM Tris base, 50 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8, todos sais adquiridos da Sigma-Aldrich). Só foram utilizados os RNAs que apresentaram as bandas ribossômicas 28S e 18S íntegras. Do total obtido para o RNA, 2 µg foram utilizados para a síntese da 1ª fita de cDNA e o restante armazenado a -80°C.

4.2.5 RT-PCR

Primeiramente, os cDNA foram sintetizados a partir de 2 µg de RNA total das amostras de linhagem celular e explantes de retinas de ratos utilizando o kit SuperScript VILO (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Ao fim da reação, os cDNA sintetizados foram então quantificados por nanospectrofotometria em aparelho Nanodrop 3000c, armazenados a -20°C ou foram direcionados à próxima fase do experimento.

✓ *PCR qualitativo*

Os cDNAs obtidos de 4×10^4 células da linhagem MIO-M1 e dos explantes foram amplificados por PCR para a verificação da expressão dos genes descritos e ajuste de temperatura de anelamento dos *primers*. No anexo I, estão descritas as sequências de pares de bases de cada *primer* usado neste trabalho, todos obtidos da Invitrogen.

Foi utilizado o kit Platinum PCR Supermix (Invitrogen), 2 µl do cDNA total, 0,2 µM de cada *primer* senso e antisenso (para GFAP, VIM, BECL CASP-3, fosfacam, neurocam, e VEGF; além de GAPDH e ARBP, que foram utilizados como controles endógenos de MIO-M1 e explantes, respectivamente) em 25 µL volume final de reação. A mistura de reação foi amplificada em termociclador Gene Pro (Bioer) para PCR utilizando o seguinte programa:

1. Desnaturação por 5 minutos a 94°C;
2. 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C correspondente à hibridização dos iniciadores (*primers*) e 1 minuto a 72°C (síntese da fita);
3. Extensão final por 10 minutos a 72°C;
4. Armazenamento a -20°C.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (tampão Tris 1M, ácido bórico 0,9M, EDTA 0,01M) 1X contendo 100 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen), utilizando padrão de DNA de 100 pares de bases (Invitrogen). A documentação dos géis com os produtos de PCR foi feita por meio do sistema de captação de imagens EC3 Imaging System (UVP, Upland, CA, USA) sob a incidência de luz ultravioleta.

✓ **PCR em tempo real**

A análise quantitativa dos genes de interesse foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. Dois microlitros de cDNA de cada amostra foram amplificados utilizando o protocolo do kit SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) em uma reação com volume final de 20 µL e 0,2 µM de *primers* específicos para cada gene alvo (VEGF, GFAP, VIM, CASP-3, BECL, SDC-3, fosfacam e neurocam). Para cada análise, foram usadas no mínimo triplicatas do gene GAPDH ou ARBP, usados como genes para controle endógeno da linhagem celular e do explante, respectivamente, uma vez que suas expressões foram contínuas frente às concentrações e tempos usados (dados não mostrados). O controle negativo da reação consistiu de água Mili-Q autoclavada recentemente em substituição ao cDNA. A amplificação dos produtos de PCR foi realizada no sistema de detecção Corbett Rotor-Gene 3000 (Qiagen), realizando, por 5 minutos a abertura das fitas à 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 minutos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 30 segundos pra extensão da fita que está sendo sintetizada.

A quantificação do transcrito foi realizada no software Rotor Gene versão 6.0 pela equação aritmética $2^{CT} \times 100$ K-1, onde Ct é o número de ciclos em que há 50% da síntese do transcrito.

✓ **Curva Padrão dos genes alvo**

Foram desenhadas curvas padrões para os genes VEGF, GFAP, VIM, CASP-3, BECL, GAPDH e ARPB a partir do cDNA das amostras controles de 12 e 24 horas para MIO-M1 e 48 horas para os explantes. As curvas foram realizadas em duplicatas e continham as seguintes concentrações (500 ng/µL, 350 ng/µL, 250 ng/µL, 150 ng/µL, 50 ng/µL, 25 ng/µL e 15 ng/µL).

Devido à baixa expressão dos genes *neurocam* e *fosfacam* em condições fisiológicas adultas, as curvas padrões destes genes foram realizadas a partir do amplificado em PCR qualitativo como já descrito anteriormente. Após a amplificação, a banda foi cortada do gel e o produto de PCR foi extraído do mesmo com o auxílio do kit Gel Extraction QiaKit (Qiagen), quantificado e então realizada as curvas padrões para o PCR em Tempo real nas concentrações de 1,0 ng/μL, 0,1ng/μL, 0,01 ng/μL, 1,0 pg/μL, 0,1 pg/μL, 0,01 pg/μL e 1,0 fg/μL. As curvas que obtiveram valor de r^2 superior a 0.980 foram usadas para as reações futuras.

Baseada na curva padrão de cada gene em 12, 24 e 48 horas, foi escolhido uma concentração única para fazer o mínimo de três réplicas de cada amostra (controle e tratadas) que estivessem compreendidas entre 20 e 30 ciclos na curva padrão. Com isso, as réplicas foram feitas em concentração de 300 ng ou 100 ng de cDNA para os genes testados, com exceção do *neurocam* e *fosfacam* da linhagem celular MIO-M1 que foi utilizado a concentração de 2,0 ng. Para a normatização dos resultados, foi necessário realizar replicatas dos genes GAPDH (para MIO-M1) e ARBP (para os explantes), tidos como controles endógenos. O programa de amplificação para as replicatas foi o mesmo utilizado anteriormente para a padronização das curvas de concentração.

As curvas-padrão típicas para a linhagem celular MIO-M1 e para o explante de retina são apresentadas nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4. Curvas padrão de PCR em tempo real da linhagem celular MIO-M1. **A**, VEGF; **B**, GFAP; **C**, vimentina; **D**, beclina-1; **E**, capase-3; **F**, neurocam; **G**, fosfacam; **H**, GAPDH.

Figura 5. Representações gráficas das curvas padrão para os explantes de retinas de ratos *lister*, controle em 48 horas, para os genes: **A**, VEGF120; **B**, VEGF164; **C**, ARBP.

4.2.6 Imunocitoquímica para MIO-M1

Para a imunofluorescência da linhagem celular, 8×10^4 células foram cultivadas em lâminas para cultivo, *chamber slides* (Nalge Nunc International, Rochester, NY, E.U.A.) até alcançarem 80-90% de confluência (aproximadamente 48 horas). Em seguida, o BVZ (grupos tratados) foi adicionado ou não (grupo controle) por 12 horas ou 24 horas, nas concentrações 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL. Após tratamento, as lâminas com as células aderidas foram fixadas em paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich) a 4% em PBS 0,1M pH 7.4 por 10 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas com as células devidamente fixadas foram inicialmente lavadas em tampão de fosfato e salina (PBS) 0,01 M adicionado de Triton X-100 e posteriormente lavados apenas com PBS 0,01M (salvo as lâminas destinadas às marcações de PG de membrana celular que não foram lavadas com X-triton que, devido a sua ação lipolítica, liga-se à porção fosfolipídica da membrana, degradando-a). Bloqueou-se com Albumina Bovina Sérica (BSA) 10% diluída em PBS por 1 hora, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Adicionou-se o anticorpo primário (cada anticorpo diluído de acordo com as especificações dos fabricantes) sobre as lâminas e incubou-se overnight em refrigeração a 4°C em câmara úmida e escura. A marcação dos alvos desejados foi feita através de aplicação de anticorpo secundário associado a cromóforo, e DAPI (Sigma-Aldrich) para coloração de núcleos.

Para evidenciar a proteína VEGF foi utilizado anticorpo contra VEGF na diluição 1:100 (Anti-VEGF, policlonal, clone (A-20) sc-152, Santa Cruz Biotechnology).

Para evidenciar as células gliais utilizou-se anticorpos contra GFAP, diluição 1:100 (Anti-GFAP, policlonal, clone (C-19) sc-6170, Santa Cruz Biotechnology) e vimentina, diluição 1:100 (Anti-vimentina, policlonal, clone (C-20) sc-7557).

Morte celular por apoptose e autofagia foi detectada usando anti-caspase 3 na diluição 1:10 (policlonal (clone H-277) sc-7148, Santa Cruz Biotechnology) e anti-beclina-1 na diluição 1:100 (Millipore, Billerica, MA).

Para a análise da matriz foram utilizados os seguintes anticorpos, anti SDC-3 na diluição 1:100 (policlonal, clone (V-14) sc-30883, Santa Cruz Bioetchnology), anti-fosfacam

na diluição 1:100 (policlonal, anti-phosphacan – clone PTP ζ (C-19) sc-1110, Santa Cruz Bioethnology), anti-neurocam na diluição 1:100 (policlonal, anti-neurocan – clone (C-12) sc-20834, Santa Cruz Bioethnology).

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS-5% BSA. Os anticorpos fluorescentes secundários (anti-IgG de coelho conjugado Alexa 488, Sigma-Aldrich) diluídos em 1% PBS-BSA foram aplicados às lâminas, montadas em Fluormont Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich), e observadas, inicialmente, sob um microscópio convencional de fluorescência (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, USA). Depois o mesmo material também foi observado sob um microscópio de varredura por laser (LSM) Zeiss META 510, a 543 nm de comprimento de onda de excitação para o fluorocromo utilizado. Todas as imagens foram adquiridas com resolução de 512 $\times$ 512 pixels, 75% de transmitância a laser, e cortes ópticos de 0,7 μ M de profundidade, e 1 minuto de tempo de varredura no mesmo valor do ganho do detector. Controles negativos, sem a adição do anticorpo primário, e positivos, realizados em tecidos que conhecidamente expressam a proteína, foram preparados (dados não mostrados).

4.2.7 Imunohistoquímica para explantes de retinas de ratos

Para a imunofluorescência, após a incubação, foram submetidos à fixação em paraformaldeído 4% por 1 hora e armazenados em tampão fosfato 0,1M pH 7,2.

✓ Obtenção dos cortes de retina

Após fixação, os explantes foram desidratados em solução de sacarose 30%, montados em molde apropriado imersos em OCT (Tissue-Tek OCT Compound-FK Biotec) e congelados à -30°C. Foram feitos cortes de 10 micrômetros de espessura com criostato Leica CM3000 e colocados em lâminas revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Os cortes de retinas tratadas e controles foram colocados em lâminas diferentes.

✓ Imunofluorescência

Os cortes foram inicialmente lavados em tampão de fosfato e salina (PBS) 0,01 M adicionado de Triton X-100 e posteriormente lavados apenas com PBS 0,01 M (salvo as lâminas destinadas à marcações de PG de membrana celular que não foram lavadas com triton X-100 que, devido a sua ação lipofílica, liga-se à porção fosfolipídica da membrana,

degradando-a). Bloqueou-se com BSA 10 % em PBS por 1 hora, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Adicionou-se o anticorpo primário (cada anticorpo diluído de acordo com as especificações dos fabricantes) sobre os cortes e incubou-se overnight em refrigeração a 4°C.

Para evidenciar a proteína VEGF foi utilizado anticorpo contra VEGF na diluição 1:100 (Anti-VEGF, policlonal, clone (A-20) sc-152, Santa Cruz Biotechnology).

Para a análise da matriz foram utilizados os seguintes anticorpos,

Os anticorpos fluorescentes secundários donkey anti-goat IgG-FITC (sc-2356, diluição 1:400, Santa Cruz Biotechnology) foram aplicados nos cortes por 2 horas a temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS-5%BSA. Após as reações, essas preparações com anticorpos secundários conjugados com fluoróforos foram montadas em Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) e conservados à 4°C protegidos da luz. O controle foi processado sem a incubação com o anticorpo primário. As amostras foram observadas, inicialmente, sob um microscópio convencional de fluorescência (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, E.U.A.). Depois as mesmas secções também foram observadas sob um microscópio de varredura por laser (LSM) Zeiss META 510, a 543 nm de comprimento de onda de excitação para o fluorocromo utilizado. Todas as imagens foram adquiridas com resolução de 512 × 512 pixels, 75% de transmitância a laser, cortes ópticos de 0,7 µm de profundidade, e 1 minuto de tempo de varredura no mesmo valor do ganho do detector. Controles negativos, sem a adição do anticorpo primário, e positivos, realizados em tecidos que conhecidamente expressam a proteína, foram preparados (dados não mostrados).

4.2.8 Western Blotting

A análise da proteína VEGF foi realizada por Western Blotting.

Inicialmente, foram preparados tampões para a extração, corrida e transferência da proteína das amostras (anexo II).

Para os explantes, tratados ou não com BVZ, foi utilizado um pool de aproximadamente 8 retinas por grupo, dissecadas como descritas anteriormente. A seguir, as amostras foram trituradas, por 1 minuto, com 2 mL de tampão de extração com o auxílio de um homogeneizador e permaneceram sob agitação por 48 horas à 4°C. Após este

período, as amostras foram aliquotadas em volume de 100 μ L e precipitadas com etanol absoluto overnight. A proteína total foi dosada pelo método de Bradford (Bioagency, São Paulo, São Paulo, Brasil). Cerca de 50 μ g de proteína total foram ressuspensas em 50 μ L de tampão de aplicação para gel de poliacrilamida-SDS, contendo β -mercaptanol. A seguir as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a cerca de 100°C, aplicadas em gel 6% a 13% e separadas por aproximadamente 3 horas a 80 Volts (V). Após a corrida eletroforética do gel, foi realizada a eletrotransferência em membrana de nitrocelulose 0.45 μ m (Bio-rad, Cat#162-0115) overnight a 40 V.

Para a reação de imunoblotting, as membranas foram incubadas com solução tampão Tris-Borato Salina, TBS, (anexo II) acrescidas de 5% de BSA por 3 horas em temperatura ambiente para o bloqueio dos sítios de ligação inespecífica. Após, as amostras foram incubadas com anticorpos primários nas concentrações de 1:100 para fosfacam e neurocam e 1:200 para VEGF (Santa Cruz Biotechnology), diluídos em TBS overnight à 4°C e protegidos da luz. Em seguida, foram realizadas lavagens com tampão de lavagem (TBS-Tween20 0,50% e 5%BSA). Logo após, foram incubadas com anticorpos secundários, diluídos 1:1000 em solução tampão TBS por 3 horas em temperatura ambiente. Foram realizadas 5 lavagens de 10 minutos cada com tampão de lavagem. A revelação quantitativa foi realizada por quimioluminescência utilizando reagente LUMINOL (GE Health Care) no fotodocumentador UVI Alliance com software UVI-band.

4.3 Análise Estatística

É apresentada a estatística descritiva dos resultados (média, EPM, n, média, IC_{90%}).

Todas as análises foram realizadas com os dados log-transformados. A comparação entre as diferentes condições em um mesmo tempo foi feita por ANOVA e pós-teste Tukey-Kramer, quando aplicável. A análise de diferença entre 2 tempos na mesma condição, foi feita por teste t de Student. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 O BVZ manteve as células viáveis após 48 horas, como avaliado por MTT

Os testes de viabilidade celular evidenciaram que o BVZ nas concentrações 0,25 e 0,50 mg.mL⁻¹ não foram tóxicos para as células MIO-M1.

A figura 6 representa a análise, por ANOVA, dos resultados da viabilidade celular, após metabolização do MTT, quando foram tratadas com BVZ.

Figura 6. Representação gráfica das médias e valores individuais obtidos após metabolização do MTT em células MIO-M1. O grupo controle de 12 e 24 horas de cultivo com meio D-MEM. Os grupos tratados com 0,25 e 0,50 mg.mL⁻¹ de BVZ. Análise dos resultados realizada por ANOVA fator único.

5.2 Análise da expressão gênica e síntese proteica na linhagem celular e no explante de ratos *lister* recém nascidos.

5.2.1 Transcrição e tradução dos genes VEGF, GFAP, VIM, BECL-1, CASP-3, fosfacam e neurocam na linhagem celular MIO-M1.

✓ *A adição de BVZ levou a um discreto aumento da transcrição de VEGF somente após 24 horas de incubação com 0,50mg.mL⁻¹.*

A figura 7A mostra a análise da transcrição do gene VEGF, em cópias.μL⁻¹, em relação aos tempos de 12 e 24 horas médias. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos controles e os grupos tratados com 0,25 mg.mL⁻¹. No grupo tratado com 0,50 mg.mL⁻¹ de BVZ, a transcrição do VEGF aumentou em 24 horas em relação a 12 horas de tratamento (teste t; p<0,05; tabela 1).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, não indicou nenhuma diferença significativa entre os grupos controles e tratados com BVZ, tanto após 12 como 24 horas de incubação (tabela 17).

A figura 7B mostra a análise da marcação de VEGF, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos controle e os tratados com 0,25 mg.mL⁻¹ com BVZ. No entanto, no grupo tratado com 0,50 mg.mL⁻¹ de BVZ, a intensidade de marcação de VEGF diminuiu em 24 horas em relação a 12 horas de tratamento (teste t; p<0,05; tabela 2).

As análises em relação às concentrações estudadas foram realizadas por ANOVA. Em ambos os tempos de incubação, encontramos uma diminuição da intensidade da marcação de VEGF entre os grupos estudados (p<0,01). O pós teste, Tukey-Kramer, para 12 horas indicou diferença entre os grupos controle e tratados com BVZ. Para 24 horas, o mesmo teste indicou diferença entre o grupo tratado com 0,50 mg.mL⁻¹ em relação ao controle e ao grupo tratado com 0,25 mg.mL⁻¹ de BVZ (tabela 17).

As figuras 7C-E revelam as marcações típicas para VEGF nas condições estudadas.

Tabela 1. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do VEGF nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,88	0,16	9	0,72	0,50	1,25	ns
	24	0,80	0,19	5	0,73	0,28	1,32	
0,25	12	0,70	0,15	6	0,63	0,32	1,09	ns
	24	0,56	0,12	5	0,37	0,22	0,90	
0,5	12	0,60	0,10	9	0,57	0,37	0,83	<0,05
	24	1,10	0,17	5	1,04	0,62	1,57	

Tabela 2. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do VEGF nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	2,18	0,42	3	2,45	0,39	3,97	ns
	24	1,82	0,19	3	1,94	1,01	2,63	
0,25	12	1,03	0,04	3	1,02	0,86	1,19	ns
	24	0,71	0,24	3	0,80	-0,32	1,73	
0,5	12	0,69	0,02	3	0,69	0,62	0,76	<0,05
	24	0,03	0,01	3	0,02	-0,02	0,07	

Figura 7. Análises de VEGF nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene VEGF em relação aos tempos estudados. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para VEGF. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação do VEGF (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

12 h

24 h

✓ ***O BVZ aumentou a transcrição em 24 horas e diminuiu a proteína GFAP nas células MIO-M1***

A figura 8A mostra a análise da transcrição do gene GFAP, em cópias. μL^{-1} , em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos tratados com 0,25 mg.mL^{-1} . Entretanto, observamos um aumento da transcrição entre os controles e grupo tratado com 0,50 mg.mL^{-1} em 24 horas em relação à 12 horas (teste t; $p < 0,05$; $p < 0,01$, respectivamente; tabela 3).

A análise dos dados log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, não indicou nenhuma diferença entre os grupos controle e tratados com BVZ, após 12 de incubação. Em 24 horas de tratamento, houve um aumento da transcrição de GFAP entre os três grupos estudados ($p < 0,001$). O pós-teste, Tukey-Kramer, indicou diferença entre o grupo tratado com 0,50 mg.mL^{-1} em relação ao controle e ao grupo tratado com 0,25 mg.mL^{-1} de BVZ (tabela 17).

A figura 8B mostra a análise da marcação de GFAP, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença significativa entre os controles e os grupos tratados com 0,50 mg.mL^{-1} . Entretanto, no grupo tratado com 0,25 mg.mL^{-1} de BVZ, a intensidade de marcação de GFAP diminuiu em 24 horas em relação a 12 horas de tratamento (teste t; $p < 0,05$; tabela 4).

As análises em relação às concentrações estudadas foram realizadas por ANOVA. Em 12 horas de incubação, encontramos uma diminuição da intensidade da marcação de GFAP entre os grupos estudados ($p < 0,05$). O pós teste, Tukey-Kramer, para 12 horas indicou diferença entre o grupo 0,50 mg.mL^{-1} em relação ao controle e ao grupo tratado com 0,25 mg.mL^{-1} de BVZ. Não observamos diferenças na marcação de GFAP em 24 horas entre todos os grupos estudados (tabela 17).

As figuras 8C-E revelam as marcações típicas para GFAP nas condições estudadas.

Tabela 3. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do GFAP nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,60	0,10	6	0,58	0,60	0,60	<0,05
	24	1,08	0,11	3	1,10	1,08	1,08	
0,25	12	0,66	0,11	6	0,63	0,66	0,66	ns
	24	0,91	0,08	3	0,83	0,91	0,91	
0,5	12	0,80	0,15	6	0,69	0,80	0,80	<0,001
	24	4,72	0,14	3	4,66	4,72	4,72	

Tabela 4. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do GFAP nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,49	0,04	3	0,53	0,33	0,66	ns
	24	0,35	0,03	3	0,35	0,23	0,47	
0,25	12	0,53	0,10	3	0,49	0,11	0,95	<0,05
	24	0,17	0,02	3	0,18	0,10	0,23	
0,5	12	0,19	0,03	3	0,18	0,08	0,30	ns
	24	0,14	0,04	3	0,18	-0,03	0,31	

Figura 8. Análises de GFAP nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene GFAP em relação aos tempos estudados. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para GFAP. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação do GFAP (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

12 h

24 h

✓ O BVZ aumentou a transcrição da vimentina em 0,50 mg.mL⁻¹ quando tratada por 24 horas.

A figura 9A mostra a análise da transcrição do gene VIM, em cópias.μL⁻¹, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos controle e tratados com 0,25 mg.mL⁻¹ de BVZ. Entretanto, observamos um aumento da transcrição entre grupos tratados com 0,50 mg.mL⁻¹ de BVZ em 24 horas em relação à 12 horas (teste t; p<0,05; tabela 5).

A figura 9B mostra a análise da marcação de VIM, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos estudados (teste t; tabela 6).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às condições estudadas, não indicou nenhuma diferença entre os grupos tanto na transcrição quanto para a intensidade de marcação da VIM (tabela 17).

As figuras 9C-E revelam as marcações típicas para VIM nas condições estudadas.

Tabela 5. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da VIM nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,71	0,07	3	0,63	0,71	0,71	ns
	24	1,01	0,22	3	0,90	1,01	1,01	
0,25	12	0,87	0,10	3	0,81	0,87	0,87	ns
	24	0,98	0,18	3	1,19	0,98	0,98	
0,5	12	0,97	0,15	6	0,77	0,97	0,97	<0,05
	24	1,85	0,19	3	1,90	1,85	1,85	

Tabela 6. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da VIM nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	2,51	0,26	3	2,35	1,39	3,63	ns
	24	3,71	2,21	3	1,41	-5,80	13,22	
0,25	12	2,60	0,83	3	1,61	-0,98	6,18	ns
	24	4,21	1,41	3	3,26	-1,84	10,26	
0,5	12	3,89	0,32	3	3,83	2,52	5,27	ns
	24	2,68	0,55	3	3,19	0,32	5,05	

Figura 9. Análises de VIM nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento de BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene VIM em relação aos tempos estudados. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para VIM. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação da VIM (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

✓ ***O BVZ diminuiu a transcrição e modulou a beclina-1 em relação ao tempo de tratamento***

A figura 10A mostra a análise da transcrição do gene BECL-1, em cópias. μL^{-1} , em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos tratados com 0,50 mg.mL^{-1} de BVZ. Entretanto, observamos uma diminuição da transcrição de BECL-1 nos controles e grupos tratados com 0,25 mg.mL^{-1} em 24 horas em relação à 12 horas de tratamento (teste t; ambos $p < 0,05$; tabela 7).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, indicou diferença entre os grupos controle e tratados com BVZ, tanto após 12 horas como em 24 horas (ambos $p < 0,05$). Os pós-testes, Tukey-Kramer, indicaram diferenças entre os controles e os tratados com BVZ (tabela 17).

A figura 10B mostra a análise da marcação de BECL-1, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença significativa entre os controles. Entretanto, no grupo tratado com 0,25 mg.mL^{-1} de BVZ, a intensidade de marcação de BECL-1 diminuiu em 24 horas em relação a 12 horas de tratamento (teste t; $p < 0,05$; tabela 8). No grupo tratado com 0,50 mg.mL^{-1} de BVZ, vimos um aumento da intensidade da marcação desta proteína em 24 horas em relação ao grupo tratado por 12 horas (teste t, $p < 0,01$; tabela 8).

As análises em relação às concentrações estudadas foram realizadas por ANOVA. Não observamos diferenças na intensidade da marcação entre os grupos tratados por 12 horas, mas em 24 horas encontramos um aumento da marcação da BECL-1 no grupo 0,50 mg.mL^{-1} em relação aos outros grupos estudados (tabela 17).

As figuras 10C-E revelam as marcações típicas para BECL-1 nas condições estudadas.

Tabela 7. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da BECL-1 nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,79	0,05	3	0,73	0,55	1,02	<0,05
	24	0,35	0,06	3	0,30	0,11	0,60	
0,25	12	1,80	0,12	3	1,92	1,30	2,30	ns
	24	0,85	0,10	3	0,89	0,40	1,30	
0,5	12	1,66	0,27	3	1,81	0,49	2,82	ns
	24	0,87	0,09	3	0,82	0,48	1,27	

Tabela 8. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da BECL-1 nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	2,78	1,23	3	1,39	-2,50	8,06	ns
	24	1,23	0,22	3	1,20	0,27	2,18	
0,25	12	4,40	0,62	3	4,77	1,71	7,09	<0,05
	24	1,77	0,02	3	1,80	1,66	1,88	
0,5	12	1,71	0,04	3	1,73	1,52	1,90	<0,05
	24	6,41	0,62	3	5,76	3,74	9,09	

Figura 10. Análises de BECL-1 nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene BECL-1. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para BECL-1. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação da BECL-1 (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

12 h

24 h

✓ ***O BVZ diminuiu a transcrição e aumentou a intensidade de marcação da caspase-3 em 12 e 24 horas de tratamento***

A figura 11A mostra a análise da transcrição do gene CASP-3, em cópias. μL^{-1} , em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os controles. Entretanto, observamos uma diminuição da transcrição de CASP-3 nos grupos tratados com 0,25 e 0,50 mg.mL^{-1} em 24 horas em relação à 12 horas de tratamento (teste t; $p < 0,01$; $p < 0,05$; tabela 9).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, não indicou diferença entre os grupos controle e tratados com BVZ após 12 horas. Em 24 horas de incubação, vimos uma diminuição da transcrição entre todos os grupos estudados ($p < 0,001$). O pós-teste, Tukey-Kramer, indicou diferença entre o controle e os tratados com BVZ (tabela 17).

A figura 11B mostra a análise da marcação de CASP-3, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos 0,25 mg.mL^{-1} . Entretanto, nos grupos controles e tratados com 0,50 mg.mL^{-1} de BVZ, a intensidade de marcação de CASP-3 aumentou em 24 horas em relação a 12 horas. (teste t; ambos $p < 0,05$; tabela 10).

As análises em relação às concentrações estudadas foram realizadas por ANOVA e não indicaram diferenças entre as condições estudadas (tabela 17).

As figuras 11C-E revelam as marcações típicas para CASP-3 nas condições estudadas.

Tabela 9. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição da CASP-3 nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,81	0,06	5	0,79	0,64	0,99	ns
	24	0,84	0,03	3	0,81	0,69	0,99	
0,25	12	1,46	0,18	5	1,61	0,96	1,96	<0,01
	24	0,53	0,04	3	0,56	0,36	0,70	
0,5	12	1,17	0,15	5	1,24	0,75	1,58	<0,05
	24	0,62	0,03	3	0,64	0,51	0,74	

Tabela 10. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição da CASP-3 nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	2,06	0,55	3	2,38	-0,31	4,43	<0,05
	24	53,80	19,11	3	60,86	-28,41	136,00	
0,25	12	9,39	1,16	3	10,43	4,41	14,37	ns
	24	35,24	12,32	3	47,00	-17,75	88,23	
0,5	12	5,95	2,12	3	4,77	-3,17	15,07	<0,05
	24	82,87	5,70	3	81,70	58,35	107,39	

Figura 11. Análises de CASP-3 nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene CASP-3. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para CASP-3. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação da CASP-3 (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

✓ ***O BVZ diminuiu a transcrição do fosfacam após o tratamento com 0,50 mg.mL⁻¹ em 24 horas.***

A figura 12A mostra a análise da transcrição do gene fosfacam, em cópias.μL⁻¹, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os controles e os grupos tratados 0,25 mg.mL⁻¹ de BVZ. Entretanto, observamos uma diminuição da transcrição de fosfacam nos grupos tratados com 0,50 mg.mL⁻¹ em 24 horas em relação à 12 horas. (teste t; p<0,01; tabela 11).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, indicou diferença entre os grupos estudados, tanto após 12 como 24 horas de tratamento (ambos p<0,001). Os pós-testes, Tukey-Kramer, indicaram diferenças entre os controles e os grupos tratados com BVZ (tabela 17).

A figura 12B mostra a análise da marcação de fosfacam, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os grupos estudados (teste t; tabela 12).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, também não indicou diferença entre os grupos estudados (tabela 17).

As figuras 12C-E revelam as marcações típicas para fosfacam nas condições estudadas.

Tabela 11. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do fosfacam nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,34	0,09	3	0,40	-0,06	0,75	ns
	24	0,39	0,06	3	0,32	0,12	0,66	
0,25	12	5,7E-08	7,2E-09	3	6,0E-08	2,6E-08	8,8E-08	ns
	24	1,9E-06	1,1E-06	3	1,0E-06	-2,7E-06	6,4E-06	
0,5	12	7,7E-08	2,0E-08	3	9,0E-08	-7,8E-09	1,6E-07	<0,01
	24	3,2E-06	1,3E-06	3	2,4E-06	-2,6E-06	8,9E-06	

Tabela 12. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do fosfacam nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,52	0,08	4	0,52	0,27	0,77	ns
	24	0,43	0,10	5	0,38	0,14	0,71	
0,25	12	0,51	0,11	5	0,54	0,21	0,82	ns
	24	0,84	0,28	7	0,69	0,16	1,52	
0,5	12	0,36	0,06	4	0,36	0,18	0,54	<0,05
	24	0,85	0,44	5	0,29	-0,37	2,08	

Figura 12. Análises de fosfacam nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene fosfacam. **B.** Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para fosfacam. **C-E.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação da fosfacam (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. **C.** Grupos controles. **D.** Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. **E.** Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

✓ ***O BVZ diminuiu a transcrição e a aumentou na intensidade de marcação do neurocam após o tratamento.***

A figura 13A mostra a análise da transcrição do gene neurocam, em cópias. μL^{-1} , em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os controles. Entretanto, observamos uma diminuição da transcrição de neurocam nos grupos tratados com 0,25 e 0,50 mg.mL^{-1} em 24 horas em relação à 12 horas. (teste t; $p<0,01$; $p<0,001$; tabela 13).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às concentrações estudadas, indicou diferença entre os grupos, tanto após 12 como 24 horas de tratamento (ambos $p<0,001$). Os pós-testes, Tukey-Kramer, indicaram diferenças entre os controles e os grupos tratados com BVZ (tabela 17).

A figura 13B mostra a análise da marcação de neurocam, por imunocitoquímica, em relação aos tempos de 12 e 24 horas. Não encontramos diferença entre os controles e grupos tratados com 0,25 mg.mL^{-1} (teste t; tabela 14). O grupo tratado com 0,50 mg.mL^{-1} de BVZ por 24 horas teve um aumento da intensidade da marcação do neurocam em relação ao grupo tratado por 12 horas ($p<0,01$, tabela 14).

A análise dos dados, log-transformados por ANOVA, em relação às condições estudadas, não indicou nenhuma diferença entre os grupos em 12 horas de tratamento. Entretanto, observamos uma diminuição da intensidade de marcação de neurocam entre os grupos estudados ($p<0,001$). O pós-teste, Tukey-Kramer, indicou diferenças entre os controles e os grupos tratados com BVZ (tabela 17).

As figuras 13C-E revelam as marcações típicas para neurocam nas condições estudadas.

Tabela 13. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição do neurocam nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,29	0,08	3	0,20	-0,04	0,62	ns
	24	0,71	9,8E-04	3	0,71	0,71	0,72	
0,25	12	4,3E-09	7,2E-10	3	4,0E-09	1,2E-09	7,4E-09	<0,01
	24	6,7E-03	4,2E-03	3	2,0E-03	-1,2E-02	2,5E-02	
0,5	12	4,0E-08	1,1E-08	3	4,7E-08	-7,8E-09	8,8E-08	<0,001
	24	4,0E-03	8,2E-04	3	3,0E-03	4,9E-04	7,5E-03	

Tabela 14. Estatística descritiva dos resultados Imunocitoquímica para a transcrição do neurocam nas células MIO-M1.

BVZ (mg.mL ⁻¹)	tempo (horas)	média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
controle	12	0,69	0,15	3	0,83	0,05	1,34	ns
	24	0,40	0,06	3	0,45	0,13	0,68	
0,25	12	0,82	0,30	8	0,36	0,12	1,52	ns
	24	0,44	0,09	5	0,29	0,19	0,69	
0,5	12	0,46	0,10	3	0,38	0,04	0,89	<0,01
	24	1,16	0,15	8	1,00	0,81	1,50	

Figura 13. Análises de neurocam nas células MIO-M1 após 12 e 24 horas de tratamento com BVZ. A. Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para o gene neurocam. B. Representação gráfica das médias e valores individuais da intensidade de marcação pelo anticorpo para neurocam. C-E. Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação da neurocam (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). À esquerda, grupos estudados por 12 horas e, à direita, 24 horas. C. Grupos controles. D. Grupos tratados com 0,25 mg/mL de BVZ. E. Grupos tratados com 0,50 mg/mL de BVZ.

5.2.2 Transcrição e tradução de VEGF em explante de retinas de ratos *Lister*

✓ ***A transcrição das isoformas de VEGF₁₂₀ e VEGF₁₆₄ diminuíram após tratamento com BVZ bem como sua síntese proteica***

A figura 14 A mostra que as expressões gênicas para VEGF isoformas 120 e 164 diminuíram nas amostras tratadas com BVZ por 48 horas em relação ao controle ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, tabela 15).

As figuras 14 B e C mostram os resultados da imunohistoquímica para o VEGF no grupo controle e no tratado com BVZ por 48 horas. Observou-se uma diminuição no nível de VEGF no grupo tratado com BVZ quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$; tabela 16).

A figura 14 D ilustra a marcação de duas isoformas de VEGF (21 kDa, monômero, e 42 kDa, dímero) pela técnica de Western Blotting no grupo controle e submetido ao BVZ. A síntese de monômero de VEGF no grupo tratado com BVZ aumentou em relação ao grupo controle.

Tabela 15. Estatística descritiva dos resultados de PCR real time para a transcrição das isoformas de VEGF 120 e 164 nos explantes de retinas de ratos lister após 48 de tratamento com BVZ.

		média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
VEGF 120	CTR	2,44	0,09	3	2,39	2,06	2,81	<0,001
	BVZ	0,10	0,00	3	0,10	0,08	0,12	
VEGF 164	CTR	0,50	0,02	3	0,51	0,39	0,60	<0,01
	BVZ	0,02	0,00	3	0,02	0,00	0,03	

Tabela 16. Estatística descritiva dos resultados de imunohistoquímica para a transcrição das isoformas de VEGF 120 e 164 nos explantes de retinas de ratos lister após 48 de tratamento com BVZ.

		média	SE	n	med	IC _{90%}		p
						inferior	superior	
VEGF	CTR	1,69	0,06	3	1,66	1,43	1,95	<0,001
	BVZ	0,07	0,00	3	0,07	0,05	0,09	

Figura 14. **A.** Análises de VEGF nos explantes de retinas de ratos lister após 48 de tratamento com BVZ. **A.** Representação gráfica das médias e valores individuais do transcrito para as isoformas de VEGF 120, à esquerda, e 164, à direita (verde). Núcleo marcado com DAPI (azul). **B.** Representação gráfica da média e valores individuais da síntese proteica para VEGF. À esquerda, grupo controle; à direita, grupo tratado com BVZ. **C.** Fotomicrografias de microscopia confocal a laser para a marcação do VEGF. **D.** Western Blotting das moléculas de VEGF, com massas moleculares distintas de 21 KDa e 42 KDa. CCG: camada de células ganglionares.

5.3 Resumo dos resultados

Os resultados da análise estatística apresentados ao longo do trabalho estão resumidos nas tabelas 17 (ANOVA/Tukey-Kramer) e 18 (teste t).

As figuras 15 e 16 ilustram os resultados de PCR e imunocitoquímica, respectivamente, relativos aos controles.

Tabela 17. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos com a linhagem celular MIO-M1 por ANOVA. (1, controle; 2, 0,25 mg.mL⁻¹; 3, 0,5 mg.mL⁻¹).

proteína	tempo (h)	transcrição				imunocitoquímica			
		resultado	ANOVA	Tukey-Kramer		resultado	ANOVA	Tukey-Kramer	
VEGF	12	—	ns	—	—	↓	p<0,01	1 vs 2	diferentes
								1 vs 3	diferentes
								2 vs 3	ns
	24	—	ns	—	—	↓	p<0,01	1 vs 2	ns
								1 vs 3	diferentes
								2 vs 3	diferentes
GFAP	12	—	ns	—	—	↓	p<0,05	1 vs 2	ns
								1 vs 3	diferentes
								2 vs 3	diferentes
	24	↑	p<0,001	1 vs 2	ns	—	ns	—	—
				1 vs 3	diferentes				
				2 vs 3	diferentes				
Vimentina	12	—	ns	—	—	—	ns	—	—
	24	—	ns	—	—	—	ns	—	—
Beclina-1	12	↑	p<0,05	1 vs 2	diferentes	—	ns	—	—
				1 vs 3	diferentes				
				2 vs 3	ns				
	24	↑	p<0,05	1 vs 2	diferentes	↑	p<0,001	1 vs 2	ns
				1 vs 3	diferentes			1 vs 3	diferentes
				2 vs 3	ns			2 vs 3	diferentes
Caspase-3	12	—	ns	—	—	—	ns	—	—
	24	↓	p<0,001	1 vs 2	diferentes	—	ns	—	—
				1 vs 3	diferentes				
2 vs 3				ns					
Fosfacam	12	↓	p<0,001	1 vs 2	diferentes	—	ns	—	—
				1 vs 3	diferentes				
				2 vs 3	ns				
24	↓	p<0,001	1 vs 2	diferentes	—	ns	—	—	
			1 vs 3	diferentes					
			2 vs 3	ns					
Neurocam	12	↓	p<0,001	1 vs 2	diferentes	—	ns	—	—
				1 vs 3	diferentes				
				2 vs 3	ns				
	24	↓	p<0,001	1 vs 2	diferentes	↓	p<0,001	1 vs 2	ns
				1 vs 3	diferentes			1 vs 3	diferentes
				2 vs 3	ns			2 vs 3	diferentes

Tabela 18. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos com a linhagem celular MIO-M1 por teste t.

proteína	PCR (n° cópias.µL ⁻¹)			imunocitoquímica		
	12h vs 24h	resultado	p	12h vs 24h	resultado	p
VEGF	controle	—	ns	controle	—	ns
	BVZ 0,25	—	ns	BVZ 0,25	—	ns
	BVZ 0,50	↑	<0,05	BVZ 0,50	↓	<0,05
GFAP	controle	↑	<0,05	controle	—	ns
	BVZ 0,25	—	ns	BVZ 0,25	↓	<0,05
	BVZ 0,50	↑	<0,05	BVZ 0,50	—	ns
vimentina	controle	—	ns	controle	—	ns
	BVZ 0,25	—	ns	BVZ 0,25	—	ns
	BVZ 0,50	↑	<0,05	BVZ 0,50	—	ns
beclina	controle	↓	<0,05	controle	—	ns
	BVZ 0,25	↓	<0,05	BVZ 0,25	↓	<0,05
	BVZ 0,50	—	ns	BVZ 0,50	↑	<0,01
caspase-3	controle	—	ns	controle	↑	<0,05
	BVZ 0,25	↓	<0,01	BVZ 0,25	—	ns
	BVZ 0,50	↓	<0,05	BVZ 0,50	↑	<0,05
fosfacam	controle	—	ns	controle	—	ns
	BVZ 0,25	—	ns	BVZ 0,25	—	ns
	BVZ 0,50	↓	<0,01	BVZ 0,50	—	ns
neurocam	controle	—	ns	controle	—	ns
	BVZ 0,25	↓	<0,01	BVZ 0,25	—	ns
	BVZ 0,50	↓	<0,001	BVZ 0,50	↑	<0,01

Figura 15. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos para a análise da expressão gênica da linhagem celular MIO-M1 em relação controle.

Figura 16. Resumo da análise estatística dos resultados obtidos para a análise de imunocitoquímica da linhagem celular MIO-M1 em relação controle.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Na última década, o reconhecimento do papel do VEGF em diversas doenças vasculares da retina levou ao desenvolvimento e uso clínico de drogas anti-VEGF para o tratamento de muitas doenças vasoproliferativas retinianas⁽⁹⁷⁾. Até hoje, o BVZ é a droga mais utilizada para este fim, mesmo com o uso *off label*, já que sua aprovação foi solicitada e obtida no FDA norte-americano para tratamento de diversos cânceres^(8, 23)

Os estudos mostraram que o BVZ se associa ao VEGF impedindo a sua ligação com os seus receptores e portanto diminuindo sua oferta para o crescimento, sobrevivência e proteção das células neuronais. O BVZ tem se consolidado como a estratégia mais eficaz para o tratamento de retinopatia associadas à neovascularização ocular^(4, 23, 25, 98).

Desde a introdução do BVZ, como uma modalidade terapêutica, existe a preocupação com a possível toxicidade para o tecido retiniano e para o olho de forma geral, sendo então, essa droga, motivo de um grande número de pesquisas clínicas e experimentais^(4, 6-8, 10, 11, 99-102).

A sua eficácia na melhora da função visual de um grande número de pacientes com degeneração senil de macula, oclusão de veia central da retina, retinopatia diabética entre outras afecções. Mais recentemente, o seu benefício foi evidenciado para o tratamento de recém-nascidos com retinopatia da prematuridade, reduzindo as chances de complicações visuais desta grave afecção⁽¹⁰⁰⁾.

Durante o desenvolvimento retiniano o VEGF é expresso pelos astrócitos da camada de células ganglionares da retina, células de Müller e outras células da camada nuclear interna e também pelo epitélio pigmentar da retina^(103, 104). Alguns autores sugeriram que o VEGF pode agir como um fator neurogênico, neuroprotetor e neurotrófico para as células retinianas, influenciando o crescimento, a diferenciação e sobrevivência neuronal^(10, 105, 106).

Os nossos achados em relação ao VEGF nos explantes de retinas indicaram uma diminuição da transcrição e da tradução com o tratamento de BVZ, sugerindo uma interferência negativa no desenvolvimento retiniano como já evidenciado por Krempel e col., 2014⁽⁹²⁾, e Miguel e col., 2012⁽⁴⁷⁾.

Apesar de ser um anticorpo anti-humano monoclonal, há controvérsias quanto sua eficácia em outras espécies. Yu e col., 2008, afirmaram que é pouco provável que a imunoneutralização específica do VEGF seja realizada pelo BVZ em murinos ⁽¹⁰⁷⁾. No entanto, estudos em camundongos ^(8, 13, 21, 23, 108-110), em porcos ⁽⁴⁸⁾ e em coelhos ⁽¹¹¹⁾ responderam ao tratamento com BVZ, tanto em animais adultos quanto em prematuros.

Os estudos de Hollanders e col. 2014, em três modelos distintos de neovascularização em murinos compararam a eficácia de BVZ com um anticorpo específico para o receptor 2 de VEGF, anti-VEGF-R2 de murinos, e concluíram que o BVZ é tão eficaz quanto este anticorpo podendo ser, então, adequado para uma pesquisa oftalmológica translacional ⁽¹¹²⁾.

Além de dirigir a angiogênese, o VEGF também pode influenciar a remodelagem, a estabilização e a diferenciação durante a maturação do plexo vascular ⁽¹¹³⁾. As desordens vasculares ateroscleróticas envolvem eventos como isquemia e cascatas de remodelação vascular e inflamatória. Cada uma destas cascatas é dirigida por fatores inflamatórios, as citocinas, as quimiocinas, e de crescimento, por exemplo, VEGF, que orquestram os linfócitos, macrófagos e células endoteliais ^(10, 100, 114, 115).

A oclusão da veia da retina é uma obstrução vascular associada com os mesmos mecanismos de aterosclerose, tendo, portanto, a patogênese e progressão da doença controladas por mediadores intraoculares de processos angiogênicos e inflamatórios ⁽¹¹⁶⁾.

A aplicação do BVZ intra-vítreo não só reduz o nível de VEGF, mas também os níveis de outras citocinas inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL) IL-1RA, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, e interferon- γ (IFN- γ). Estes resultados indicam a interação de algumas citocinas com o VEGF e sugerem que a aplicação do BVZ pode não só reduzir a proliferação vascular através do efeito direto ao VEGF, mas também modular a resposta inflamatória através de redes de citocinas putativas ^{(116-120) (116) (118-120)}.

Nas células MIO-M1, o VEGF diminuiu após o tratamento com 0,50 mg.ml⁻¹ de BVZ por 24 horas, indicando dose-tempo dependência. Vimos também que, em 12 horas, a depleção do VEGF já estava ocorrendo, o que sugere que a captura desta proteína pelo BVZ ocorre de maneira simultânea ou nas primeiras horas de tratamento.

Provavelmente, a falta de VEGF solúvel estimulou as células Muller à induzirem a produção de VEGF; fato este evidenciado pelo aumento da transcrição também de maneira dose-dependente. Este evento pode ser uma resposta adaptativa das células frente à diminuição da oferta de VEGF na matriz extracelular no microambiente da cultura ⁽¹²¹⁾.

Estudos clínicos sinalizam que os efeitos benéficos do uso de BVZ possa ser temporário. Diferentes grupos de pesquisadores observaram casos de efeitos adversos após várias sessões de injeções repetidas de BVZ ^(31, 122, 123) como a oclusão arterial, extravasamento vascular ou descolamento da retina, especialmente nos casos de retinopatia diabética proliferativa ^(9, 19).

Sabemos que a multifuncionalidade do VEGF é bem descrita na literatura ⁽¹⁶⁾ e sua relação de neuroproteção para o tecido retiniano vem ganhando destaque nos trabalhos sobre as drogas antiangiogênicas ^(10, 124, 125).

Brar e col., 2010, também evidenciaram o papel citoprotetor do VEGF para as células ganglionares da retina e sugeriram que o BVZ pode privar a retina desta citoproteção por meio da neutralização do VEGF ⁽¹²⁴⁾.

Virtualmente, todos os estímulos na retina induzem a reatividade das células de Müller, que suportam a sobrevivência de neurônios ou aceleram o progresso de degeneração neuronal ⁽¹²⁶⁾. A modulação da gliose é uma estratégia promissora para restaurar a homeostase retiniana e se o estímulo persistir haverá uma perturbação desse equilíbrio na plasticidade das células da retina ⁽¹²⁷⁾.

As células gliais reativas, astrócitos e Muller, induzem a produção de citocinas e fatores neurotróficos e neurogênicos, como o VEGF, que são importantes na neuroproteção, sobrevivência e regeneração neuronal. Alguns eventos necessários para estes fatos, são a diminuição da morte celular e hipertrofia, que leva essas células a uma superexpressão dos filamentos intermediários como GFAP e vimentina. O aumento da expressão desses filamentos podem estar relacionadas com os eventos de remodelação da membrana na camada limitante externa da retina, na estabilização das células de Müller ou na estabilidade mecânica da retina ⁽¹²⁸⁾.

Estudos clínicos e histopatológicos sobre a toxicidade do BVZ no tecido retiniano de coelhos não demonstraram efeitos tóxicos na retina ^(8, 129). Zayit-Soudry e col., 2011 ⁽¹³⁰⁾, investigaram os efeitos do BVZ injetado em olhos de coelhos, de 11 e 25 dias de idade, e não encontraram alterações retinianas no eletrorretinograma e no potencial visual evocado dos animais tratados quando comparados com os não tratados. Também não encontraram danos estruturais ou aumento no GFAP nos olhos tratados.

Iandiev e col., 2011, avaliaram os efeitos do BVZ em retinas de porcos adultos e não foi observado danos na análise da ultraestrutura retiniana. Eles afirmaram ainda que, o tratamento com BVZ não causa gliose, como indicaram os resultados da imunolocalização das proteínas GFAP, vimentina e glutamina sintetase, ou apoptose, vistos pelos marcadores caspase-3 e -9 ⁽⁴⁸⁾.

A pesquisa de Fusco e col., 2012 ⁽¹¹⁵⁾, avaliou coelhos juvenis que receberam injeção intravítrea de BVZ em um olho tendo o outro avaliado como controle. O grupo observou um menor número de células em apoptose, mais células em proliferação e maior reatividade glial nas retinas tratadas. Este estudo sugeriu que o VEGF desempenha um papel importante no controle da diferenciação e morte celular e que o uso de BVZ pode causar a gliose.

Nos nossos estudos com explante de retinas de ratos, observamos que, apesar do BVZ não alterar a morte celular, levou ao aumento de vimentina e diminuição de GFAP e neurocam no tecido, indicando uma alteração na diferenciação e dano ao tecido glial ^(47, 92)

Neste estudo, sobre reatividade glial, os processos de transcrição do GFAP e vimentina mostraram um aumento após o tratamento com BVZ de maneira tempo-dose-dependente, corroborando com o comportamento celular esperado em um evento de gliose.

Avaliando a intensidade da marcação destas proteínas, observamos a diminuição do GFAP na concentração mais baixa estudada e o efeito se estabiliza na concentração mais alta, ao passo que a vimentina não sofreu alterações.

A diminuição do GFAP e o aumento da caspase-3, durante suas traduções, diferem dos achados de Fusco e col., 2012 ⁽¹¹⁾. Como sabemos, o GFAP é filamento intermediário de glia diferenciada e a sua diminuição pode estar relacionada a uma possível de-diferenciação

celular causada pela depleção do VEGF. Talvez, de maneira putativa, isso leve às células de Muller, que já possuem características de células tronco, a voltarem em um estágio indiferenciado tão acentuado que, dependendo dos estímulos que receberem, poderão se diferenciar em neurônios ^(70, 131, 132).

O fato da vimentina não ter alterado nos tempos estudados é esperado, uma vez que ela é um filamento intermediário de glia indiferenciada e até o momento o processo de de-diferenciação pode estar no início, visto que o GFAP ainda está presente. A diminuição da tradução do GFAP e o aumento da transcrição da vimentina vão ao encontro dos resultados obtidos por Miguel e col., 2012 ^(47, 115), onde foi aventado um possível atraso na diferenciação retiniana pelo BVZ, independente da diferença de modelos experimentais.

Referente a sobre morte celular, nossos resultados também sugerem um papel neuroprotetor do VEGF. Apesar dos resultados do MTT indicarem que a viabilidade celular se manteve estável em todas as condições testadas, nossos achados da intensidade da marcação para a caspase-3 indicam que a depleção do VEGF pode induzir a morte celular por apoptose. Os resultados da transcrição deste gene podem inferir uma tentativa das células de Muller em manter um equilíbrio na mortalidade, diminuindo a transcrição desta proteína. O mesmo comportamento é observado para a beclina-1 nas dose e tempos mais altos que foram estudados neste trabalho.

Na menor concentração testada, a expressão da beclina-1 diminuiu em ambos processos celulares estudados, o que indica um *feedback negativo* das células de Muller para reduzir a taxa de autofagia de organelas, talvez como uma resposta também neuroprotetora ao BVZ.

Sabemos que a morte celular é um evento fisiológico para renovação do organismo ⁽⁵⁴⁾. A diminuição da transcrição da beclina-1 e o aumento da tradução caspase-3, até mesmo nos controles, podem inferir que as células estejam no meio desta renovação celular.

Ferriero, em 2005, afirmou que os genes envolvidos na angiogênese e que mediam a neuroproteção, como fator de indução de hipóxia, VEGF e Eritropoetina estão superexpressos durante a lesão isquêmica e reparo neural ⁽¹³³⁾.

Jee e Lee, 2012, também aventaram a correlação da abstenção do VEGF pelo BVZ estar intimamente ligada com a morte celular programada. Em um estudo com coelhos, a morte celular foi avaliada pela marcação imunohistoquímica da caspase-3 e -9 por TUNEL. Os animais tratados com BVZ apresentaram uma maior quantidade de células em apoptose do que o grupo controle e uma menor intensidade de marcação e expressão gênica para VEGF também foram observadas ⁽¹³⁴⁾.

Em contrapartida, Turcku e col, 2013, avaliaram os efeitos do BVZ na morte celular por meio de estudos histopatológicos e concluíram que o tratamento com o BVZ não aumenta a intensidade de marcação de caspase-3 ou p53 nos coelhos tratados ⁽¹³⁵⁾.

A autofagia e apoptose são eventos importantes para o desenvolvimento e remodelamento de tecido normal patológico. Em fotorreceptores degenerados, a autofagia parece participar da morte celular iniciando a apoptose ^(58, 136).

O nosso grupo, em um estudo recente, mostrou que não há interferência do BVZ na morte celular, tanto por autofagia quanto por apoptose em explantes de retinas, pois a análise da expressão gênica e da síntese proteica de beclina-1 e caspase-3 foram semelhantes entre os grupos controle e tratado com o BVZ ⁽³⁶⁾.

Recentemente, nós publicamos o primeiro estudo avaliando os efeitos do BVZ em proteoglicanos de matriz extracelular, fosfacam e neurocam, e de superfície celular, sindecam-3, que são capazes de, entre outras atividades fisiológicas, modular a neurogênese. Demonstramos, em explantes de retinas de ratos prematuros, que houve uma diminuição da transcrição e tradução do neurocam nos grupos tratados, e sugerimos que o BVZ interfere na maturação do tecido retiniano, podendo estabelecer redes neurais anormais *in vivo*. Entretanto, Inatani e col., 2000, afirmaram que o neurocam está superexpresso na isquemia retiniana ^(137, 138).

O fosfacam e o neurocam são expressos durante os primeiros dias de nascimento, atingem seus picos de expressões em P7 e depois começam a decair, ficando em níveis praticamente indetectáveis na fase adulta ⁽⁸²⁾. Em condições adultas e patológicas, eles são sintetizados pelos astrócitos e células de Müller. Devido às suas propriedades inibitórias no desenvolvimento axonal, pode-se inferir que suas expressões nessas situações estão

relacionadas à uma tentativa de limitar a extensão da lesão, tornando-a localizada e que não haja comunicação destas células com outros neurônios saudáveis. É passivo de compreender, então, que a supressão de uma molécula inibitória do tecido retiniano faz com que haja, portanto, uma rede neuronal anormal.

Os nossos resultados, nas células de Muller, mostraram que com o tratamento do BVZ, a transcrição do fosfacam diminuiu durante todos os tempos testados e concentrações de BVZ aplicadas, entretanto, de acordo com a literatura, o fosfacam deveria estar superexpresso para a proteção do tecido retiniano.

Em relação ao neurocam, o aumento da intensidade da sua marcação, sugere que as células de Muller possam proteger, *in vivo*, os neurônios em um tecido retiniano e, a diminuição da sua transcrição implica que as células buscam sempre um equilíbrio na regulação gênica de todas as proteínas envolvidas em um evento.

Observamos, ainda, que a expressão do neurocam e do VEGF não estão correlacionados no tratamento com BVZ como relacionam-se na isquemia retiniana, aonde ambos estão aumentados⁽¹³⁸⁾.

Com base no exposto, tanto os relatos da literatura quanto os nossos achados nos permite observar que, embora o BVZ possa desempenhar o seu papel desejado, que é o de inibir o VEGF, após certo tempo mediou uma resposta de modulação das células gliais.

Desta forma, é muito provável que o BVZ tenha níveis de ativação e de concentrações ótimas para diferentes genes e proteínas envolvidos nos processos entre a transcrição, tradução e maturação da proteína final, ou seja, algumas concentrações são capazes de ativar a transcrição num dado momento, mas não a tradução ou vice-versa.

Embora não tenhamos realizados estudos pós-traducionais, sabemos que na síntese de proteínas há eventos que ocorrem no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi e que são regulados de acordo com a necessidade do tecido. Portanto, além de seu efeito na tradução, não podemos descartar um possível efeito da depleção do VEGF sobre o processo de pós-traducional que ocorre nessas organelas.

Baseado nos nossos resultados e nos estudos anteriormente descritos, podemos supor que a falta do VEGF possa interferir na formação de transcritos primários, nos níveis

de manutenção do RNAm maduro dessas moléculas, nas enzimas e moléculas envolvidas na leitura dessas mensagens. No entanto, não há estudos suficientes para inferir o modelo de ação do BVZ nesses processos.

Os nossos achados mostram que a abstenção do VEGF tem ação na modulação das moléculas analisadas, tanto nos níveis dos transcritos, quanto nos níveis proteicos. Essa modulação gênica e proteica das moléculas envolvidas em diversos eventos celulares pode estar associada a uma resposta adaptativa das células da retina em reparar os efeitos provocados pela depleção de VEGF, através da indução dos mecanismos de neuroproteção, proliferação e sobrevivência celular, que as mantêm biologicamente ativas em cultura.

Futuros estudos utilizando células de Muller de glia devem ser realizados para corroborar com os achados deste trabalho. Desta forma, afirmamos que a alteração na expressão dessas moléculas evidencia o papel neuroprotetor e neurogênico do VEGF para o sistema nervoso central ao passo que, se bloqueado, sua síntese é requisitada pelas células de Müller, evidenciadas pela modulação do GFAP e caspase-3 e conseqüentemente, pelo aumento na produção do próprio VEGF.

A pesquisa e inovação de novos fármacos que visam o bloqueio dos proteoglicanos inibitórios de neuritos, como o neurocam o fosfacam, pode ser uma abordagem promissora para a regeneração neuronal.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O nosso estudo nos permite concluir que a depleção do VEGF pelo BVZ causa:

- ✓ Ação antiangiogênica em ratos, apesar de ser um anticorpo monoclonal humanizado.
- ✓ De-diferenciação nas células de Muller; via GFAP e vimentina;
- ✓ Comprometimento à neuroproteção do tecido retiniano; mediado por caspase-3, beclina-1 e fosfacam;
- ✓ Modulação da morte celular por apoptose e por autofagia;
- ✓ Estabelecimento de redes neuronais anormais, via fosfacam;
- ✓ Resposta neuroprotetora, via neurocam;

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*. 2009 Dec;88(4):495-515.
2. Wu WC, Yeh PT, Chen SN, Yang CM, Lai CC, Kuo HK. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in taiwan. *Ophthalmology*. Jan;118(1):176-83.
3. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. Jul 10;376(9735):124-36.
4. Carneiro A, Falcao M, Azevedo I, Falcao Reis F, Soares R. Multiple effects of bevacizumab in angiogenesis: implications for its use in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2009 Aug;87(5):517-23.
5. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 May;3(5):391-400.
6. Arevalo JF, Sanchez JG, Lasave AF, Wu L, Maia M, Bonafonte S, et al. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for Diabetic Retinopathy: The 2010 GLADAOF Lecture. *J Ophthalmol*. 2011;584238.
7. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2006 Oct;113(10):1695 e1-15.
8. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006 Mar;26(3):257-61.
9. Kim JH, Kim C, Lee BJ, Yu YS, Park KH, Kim KW. Absence of intravitreal bevacizumab-induced neuronal toxicity in the retina. *Neurotoxicology*. 2008 Nov;29(6):1131-5.
10. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PloS one*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2008;3(11):e3554.
11. Fusco MA, Portes AL, Allodi S, Moraes Junior HV, Monteiro ML, Miguel NC. Reduced occurrence of programmed cell death and gliosis in the retinas of juvenile rabbits after shortterm treatment with intravitreal bevacizumab. *Clinics (Sao Paulo)*. 67(1):61-7.
12. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27:563-84.
13. Inan UU, Avci B, Kusbeci T, Kaderli B, Avci R, Temel SG. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Apr;48(4):1773-81.
14. Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis*. Apr-Jun;6(2):107-14.
15. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. Feb;25(1):1-19.
16. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.
17. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):794-814.

18. Rhim T, Lee DY, Lee M. Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy. *J Control Release*. Dec 10;172(2):484-94.
19. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 1998 Mar 13;273(11):6417-23.
20. Genecopoeia.
21. Shahar J, Avery RL, Heilweil G, Barak A, Zemel E, Lewis GP, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006 Mar;26(3):262-9.
22. Farjo KM, Ma JX. The potential of nanomedicine therapies to treat neovascular disease in the retina. *J Angiogenesis Res*. 2:21.
23. Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, Pulido JS, Marler RJ. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol*. 2006 Jul;142(1):162-4.
24. Kim DW, Eum WS, Choi HS, Kim SY, An JJ, Lee SH, et al. Human brain pyridoxal-5'-phosphate phosphatase: production and characterization of monoclonal antibodies. *J Biochem Mol Biol*. 2005 Nov 30;38(6):703-8.
25. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(21):6851-5.
26. Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):951-61.
27. Miguel NC, Matsuda M, Portes AL, Allodi S, Mendez-Otero R, Puntar T, et al. In vitro effects of bevacizumab treatment on newborn rat retinal cell proliferation, death, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov;53(12):7904-11.
28. El-Mollayess GM, Nouredine BN, Bashshur ZF. Bevacizumab and neovascular age related macular degeneration: pathogenesis and treatment. *Semin Ophthalmol*. May;26(3):69-76.
29. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006 Mar;26(3):275-8.
30. Abcouwer SF, Lin CM, Wolpert EB, Shanmugam S, Schaefer EW, Freeman WM, et al. Effects of ischemic preconditioning and bevacizumab on apoptosis and vascular permeability following retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov;51(11):5920-33.
31. Chen E, Hsu J, Park CH. Acute visual acuity loss following intravitreal bevacizumab for diabetic macular edema. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2009 Jan-Feb;40(1):68-70.
32. Mansour AM, Bynoe LA, Welch JC, Pesavento R, Mahendradas P, Ziemssen F, et al. Retinal vascular events after intravitreal bevacizumab. *Acta Ophthalmol*. Nov;88(7):730-5.
33. Orozco-Hernandez A, Ortega-Larrocea X, Sanchez-Bermudez G, Garcia-Aguirre G, Canton VM, Velez-Montoya R. Acute sterile endophthalmitis following intravitreal bevacizumab: case series. *Clin Ophthalmol*. 8:1793-9.
34. Shimada N, Ohno-Matsui K, Hayashi K, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Macular detachment after successful intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. Jul;55(4):378-82.
35. Sinha S, Vashisht N, Venkatesh P, Garg SP. Managing bevacizumab-induced intraocular inflammation. *Indian J Ophthalmol*. Jul;60(4):311-3.

36. Zhang XY, Guo XF, Zhang SD, He JN, Sun CY, Zou Y, et al. Comparison of bevacizumab and ranibizumab in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Int J Ophthalmol*. 7(2):355-64.
37. Avci B, Avci R, Inan UU, Kaderli B. Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jul;50(7):3438-46.
38. Kaempf S, Johnen S, Salz AK, Weinberger A, Walter P, Thumann G. Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jul;49(7):3164-71.
39. Klettner A, Mohle F, Roeder J. Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Jun;248(6):819-24.
40. Klettner AK, Kruse ML, Meyer T, Wesch D, Kabelitz D, Roeder J. Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Dec;247(12):1601-8.
41. Peng S, Adelman RA, Rizzolo LJ. Minimal effects of VEGF and anti-VEGF drugs on the permeability or selectivity of RPE tight junctions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jun;51(6):3216-25.
42. Valenciano AI, Boya P, de la Rosa EJ. Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol*. 2009;53(8-10):1515-28.
43. Loos B, Engelbrecht AM. Cell death: a dynamic response concept. *Autophagy*. 2009 Jul;5(5):590-603.
44. Boya P, Mellen MA, de la Rosa EJ. How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct;36(Pt 5):813-7.
45. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.
46. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Szurman P, et al. Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. Jul;97(7):917-23.
47. Miguel NC, Matsuda M, Portes AL, Allodi S, Mendez-Otero R, Puntar T, et al. In vitro effects of bevacizumab treatment on newborn rat retinal cell proliferation, death, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Nov;53(12):7904-11.
48. Iandiev I, Francke M, Makarov F, Hollborn M, Uhlmann S, Wurm A, et al. Effects of intravitreal bevacizumab (Avastin) on the porcine retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Dec;249(12):1821-9.
49. Romano MR, Biagioni F, Besozzi G, Carrizzo A, Vecchione C, Fornai F, et al. Effects of bevacizumab on neuronal viability of retinal ganglion cells in rats. *Brain Res*. Oct 10;1478:55-63.
50. Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore PA. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(13):9478-87.
51. Akkoyun I, Karabay G, Haberal N, Dagdeviren A, Yilmaz G, Oto S, et al. Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol*. Sep;90(6):564-70.
52. Anai S, Sakamoto N, Sakai Y, Tanaka M, Porvasnik S, Urbanek C, et al. Dual targeting of Bcl-2 and VEGF: a potential strategy to improve therapy for prostate cancer. *Urol Oncol*. Jul-Aug;29(4):421-9.
53. Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, Hulse RP, Dersch R, Lehrling C, et al. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol*. Sep;183(3):918-29.

54. Li X, Liu X, Xu Y, He Y, Liu J, Xie M. Expression profile of apoptotic and proliferative proteins in hypoxic HUVEC treated with statins. *Int J Oncol.* Feb;46(2):677-84.
55. Park HY, Kim JH, Park CK. Neuronal cell death in the inner retina and the influence of vascular endothelial growth factor inhibition in a diabetic rat model. *Am J Pathol.* Jun;184(6):1752-62.
56. Boya P, Kroemer G. Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene.* 2009 May 28;28(21):2125-7.
57. Kelekar A. Autophagy. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1066:259-71.
58. Kunchithapautham K, Rohrer B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy.* 2007 Sep-Oct;3(5):433-41.
59. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Dec;36(12):2503-18.
60. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Sep;8(9):741-52.
61. Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem.* 2007 Apr 27;282(17):13123-32.
62. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* Nov 11;468(7321):232-43.
63. Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature.* Nov 11;468(7321):244-52.
64. Guo B, Wang Y, Hui Y, Yang X, Fan Q. Effects of anti-VEGF agents on rat retinal Muller glial cells. *Mol Vis.* 16:793-9.
65. Bailey TJ, Fossum SL, Fimbel SM, Montgomery JE, Hyde DR. The inhibitor of phagocytosis, O-phospho-L-serine, suppresses Muller glia proliferation and cone cell regeneration in the light-damaged zebrafish retina. *Exp Eye Res.* Nov;91(5):601-12.
66. Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Mar;43(3):864-9.
67. Shaw G, Weber K. The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur J Cell Biol.* 1983 May;30(2):219-32.
68. Iandiev I, Pannicke T, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Grimm C, et al. Localization of glial aquaporin-4 and Kir4.1 in the light-injured murine retina. *Neurosci Lett.* 2008 Apr 4;434(3):317-21.
69. Downie LE, Pianta MJ, Vingrys AJ, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Neuronal and glial cell changes are determined by retinal vascularization in retinopathy of prematurity. *J Comp Neurol.* 2007 Oct 1;504(4):404-17.
70. Fischer AJ, Bongini R. Turning Muller glia into neural progenitors in the retina. *Mol Neurobiol.* Dec;42(3):199-209.
71. Regatieri CV, Dreyfuss JL, Melo GB, Lavinsky D, Hossaka SK, Rodrigues EB, et al. Quantitative evaluation of experimental choroidal neovascularization by confocal scanning laser ophthalmoscopy: fluorescein angiogram parallels heparan sulfate proteoglycan expression. *Braz J Med Biol Res.* Jul;43(7):627-33.
72. Chai L, Morris JE. Heparan sulfate in the inner limiting membrane of embryonic chicken retina binds basic fibroblast growth factor to promote axonal outgrowth. *Exp Neurol.* 1999 Nov;160(1):175-85.
73. Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1994 May;125(3):669-80.

74. Inatani M, Honjo M, Oohira A, Kido N, Otori Y, Tano Y, et al. Spatiotemporal expression patterns of N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in developing retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 May;43(5):1616-21.
75. Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y, et al. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Jul;42(8):1930-8.
76. Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y. Identification of a nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, in developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Sep;40(10):2350-9.
77. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellen L, et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell.* 2006 May;10(5):625-34.
78. Letourneau PC, Condic ML, Snow DM. Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Curr Opin Genet Dev.* 1992 Aug;2(4):625-34.
79. Nishiguchi KM, Kataoka K, Kachi S, Komeima K, Terasaki H. Regulation of pathologic retinal angiogenesis in mice and inhibition of VEGF-VEGFR2 binding by soluble heparan sulfate. *PLoS One.* 5(10):e13493.
80. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol.* 2008 Oct;130(4):635-53.
81. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* May;15(5):1013-31.
82. Inatani M, Tanihara H. Proteoglycans in retina. *Prog Retin Eye Res.* 2002 Sep;21(5):429-47.
83. Tanihara H, Inatani M, Koga T, Yano T, Kimura A. Proteoglycans in the eye. *Cornea.* 2002 Oct;21(7 Suppl):S62-9.
84. Lee B, Clarke D, Al Ahmad A, Kahle M, Parham C, Auckland L, et al. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *J Clin Invest.* Aug;121(8):3005-23.
85. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):423-8.
86. Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J* 1986;236:1-14.
87. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-52.
88. Iozzo RV. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(2):165-7.
89. Woods A. Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. *J Clin Invest.* 2001 Apr;107(8):935-41.
90. Hayashi K, Madri JA, Yurchenco PD. Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(4):945-59.
91. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* Oct;277(19):3876-89.
92. Krempel PG, Matsuda M, Marquezini MV, Seixas TG, Ventura GM, Sholl-Franco A, et al. Bevacizumab reduces neurocan content and gene expression in newborn rat retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Aug;55(8):5109-15.
93. Linden R, Rehen SK, Chiarini LB, Nakatani M, Rocha M, Campos CB, et al. Death in a dish: controls of apoptosis within the developing retinal tissue. *Revista brasileira de biologia.* [Review]. 1996 Dec;56 Su 1 Pt 1:89-103.

94. Clark D, Mandal K. Treatment of retinopathy of prematurity. *Early Hum Dev.* 2008 Feb;84(2):95-9.
95. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
96. Nakauchi T, Ando A, Ueda-Yamada M, Yamazaki Y, Uyama M, Matsumura M, et al. Prevention of ornithine cytotoxicity by nonpolar side chain amino acids in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Nov;44(11):5023-8.
97. Stewart MW. Anti-vascular endothelial growth factor drug treatment of diabetic macular edema: the evolution continues. *Current diabetes reviews.* [Review]. 2012 Jul 1;8(4):237-46.
98. Klettner A, Mohle F, Roider J. Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010 Jun;248(6):819-24.
99. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, Bolz S, Tura A, Henke-Fahle S, et al. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta ophthalmologica.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Aug;88(5):e170-6.
100. Wu WC, Yeh PT, Chen SN, Yang CM, Lai CC, Kuo HK. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in taiwan. *Ophthalmology.* 2011 Jan;118(1):176-83.
101. Kim JH, Kim C, Kim JH, Lee BJ, Yu YS, Park KH, et al. Absence of intravitreal bevacizumab-induced neuronal toxicity in the retina. *Neurotoxicology.* 2008 Nov;29(6):1131-5.
102. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, Bolz S, Tura A, Henke-Fahle S, et al. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta Ophthalmol.* Aug;88(5):e170-6.
103. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental biology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Dec 1;264(1):275-88.
104. Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2006 Jul;47(7):3135-42.
105. Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American journal of pathology.* 2007 Jul;171(1):53-67.
106. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11946-50.
107. Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, LeCouter J, Campa C, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Feb;49(2):522-7.
108. Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA, Jr. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Oct;26(8):882-8.
109. Rappoport D, Morzaev D, Weiss S, Vieyra M, Nicholson JD, Leiba H, et al. Effect of intravitreal injection of bevacizumab on optic nerve head leakage and retinal ganglion cell

- survival in a mouse model of optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec;54(13):8160-71.
110. Feng F, Cheng Y, Liu QH. Bevacizumab treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Int J Ophthalmol*. 7(4):608-13.
111. Nomoto H, Shiraga F, Kuno N, Kimura E, Fujii S, Shinomiya K, et al. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Oct;50(10):4807-13.
112. Hollanders K, Van Bergen T, Van de Velde S, Sijnave D, Vandewalle E, Moons L, et al. Bevacizumab Revisited: Its Use in Different Mouse Models of Ocular Pathologies. *Curr Eye Res*. Aug 12;1-11.
113. Scott A, Powner MB, Gandhi P, Clarkin C, Gutmann DH, Johnson RS, et al. Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature. *PLoS One*. 5(7):e11863.
114. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010 Jul 10;376(9735):124-36.
115. Fusco MA, Portes ALF, Moraes Jr HV, Monteiro MLR, Allodi S, Miguel NCO. Bevacizumab reduces programmed cell death and induces gliosis without clinical abnormalities in the retina of juvenile rabbits. em publicação.
116. Kaneda S, Miyazaki D, Sasaki S, Yakura K, Terasaka Y, Miyake K, et al. Multivariate analyses of inflammatory cytokines in eyes with branch retinal vein occlusion: relationships to bevacizumab treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. May;52(6):2982-8.
117. Suzuki Y, Suzuki K, Yokoi Y, Miyagawa Y, Metoki T, Nakazawa M. Effects of intravitreal injection of bevacizumab on inflammatory cytokines in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy. *Retina*. Jan;34(1):165-71.
118. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2130-8.
119. Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, Taverniti G, D'Antuono T, Ognio E, et al. Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic program in melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 6;104(10):3996-4001.
120. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, et al. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):3890-9.
121. Gao JZ, Du JL, Wang YL, Li J, Wei LX, Guo MZ. Synergistic effects of curcumin and bevacizumab on cell signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. Jan;9(1):295-9.
122. Mansour AM, Bynoe LA, Welch JC, Pesavento R, Mahendradas P, Ziemssen F, et al. Retinal vascular events after intravitreal bevacizumab. *Acta ophthalmologica*. 2010 Nov;88(7):730-5.
123. Shimada N, Ohno-Matsui K, Hayashi K, Yoshida T, Tokoro T, Mochizuki M. Macular detachment after successful intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Japanese journal of ophthalmology*. 2011 May 27;May 27. [Epub ahead of print]
124. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2010;16:1848-53.
125. Siner JM, Jiang G, Cohen ZI, Shan P, Zhang X, Lee CG, et al. VEGF-induced heme oxygenase-1 confers cytoprotection from lethal hyperoxia in vivo. *FASEB J*. 2007 May;21(7):1422-32.

126. Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001 Oct 1;6:E72-92.
127. Cirillo G, Colangelo AM, Berbenni M, Ippolito VM, De Luca C, Verdesca F, et al. Purinergic Modulation of Spinal Neuroglial Maladaptive Plasticity Following Peripheral Nerve Injury. *Mol Neurobiol.* Oct 29.
128. Garcia M, Vecino E. Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol.* 2003 Oct;18(4):1205-18.
129. Luthra S, Narayanan R, Marques LE, Chwa M, Kim DW, Dong J, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 May-Jun;26(5):512-8.
130. Zayit-Soudry S, Zemel E, Barak A, Perlman I, Loewenstein A. Safety of intravitreal bevacizumab in the developing rabbit retina. *Retina.* 2011 Oct;31(9):1885-95.
131. Song WT, Zeng Q, Xia XB, Xia K, Pan Q. Atoh7 promotes retinal Muller cell differentiation into retinal ganglion cells. *Cytotechnology.* Aug 10.
132. Singhal S, Bhatia B, Jayaram H, Becker S, Jones MF, Cottrill PB, et al. Human Muller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. *Stem Cells Transl Med.* Mar;1(3):188-99.
133. Ferriero DM. Protecting neurons. *Epilepsia.* 2005;46 Suppl 7:45-51.
134. Jee D, Lee WK. Inhibitory effect of intravitreal injection of bevacizumab on nerve growth factor. *Curr Eye Res.* May;37(5):408-15.
135. Turkcu FM, Alp MN, Turkcu G, Kulacoglu S, Kural G. Short term apoptotic activity of intravitreal bevacizumab on rabbit retina. *Int J Ophthalmol.* 6(6):785-9.
136. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 31;102(22):7922-7.
137. Vinore SA, Youssri AI, Luna JD, Chen YS, Bhargava S, Vinore MA, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol.* 1997 Jan;12(1):99-109.
138. Cervia D, Catalani E, Dal Monte M, Casini G. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *J Neurochem.* Mar;120(5):818-29.

ANEXOS

9 ANEXOS

ANEXO I - Sequências de *primers* humanos e números no gene bank dos mesmos usados nos experimentos de PCR em Tempo Real para a linhagem celular humana MIO-M1 e ratos lister.

SIGLA		SEQUÊNCIA DE PARES DE BASES (pb)	QTDE. DE pb	ACESSO AO GENE BANK
VEGF	Senso	5' CCC ACT GAC GAG TCC AAC A 3'	91	NM_001171623.1
	Antisenso	5' TTT CTT GCG CTT TCG TTT TT 3'		
GFAP	Senso	5' TCT CTC GGA GTA TCT GGG GAA CTG 3'	78	NM_002055.4
	Antisenso	5' TTC CCT TTC CTG TCT GAG TCT CA 3'		
VIM	Senso	5' GAG AAC TTT GCC GTT GAA G 3'	70	NM_0033803.1
	Antisenso	5' TCC AGC AGC TTC CTG TAG G 3'		
BECL-1	Senso	5' TGC AAC CTT CCA CAT TC 3'	167	NM_006395.2
	Antisenso	5' TTC CAC GGG AAC ACT G 3'		
CASP-3	Senso	5' CAG TGG AGG CCG ACT TCT T 3'	121	NM_012996.5
	Antisenso	5' TGG CAC AAA GCG ACT GGA 3'		
NEUROCAM	Senso	5' TGG GTG GTT GA TGA GTG AA 3'	89	NM_005529.5
	Antisenso	5' AGC CTG AAG AAA GCA AAC CA 3'		
FOSFACAM	Senso	5' TGC CTC AGA AGA GTA TCC T 3'	189	NM_014654.3
	Antisenso	5' CTT GTC AGG CTT CTG GTA T 3'		

GAPDH	Senso	5' GCA GGG GGG AGC AAA AGG GT 3'	155	NM_002046.4
	Antisenso	5' TGG GTG GCA GTG ATG GCA TGG 3'		
VEGF ₁₂₀	Senso	5' GAG CCA GCG AAG CCA CAC T 3'	179	NM_031653.2
	Antisenso	5' GAT CAG CCC GAA GGA GAA GG 3'		
VEGF ₁₆₄	Senso	5' TGG GAC TGA AAG TGT TAG TCG 3'	201	NM_134356.1
	Antisenso	5' GGA GTT TGG CAG GAG GTT CTG 3'		
ARB	Senso	5' ACC TGG TAA CCC TGG AAG TGA 3'	130	NM_022402.2
	Antisenso	5' AGC GAA GGT CAA GCG ATA GC 3'		

ANEXO II - Tampões utilizados na técnica de Western Blotting**✓ *Tampão de Extração***

Cloreto de Guanidina: 4 M

Acetato de Sódio: 50 mM (pH=6,0)

6-amino-hexanóico: 0,1 M

EDTA: 10 mM

NEM: 1 mM

Benzamidina HCL: 5 mM

✓ *Tampão de amostra*

Solução A

Tris: 6,06 g

SDS 20%: 2 mL

H₂O q.s.p. 1000 mL

Solução A: 2,5 mL

SDS 20%: 2,5 mL

Glicerol: 2,0 mL

EDTA 0,1 M: 0,1 mL

B-mercaptoetanol: 50 µL

Loading buffer (Blue Juice 10x, Invitrogen): 50 µL

H₂O q.s.p. 18,5 mL

✓ *Lower (pH=8,8)*

Tris: 1,5 M

SDS: 0,4 %

✓ ***Upper (pH=6,8)***

Tris: 0,5 M

SDS: 0,4%

✓ ***Tampão de corrida (pH=8,8)***

Tris: 0,25 M

Glicina: 1,92 M

SDS: 1%

H₂O q.s.p. 1000 mL

✓ ***Acrilamida/Bis***

Bis: 0,8 %

Acrilamida: 30%

✓ ***Gel SDS-PAGE 6%***

Lower:

H₂O: 3,6 mL

Lower: 1,2 mL

Acrilamida/Bis: 1,2 mL

Solução de Persulfato de Amônio (APS) 10%: 38,4 µL

TEMED: 4,8 µL

Stacking/ Upper 3%:

H₂O: 2,64 mL

Upper: 1,12 mL

Acrilamida/Bis: 0,72 mL

APS 10%: 25 µL

TEMED: 5 µL

✓ ***Tampões de lavagem***

A) Solução TBS 10x (pH=7,5)

NaCl: 1,6 M

Tris: 1 M

H₂O q.s.p. 1000 mL

✓ ***Solução TBS 1x***

TBS 10x: 100 mL

H₂O q.s.p. 900 mL

B) Solução TBS 1x + Tween 20-0,1% (TBS-T)

TBS 1x: 1000 mL

Tween 20: 1 mL

C) Solução TBS1x + Tween 20-0,1% + 5% BSA

TBS-T: 200 mL

BSA: 10g

APÊNDICES

10 APÊNDICES

- **ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DESTE TRABALHO**

✓ **2012**

In Vitro Effects of Bevacizumab Treatment on Newborn Rat Retinal Cell Proliferation, Death, and Differentiation.

Autores: Nádia C. O. Miguel, Monique Matsuda, André Luís F. Portes, Silvana Allodi, Rosália Mendez-Otero, Thiago Puntar, Alfred Sholl-Franco, Paloma G. Krempel, e Mário L. R. Monteiro.

Revista: IOVS (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53:7904–7911)

DOI:10.1167/iovs.12-10283.

Publicação ganhadora do Prêmio Millus Vilela 2012.

Biochemistry and Molecular Biology

In Vitro Effects of Bevacizumab Treatment on Newborn Rat Retinal Cell Proliferation, Death, and Differentiation

Nádia C. O. Miguel,^{1,2} Monique Matsuda,² André Luís F. Portes,² Silvana Allodi,³ Rosália Mendez-Otero,⁴ Thiago Puntar,¹ Alfred Sholl-Franco,³ Paloma G. Krempel,⁴ and Mário L. R. Monteiro²

PURPOSE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important signal protein in vertebrate nervous development, promoting neurogenesis, neuronal patterning, and glial cell growth. Bevacizumab, an anti-VEGF agent, has been extensively used for controlling pathological retinal neovascularization in adult and newborn patients, although its effect on the developing retina remains largely unknown. The purpose of this study was to investigate the effect of bevacizumab on cell death, proliferation, and differentiation in newborn rat retina.

METHODS. Retinal explants of sixty 2-day-old Lister hooded rats were obtained after eye enucleation and maintained in culture media with or without bevacizumab for 2 days. Immunohistochemical staining was assessed against proliferating cell nuclear antigen (PCNA, to detect cell proliferation); caspase-3 and beclin-1 (to investigate cell death); and vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP, markers of glial cells). Gene expressions were quantified by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Results from treatment and control groups were compared.

RESULTS. No significant difference in the staining intensity (on immunohistochemistry) of PCNA, caspase-3, beclin-1, and GFAP, or in the levels of PCNA, caspase-3, beclin-1, and vimentin mRNA was observed between the groups. However, a significant increase in vimentin levels and a significant decrease in GFAP mRNA expression were observed in bevacizumab-treated retinal explants compared with controls.

CONCLUSIONS. Bevacizumab did not affect cell death or proliferation in early developing rat retina but appeared to interfere with glial cell maturation by increasing vimentin levels and downregulating GFAP gene expression. Thus, we

suggest anti-VEGF agents be used with caution in developing retinal tissue. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:7904–7911) DOI:10.1167/iovs.12-10285

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a glycoprotein that plays an important regulatory role in vascular growth in several vertebrate organ systems during development and in adulthood, influencing vessel remodeling, stabilization, and differentiation.^{1–5} Its crucial role in angiogenesis accounts for the importance VEGF plays in early vascular differentiation, wound healing, and in pathological processes such as tumor growth and retinopathies.^{4–6} The study of the role of VEGF in the pathogenesis of several pathological processes has led to the development of specific anti-VEGF agents such as bevacizumab, a humanized monoclonal antibody against all isoforms of VEGF.⁷ Bevacizumab has been approved by the Food and Drug Administration for treatment of metastatic colorectal cancer and is used worldwide in the treatment of several chronic vascular eye diseases in adults, such as diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and senile macular degeneration.^{7–10} More recently, bevacizumab has also been introduced as a clinical tool in the treatment of hyperoxia-induced vaso-obliteration followed by neovascular formation in developing eyes of premature infants with retinopathy of prematurity (ROP).^{11,12}

In addition to stimulating normal and pathological angiogenesis, VEGF plays a critical role, both neurotrophic and instructive, in neurogenesis.^{13,14} Developmental studies have shown that angiogenesis and neural cell differentiation and maturation are almost synchronous in the retina, as in the rest of the nervous system.¹⁵ The differentiation of neuronal and glial cell precursors is stimulated by several growth factors, including basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1, transforming growth factor- β , and VEGF.^{15,16}

Several studies have evaluated the effects of anti-VEGF agents on retinal tissue when used in the treatment of retinal disease. While some researchers have reported bevacizumab use to be associated with ultrastructural abnormalities in the retina of rabbits, mice and primates,^{17–19} most have failed to detect any retinal toxicity in the adult retina.^{20,21} Only two previous studies have evaluated the effect of anti-VEGF agents on the developing retina in vivo.^{22,23} Zayit-Soudry et al.²² evaluated the effect of intravitreal administration of bevacizumab on the developing retina of 11- or 25-day-old rabbits, but found no electroretinographic or morphological abnormalities; nevertheless, no quantitative analysis of cell death, proliferation, or reactive gliosis were performed. On the other hand, using quantitative immunohistochemistry, Fusco et al.²³ observed more proliferating cells, greater glial cell reactivity, and fewer cells undergoing programmed cell death in the retinas of 28-day-old rabbits injected intravitreally with

From the ¹Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; the ²Laboratory for Investigation in Ophthalmology (LIM-33), University of São Paulo Medical School São Paulo, Brazil; the ³Programa de Neurobiologia, and the ⁴Programa de Terapia Celular e Biongenharia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Supported by grants from Rio de Janeiro State Foundation for the Advancement of Science (FAPERJ) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 2011/50174-0), São Paulo, Brazil. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Submitted for publication May 28, 2012; revised August 1 and September 7, 2012; accepted November 1, 2012.

Disclosure: N.C.O. Miguel, None; M. Matsuda, None; A.L.F. Portes, None; S. Allodi, None; R. Mendez-Otero, None; T. Puntar, None; A. Sholl-Franco, None; P.G. Krempel, None; M.L.R. Monteiro, None

Corresponding author: Mário L. R. Monteiro, Av. Angélica 1757 conj 61, 01227-200, São Paulo, Brazil; mlrmonteiro@terra.com.br.

IOVS, November 2012, Vol. 53, No. 12

bevacizumab than in nontreated retinas.²³ However, while the effect was most likely the result of the pharmacological action of bevacizumab, since a sham injection in the fellow eye was not delivered, a contributory effect of the inflammation caused by the trauma of intraocular injection could not be ruled out, pointing out the need for further studies to clarify this issue.

Therefore, the purpose of this paper was to evaluate the influence of in vitro anti-VEGF bevacizumab treatment upon cell death, differentiation, and proliferation in developing rat retinal explants maintained in organotypic culture.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were performed in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as described in the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and by the National Institutes of Health, and approved by the ethics committees of animal research of our institutions.

Materials

Basal medium of Eagle (BME), HEPES, penicillin G, streptomycin sulfate, and L-glutamine were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Bevacizumab was from Genentech, Inc. (Avastin; San Francisco, CA). The RNA extraction kit (RNeasy Mini Kit) and the PCR kit (Rotor Gene SYBR Green PCR Kit) were obtained from Qiagen (São Paulo, Brazil). The reverse transcriptase kit (SuperScript II Reverse Transcriptase Kit) was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Primary mouse antibodies for antiproliferating cell nuclear antigen (PCNA) and antivimentin were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Primary antibody anti-beclin-1 and antiglial fibrillary acidic protein (GFAP) were from Chemicon International, Inc. (Temecula, CA). Primary antibody anti-caspase-3 was obtained from Merck Millipore (Life Science division of Merck KGaA, Germany). Fluorescent secondary antibodies, anti-rabbit IgG CY3 conjugate and anti-mouse IgG CY3 conjugate, were from Sigma-Aldrich. All other reagents were of analytical grade.

Animals

Sixty newborn 10-g Lister hooded rats were used. The matrices were kept under a 12/12-hour light/dark cycle with free access to water and food while nursing.

Retinal Tissue Culture

Rat retinal explants were prepared as described elsewhere.²⁴ Briefly, 2-day-old rats were killed by decapitation, the eyeballs were removed, and the retinas dissected free from scleral tissue and RPE using a calcium- and magnesium-free balanced salt solution (CMF). The retinas were cut into fragments of approximately 1 mm² in complete BME supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 100 U/mL penicillin G, 20 mM HEPES, and 5% fetal calf serum. The retinal explants were maintained in 25-mL tight-lidded Erlenmeyer flasks and incubated at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in an orbital shaker at 80 to 90 rpm. After dissection, some explants were assigned as controls while the remainder received culture medium, with or without the addition of 0.5 mg/mL bevacizumab. After 48 hours, retinal explants were either fixed in paraformaldehyde for immunohistochemistry or immersed in RNA stabilization agent (RNAlater; Qiagen) for quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR).

Histological Procedures

The retinal explants were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.4, for 1 hour, followed by immersion in a 30% sucrose solution in phosphate buffer. Tissue orientation was

In Vitro Effects of Bevacizumab Treatment 7905

verified under a stereoscopic microscope in aluminum chambers filled with optimum cutting temperature compound. Cross-sections that were 10-µm thick were prepared with a cryostat (Leica CM3000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), mounted on poly-L-lysine-coated slides, and maintained at -20°C until processing. The orientation procedure ensured that sectioning through the tissue was almost exactly orthogonal to the surface of the retina.

Immunohistochemistry

For immunodetection, sections were incubated with 0.1% Triton in PBS, washed once with PBS/Triton, and treated for 60 minutes at room temperature with a blocking solution (10% bovine serum albumin, BSA) diluted in PBS. After blocking, sections were incubated overnight at 4°C with primary and secondary antibodies at the suggested dilution (1:100 for anti-PCNA, anti-beclin-1, anti-vimentin and anti-GFAP; 1:10 for anti-caspase 3) in 5% BSA diluted in PBS. Further processing was done by incubation for 2 hours at room temperature with specific fluorescent secondary antibodies (anti-rabbit IgG CY3 conjugate and anti-mouse IgG CY3 conjugate) diluted in 1% PBS-BSA. After the reactions, preparations using fluorescent-conjugated secondary antibodies were mounted in mounting medium (Fluoromount Aqueous Mounting Medium; Sigma-Aldrich) and conserved at 4°C in a darkened refrigerator. Control sections were processed in the absence of primary antibodies (data not shown).

The sections were observed, first under a conventional fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss, Baltimore, MD), then under a confocal microscope (Leica TCS-SP5; Leica Microsystems) at 543-nm wavelength of excitation for the CY3 fluorochrome. All images were acquired at a resolution of 1024 × 1024 pixels, using 60% laser transmittance, 0.5-µm optical slices, and 2-minute scanning-time in the same value of the detector gain. Negative and positive controls for the reactions were prepared (data not shown). Sections containing the central or peripheral retinal areas from treated and control eyes were evaluated both under the light microscope (63× objective) and the confocal microscope. Five fields of each section of the retina (25 fields of treated and control retinas) were chosen at random.

RT-PCR

For quantitative RT-PCR, total RNA was isolated from rat retinal explants using an RNA extraction kit (Qiagen). Subsequently, cDNAs were generated from 2 µg of total RNA using a reverse transcriptase kit (Invitrogen). The resulting cDNA was subjected to a 40-cycle PCR amplification using the manufacturer's PCR kit (Qiagen) protocol, quantifying PCNA, caspase-3, beclin-1, vimentin, and GFAP transcripts.

For each gene analysis, three replicates of the *ARBP* gene were run. *ARBP* was used as endogenous reference gene as it did not exhibit significant expression abnormalities in any group (data not shown). The standard curves for each gene had adequate slopes, indicating the efficiency of amplification for PCNA, caspase-3, beclin-1, vimentin, and GFAP. The relative quantification method ($\Delta\Delta C_t$) was used, with the ratio of target mRNA, normalized with respect to *ARBP* mRNA and relative to a calibrator sample using high resolution melting analysis software (Rotor-Gene ScreenClust HRM; Qiagen).

Statistical Analysis

The results from the two groups (control and treatment) were expressed as mean ± standard error of mean (SEM) and compared using either Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U*-test, depending on adherence to the normality assumption. The level of statistical significance was set at 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

In retinas of postnatal vertebrates, such as those used in the present study, the cell population doubling time is 18 hours in

vivo, as demonstrated elsewhere.²⁵ Our retinal explants displayed adequate histological organization characterized by nuclear layers alternating with plexiform layers. Matching results from previous studies,²⁶ within the period of culture (48 hours) no noticeable changes occurred in either general structure or lamination of the retinal tissue as compared to the retina in situ (data not shown). The maintenance of an adequate histological organization in our organotypic cultures is a strong indicator of the validity of the study model.

Figure 1 displays immunohistochemical findings for the two groups (treated and untreated) with regard to PCNA, caspase-3, beclin-1, vimentin, and GFAP. Figure 2 shows quantitative immunohistochemical findings, with bar graphs for each group. No significant difference in labeling for PCNA, caspase-3, beclin-1, and GFAP was observed between the groups. However, vimentin antibody levels were significantly higher in bevacizumab-treated retinas (0.24 ± 0.007) than in controls (0.11 ± 0.055 ; $P = 0.016$).

Figure 3 is a bar graph of the RNA expression for beclin-1, PCNA, vimentin, and GFAP. Treatment with bevacizumab did not affect the mRNA expression for caspase-3, beclin-1, PCNA, and vimentin since similar mRNA levels were observed in both groups. However, the GFAP mRNA expression was significantly decreased in bevacizumab-treated retinas (0.24 ± 0.04) compared with controls (0.87 ± 0.21 , $P = 0.001$; Fig. 3), indicating downregulation of the mRNA for GFAP.

DISCUSSION

Over the last decade, the recognition of the role of VEGF in a wide range of retinal vascular diseases has led physicians to employ anti-VEGF agents, including bevacizumab, in the intravitreal treatment of a large number of vasoproliferative ocular disorders.²⁷ Ever since the introduction of bevacizumab as a therapeutic choice, its possible toxicity to the retina has been an issue of great concern and object of intense research.^{28,29} Clinical and histological studies testing the effect of bevacizumab on rabbit retinal tissue have failed to show tissue toxicity.^{21,30} Nevertheless, most safety studies published to date have evaluated the effect of bevacizumab in adult animals, rather than assessing its safety profile in the developing retina.^{17,20,21,31,32} During retinal development, VEGF is expressed by astrocytes in the retinal ganglion cell layer, by Müller cells, and other cells of the inner nuclear layer and by RPE cells.^{33,34} It has been suggested that VEGF may act as a neuroprotective and neurotrophic factor for retinal cells, influencing neuronal growth, differentiation, and survival.^{13,35} Therefore, further studies are needed to investigate the effect of anti-VEGF drugs on the developing retina.

Zayit-Soudry et al.²² investigated the effect of the drug injected in 11-day-old and 25-day-old rabbits but found no retinal function abnormalities in the electroretinograms and visual-evoked potentials of bevacizumab-injected eyes compared with contralateral control eyes. No structural retinal damage and no increase in GFAP immunoreactivity was observed in treated eyes compared with controls. However, no quantitative analyses of cell death, proliferation, and gliosis were performed.²² On the other hand, Fusco et al.²³ evaluated juvenile rabbits treated with bevacizumab intravitreally in one eye while the contralateral eye was assigned as control. Immunohistochemistry revealed fewer cells undergoing programmed cell death, more proliferating cells, and increased reactivity of glial cells in bevacizumab-treated eyes compared with controls. These findings suggest that VEGF could play an important role in the control of retinal cell differentiation and death. The observation of gliosis also suggests that the intravitreal use of this anti-VEGF agent is not completely risk-

free. Nevertheless, a possible influence of the injection procedure could not be ruled out.²³

In the current study, we moved one step further in the analysis by investigating the effect of bevacizumab using an in vitro-organotypic culture of developing retina. To accomplish this, we used explants of developing rat retina, which provide an excellent model to study mechanisms of proliferation, cell death, and differentiation in a complex and highly structured tissue, provided the spatial distribution of the various cell types, the neurochemical circuitry, and the extracellular matrix microenvironment are preserved.³⁶ Explants of newborn Lister hooded rat retina, as used in this study, are composed of two major cellular strata separated by an emerging layer of processes. The innermost cellular stratum represents the ganglion cell layer,³⁷ while the outer cellular stratum consists mostly of neuroblasts.²⁵

In our study, neither immunohistochemistry nor RT-PCR revealed any differences in cell proliferation, apoptosis, and autophagy in bevacizumab-treated retinas compared with controls. Furthermore, no difference in gene expression for PCNA, caspase-3, and beclin-1 was found (Fig. 3). The results indicate that, at the stage of development evaluated in our study (48 hours postnatal), a single dose of bevacizumab probably does not interfere with retinal cell death or proliferation, in contrast with our previous findings for juvenile rabbits. However, the present findings do not rule out interference at a later stage of development. Indeed, our previous experiments with 28-day-old rabbits centered on a development phase entirely different from the postnatal stage (2 to 4 days) evaluated in the present study.

However, the finding of a significant increase in vimentin filament in eyes treated with bevacizumab indicates that the substance does in fact interfere with the maturation of retinal glial cells. Vimentin is expressed in processes of Müller glial cells and in retinal astrocytes from the early stages of postnatal retinal development into adulthood.³⁸ Shaw et al.³⁸ studied rat retina structure between embryonic day 14 and adult age based on the expression of antibodies, including those specific for vimentin and GFAP. Vimentin could be detected in radial processes throughout the retina at all stages studied. These processes are believed to correspond to ventriculocytes in the developing retina and to Müller cells in the mature retina.³⁸ The two filaments are observed in coexpression from the embryonic stage to adult age, although, as shown by DeGuevara et al.,³⁹ vimentin is expressed earlier in retinal development than GFAP, particularly in Müller cells. The significant increase in vimentin filament and the downregulation of GFAP gene expression observed in the current study suggests that bevacizumab causes a delay in the maturation of rat glial cells. The high levels of vimentin, despite the absence of upregulation of its regulating gene, are possibly the result of accumulation (or slower degradation) of the filament in the tissue. The normal levels of GFAP despite the downregulation of its gene also points to an interference of bevacizumab in the maturation of rat retina.

Previous reports have considered, but not confirmed, the possibility that anti-VEGF antibodies might induce Müller cell gliosis.^{14,40} Guo et al.¹⁴ evaluated the effect of bevacizumab on cultured rat retinal Müller glial cells as well as in vivo in adult rats injected intravitreally. The authors concluded that bevacizumab exerts no inhibition of rat retinal Müller glial cells. Landiev et al.⁴⁰ evaluated the effect of bevacizumab on the retina of adult pigs and concluded that a single intravitreal injection of bevacizumab does not induce gliosis. However, both studies evaluated retinal glial cells of adult animals and their findings cannot be extrapolated to the developing retina. The delayed maturation of very early developmental rat retinal glial cells reported in the current study is in agreement with

FIGURE 1. Confocal laser scanning photomicrographs of bevacizumab-treated and control retinal explants stained immunohistochemically. (A) PCNA. (B) Caspase. (C) Beclin-1. (D) Vimentin. (E) GFAP. GCL, ganglion cell layer.

FIGURE 2. Bar graphs for bevacizumab-treated and control retinal explants showing the intensity of immunofluorescence labeling antibodies. (A) PCNA. (B) Caspase-3. (C) Beclin-1. (D) Vimentin. (E) GFAP.

our previous observation of increased levels of GFAP (a Müller cell cytoskeleton protein expressed at a later stage) in the retina of juvenile rabbits submitted to intravitreal bevacizumab injection.²⁵ Since VEGF is known for its importance to the maturation and differentiation of the nervous system, the observation that anti-VEGF bevacizumab treatment influences Müller cell biology, especially during development and maturation, is not surprising.

It may be argued that bevacizumab might not be effective in rat retina. Bevacizumab is a humanized variant of the anti-VEGF-A murine antibody A.4.6.1, originally described as effective against all isoforms of VEGF in the rat.⁴¹ It has been considered as a species-specific antibody having little interaction with murine VEGF-A.⁴² However, Bock et al.⁴³ reported that bevacizumab had the ability to bind to murine VEGF-A in three independent molecular biological assays (Western blot analysis, ELISA, and BiAcCore assay). Furthermore, several studies have indicated bevacizumab is effective in the rat based on animal studies investigating its influence on corneal angiogenesis,^{45–46} retinal and choroidal vessels,^{19,47} and rat retinal cell culture.⁴⁸ Therefore, although bevacizumab may

not have the same binding affinity to VEGF in rats as it does in humans, there is enough evidence to indicate that bevacizumab is active in rat models, as observed in our study.

Our current results, as well as the findings of previous studies, suggest that the use of this anti-VEGF agent in immature eyes may not be risk-free. While the lack of apoptosis in our results might be viewed as a point in favor of the safety of the drug, the interference in vimentin and GFAP metabolism does indicate a possible interference in early retinal maturation, particularly of Müller glial cells. Since glial cells provide physical scaffold for retinal organization and contribute to the removal and recycling of neurotransmitters,⁴⁹ which strongly impacts neurogenesis, disturbance in its differentiation might therefore interfere on other retinal cell development. This concern is addressed in the particular case of preterm babies suffering from ROP, a leading cause of lifelong visual impairment and blindness in premature babies.⁵⁰ In these patients, the retina is also under development, and the blockage of VEGF as well as the potential side effects of anti-VEGF drugs such as bevacizumab, remain unknown.⁵⁰ To our knowledge, no clinical trials monitoring preterms receiving

IOVS, November 2012, Vol. 53, No. 12

In Vitro Effects of Bevacizumab Treatment 7909

FIGURE 3. Bar graphs showing the results of mRNA transcripts in bevacizumab-treated and control retinal explants. (A) PCNA. (B) Caspase-3. (C) Beclin-1. (D) Vimentin. (E) GFAP.

local treatment with bevacizumab have been completed, and studies of the long-term effects of this drug on the developing retina are still lacking.⁵¹ Our findings reinforce the suggestion made by others⁵¹ that off-label administration of bevacizumab should be prescribed with caution in such cases.

It is also important to point out some limitations of our study. Based on previous studies on the maturation of human versus rat retinas using growth curves for rhodopsin as landmark of retinal differentiation,⁵² it is very likely that the 2- to 4-day-old rat retinas evaluated in our study are less mature than the retinas of babies with ROP. In fact, most rat experimental models of ROP analyze retinas around postnatal day 12 to 15¹⁹ when the rat retinal development is similar to that of premature infants. Therefore, the deleterious effect on vimentin and GFAP expression observed at the age addressed in our study may not apply directly to children with ROP. On the other hand, previous studies have demonstrated that vimentin and GFAP filaments are expressed in rat and human retinas from the embryonic period until the neural retina development is complete.^{53,54} It is therefore very likely that abnormalities observed in our early developing retinas may also be operating later in retinal development, particularly when bevacizumab is used in human eyes, where its anti-VEGF

activity is expected to be much greater than that observed in the rat retina. However, in order to be certain of its potential consequences to the developing retina of premature newborns suffering from retinopathy of prematurity, our findings should be complemented by other investigative approaches.

In conclusion, our study indicates that bevacizumab interferes with the early differentiation of retinal glial cells in 2-day-old Lister hooded rat explants by increasing vimentin content and downregulating the GFAP gene expression. Therefore, it should be used with caution when treating developing eyes, particularly in premature newborn infants.

References

1. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4-25.
2. Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis.* 2010;6:107-114.
3. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp Neurol.* 2004;187:246-253.
4. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial

- growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:233-235.
5. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11:617-624.
 6. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.
 7. Gunther JB, Altaweel MM. Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease. *Surv Ophthalmol*. 2009;54:372-400.
 8. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006;26:275-278.
 9. Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2006;113:1695.e1-e15.
 10. Waisbourd M, Goldstein M, Loewenstein A. Treatment of diabetic retinopathy with anti-VEGF drugs. *Acta Ophthalmol*. 2010;89:203-207.
 11. Wu WC, Yeh PT, Chen SN, Yang CM, Lai CC, Kuo HK. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in Taiwan. *Ophthalmology*. 2011;118:176-183.
 12. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011;364:603-615.
 13. Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol*. 2007;171:53-67.
 14. Guo B, Wang Y, Hui Y, Yang X, Fan Q. Effects of anti-VEGF agents on rat retinal Müller glial cells. *Mol Vis*. 2010;16:793-799.
 15. Baye LM, Link BA. Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J Neurosci*. 2007;27:10143-10152.
 16. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals*. 2005;14:207-221.
 17. Inan UU, Avci B, Kusbeci T, Kaderli B, Avci R, Temel SG. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:1773-1781.
 18. Peters S, Heiduschka P, Julien S, et al. Ultrastructural findings in the primate eye after intravitreal injection of bevacizumab. *Am J Ophthalmol*. 2007;143:995-1002.
 19. Akkoyun I, Karabay G, Haberal N, et al. Structural consequences after intravitreal bevacizumab injection without increasing apoptotic cell death in a retinopathy of prematurity mouse model. *Acta Ophthalmol*. 2012;90:564-570.
 20. Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, Pulido JS, Marler RJ. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:162-164.
 21. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:257-261.
 22. Zayit-Soudry S, Zemel E, Barak A, Perlman I, Loewenstein A. Safety of intravitreal bevacizumab in the developing rabbit retina. *Retina*. 2011;31:1885-1895.
 23. Fusco MA, Portes ALF, Allodi S, Moraes HV Jr, Monteiro MLR, Miguel NCO. Reduced occurrence of programmed cell death and gliosis in the retinas of juvenile rabbits after short-term treatment with intravitreal bevacizumab. *Clinics*. 2012;67:1-7.
 24. da Silva AG, Campello-Costa P, Linden R, Sholl-Franco A. Interleukin-4 blocks proliferation of retinal progenitor cells and increases rod photoreceptor differentiation through distinct signaling pathways. *J Neuroimmunol*. 2008;196:82-93.
 25. Alexiades MR, Cepko C. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Dev Dyn*. 1996;205:293-307.
 26. Linden R, Rehen SK, Chiarini LB. Apoptosis in developing retinal tissue. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18:133-165.
 27. Stewart MW. The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clin Proc*. 2012;87:77-88.
 28. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, et al. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta Ophthalmol*. 2010;88:e170-e176.
 29. Spandau U, Tomic Z, Ewald U, Larsson E, Akerblom H, Holmstrom G. Time to consider a new treatment protocol for aggressive posterior retinopathy of prematurity [published online ahead of print January 23, 2012]. *Acta Ophthalmol*. 2012. doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02351.x
 30. Luthra S, Narayanan R, Marques LE, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina*. 2006;26:512-518.
 31. Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA Jr. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina*. 2006;26:882-888.
 32. Shahar J, Avery RL, Heilweil G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:262-269.
 33. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol*. 2003;264:275-288.
 34. Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:3135-3142.
 35. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on Müller cells and photoreceptors. *PLoS One*. 2008;3:e3554.
 36. Guimaraes CA, Benchimol M, Amarante-Mendes GP, Linden R. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. *J Biol Chem*. 2003;278:41938-41946.
 37. Perry VH, Henderson Z, Linden R. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol*. 1983;219:356-368.
 38. Shaw G, Weber K. The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur J Cell Biol*. 1983;30:219-252.
 39. De Guevara R, Pairault C, Pinganaud G. Expression of vimentin and GFAP and development of the retina in the trout [in French]. *C R Acad Sci III*. 1994;317:737-741.
 40. Iandiev I, Francke M, Makarov F, et al. Effects of intravitreal bevacizumab (Avastin) on the porcine retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249:1821-1829.
 41. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors*. 1992;7:53-64.
 42. Yu L, Wu X, Cheng Z, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:522-527.
 43. Bock F, Onderka J, Dietrich T, et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2545-2552.

IOVS, November 2012, Vol. 53, No. 12

In Vitro Effects of Bevacizumab Treatment 7911

44. Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:281-284.
45. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol*. 2007;91:804-807.
46. Hashemian MN, Z-Mehrjardi H, Moghimi S, Tahvildari M, Mojazi-Amiri H. Prevention of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with its topical form in experimental rats. *Ophthalmic Res*. 2011;46:50-54.
47. Ma J, Zhu T, Tang X, Ye P, Zhang Z. Effect of an intravitreal injection of bevacizumab on the expression of VEGF and CD34 in the retina of diabetic rats. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2010;38:875-884.
48. Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2010;16:1848-1853.
49. Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*. 2009;54:143-160.
50. Rubaltelli DM, Hirose T. Retinopathy of prematurity update. *Int Ophthalmol Clin*. 2008;48:225-235.
51. Moshfeghi DM, Berrocal AM. Retinopathy of prematurity in the time of bevacizumab: incorporating the BEAT-ROP results into clinical practice. *Ophthalmology*. 2011;118:1227-1228.
52. Fulton AB, Akula JD, Mocko JA, et al. Retinal degenerative and hypoxic ischemic disease. *Doc Ophthalmol*. 2009;118:55-61.
53. Drager UC. Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature*. 1983;303:169-172.
54. Walcott JC, Provis JM. Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2003;31:246-249.

Bevacizumab Reduces Neurocan Content and Gene Expression in Newborn Rat Retina *In Vitro*.

Autores: Paloma G. Krempel, Monique Matsuda, Mônica V. Marquezini, Thayane G. Seixas, Grasiella M. Ventura, Alfred Sholl-Franco, Nádia C. O. Miguel, and Mário L. R. Monteiro.

Revista: IOVS (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55:5109–5115)

DOI: 10.1167/iovs.14-14466.

Publicação ganhadora do Prêmio Millus Vilela 2014.

Retinal Cell Biology

Bevacizumab Reduces Neurocan Content and Gene Expression in Newborn Rat Retina In Vitro

Paloma G. Krempel,¹ Monique Matsuda,¹ Mônica V. Marquezini,² Thayane G. Seixas,³ Grasiella M. Ventura,⁴ Alfred Sholl-Franco,⁵ Nádia C. O. Miguel,⁴ and Mário L. R. Monteiro¹

¹Laboratory of investigation in Ophthalmology (LIM-33), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

²Experimental Air Pollution Laboratory, Pathology Department, University of São Paulo Medical School and Pro-Sangue Foundation, São Paulo, Brazil

³Pharmacy College, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

⁴Program of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Laboratório de Neurogênese, Programa de Neurobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Mário L. R. Monteiro, Av. Angélica 1757 conj 61, 01227-200, São Paulo, Brazil; mlrmonteiro@terra.com.br.

Submitted: March 27, 2014

Accepted: July 12, 2014

Citation: Krempel PG, Matsuda M, Marquezini MV, et al. Bevacizumab reduces neurocan content and gene expression in newborn rat retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:5109–5115. DOI:10.1167/iov.14-14466

PURPOSE. Extracellular matrix (ECM) and cellular membrane proteoglycans (PGs) play important roles in neural differentiation and cell adhesion. Vascular endothelial growth factor, an important signal protein in vascular and retinal neural cell development, is retained in the ECM due to its high affinity for PG. Bevacizumab, an anti-VEGF agent, has been extensively used for treating retinal diseases in adult and newborn patients, although its effect on the developing retina remains largely unknown. The purpose of this study was to investigate the effect of bevacizumab on neurocan, phosphacan, and syndecan-3 PG levels in newborn rat retina.

METHODS. Retinal explants of sixty 2-day-old Lister hooded rats were obtained after eye enucleation and maintained in culture media with or without bevacizumab for 48 hours. Immunohistochemical staining was assessed against neurocan, phosphacan, and syndecan-3. Proteoglycan content was quantified based on the intensity of immunohistochemical labeling. Gene expressions were quantified by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. The results from the treatment and control groups were compared.

RESULTS. No significant difference in the staining intensity and mRNA expression of phosphacan and syndecan-3 was observed between the groups. However, a significant decrease in neurocan content and mRNA expression was observed in bevacizumab-treated retinal explants compared with controls.

CONCLUSIONS. Bevacizumab did not affect phosphacan and syndecan-3 levels but decreased neurocan content and gene expression. Therefore, it may interfere with early postnatal retinal cell differentiation. Although further studies are necessary to confirm our findings, we suggest anti-VEGF agents be used with caution in developing retinal tissue.

Keywords: bevacizumab, VEGF, proteoglycans, neurocan, phosphacan, syndecan-3, extracellular matrix, retinal cell development

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important glycoprotein during vascular development influencing vessel remodeling, stabilization, and differentiation of endothelial cells^{1–3} and modulating the vascular component of pathological processes such as tumor growth and retinopathies.^{4–6} Vascular endothelial growth factor has also been shown to play a critical role in neurogenesis, with significant neurotrophic and neuroprotector activity in the nervous system, including the retina.^{7,8} The development of anti-VEGF agents such as bevacizumab, a humanized monoclonal antibody against all isoforms of VEGF^{9,10} has allowed the use of intravitreal anti-VEGF antibody injection as an important therapy in the treatment of chronic vascular eye diseases in adults^{9,11–13} and, more recently, in the treatment of hyperoxia-induced vaso-obliteration followed by neovascular formation in developing eyes of premature infants with retinopathy of prematurity (ROP).^{14,15}

Since the adoption of anti-VEGF agents to treat retinal diseases, researchers have evaluated the possible consequences of exposure of retinal tissues to such compounds. Several animal studies using light microscopy and electrophysiological assessment of retinal function have failed to confirm retinal toxicity from bevacizumab administered intravitreally.^{16–20} On the other hand, other experimental in vivo and in vitro studies have shown ultrastructural abnormalities in the retina, including increased apoptotic activity^{21–24} and increased reactivity of glial cells²⁵ in adult retinal tissues. Furthermore, Miguel et al.²⁶ evaluated newborn rat retinal explants exposed to bevacizumab for 48 hours, and found increased vimentin labeling and a decrease of glial fibrillary acidic protein mRNA levels in treated tissue compared with controls, suggesting that the anti-VEGF activity of bevacizumab may interfere with glial cell maturation in the early stages of retinal development.

Bevacizumab Reduces Neurocan Content

IOVS | August 2014 | Vol. 55 | No. 8 | 5110

During retinal development, cellular migration, dendrites, and axon outgrowth occur through the extracellular matrix (ECM). The ECM in the central nervous system is largely devoid of cells and is filled with a network of glycoproteins, proteoglycans (PGs), and hyaluronan.²⁷ Proteoglycans are components of the ECM and the cell membrane that regulate numerous cellular processes such as adhesion and proliferation, differentiation, induction of neuritis, and neural network formation.^{28,29} Cell membrane- and ECM-bound PGs serve as coreceptors for growth factors such as VEGF, which adheres by way of its heparin-binding domain, providing a reservoir of biologically active VEGF.³⁰ Neurocan is a nervous tissue-specific PG and one of the most important chondroitin sulfate PGs in the brain.³¹ It is found throughout the retinal layers of rats during early development.³² Other important PG molecules include phosphacan, a chondroitin sulphate PG, and syndecan-3 (SDC-3), a heparin sulphate PG. The latter promotes neurite outgrowth from retinal neuronal cells when the molecule binds to VEGF or basic fibroblastic growth factor and communicates with the cytoskeleton to enhance neurite outgrowth.^{33,34}

The important interaction of VEGF with PG in the developing retina raises the possibility of adverse effects of anti-VEGF agents on the ECM and therefore on early neuritis and other retinal cell components. No previous study, however, has evaluated the effect of anti-VEGF agents on PG in the early developing retina. The purpose of this study was therefore to evaluate *in vitro* the influence of bevacizumab on neurocan, phosphacan, and syndecan-3 levels and gene expression in newborn rat retinas.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were performed in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as described in the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and by the National Institutes of Health, and approved by the ethics committees of animal research of our institutions.

Materials

Eagle's basal medium (BME), HEPES, penicillin G, streptomycin sulfate, and L-glutamine were obtained from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Bevacizumab was from Genentech, Inc. (Avastin; San Francisco, CA, USA). The RNA extraction kit (RNeasy Mini Kit) and the PCR kit (Rotor Gene SYBR Green PCR Kit) were obtained from Qiagen (São Paulo, Brazil). The reverse transcriptase kit (SuperScript II Reverse Transcriptase Kit) was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Primary mouse antibodies for neurocan, phosphacan, and syndecan-3 were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA); Fluorescent secondary antibodies, Alexa 488 rabbit anti-goat IgG (for neurocan and phosphacan immunostaining) were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and donkey anti-goat IgG (for syndecan-3), were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Blue staining DAPI for cell nuclei labeling were from Invitrogen. All other reagents were of analytical grade.

Animals

Sixty newborn 10-g Lister hooded rats were used. The matrices were kept under a 12-hour light/dark cycle with free access to water and food while nursing.

Retinal Tissue Culture

The preparation of rat retinal explants has been described elsewhere.³⁵ Two-day-old rats were killed by decapitation, the eyeballs were removed, and the retinas dissected free from scleral tissue and RPE using a calcium- and magnesium-free balanced salt solution (CMF). The retinas were cut into fragments of approximately 1 mm² in complete BME supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 100 U/mL penicillin G, 20 mM HEPES, and 5% fetal calf serum. The retinal explants were maintained in 25-mL tight-lidded Erlenmeyer flasks and incubated at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in an orbital shaker at 80 to 90 rpm. After dissection, some explants were assigned as controls while the remainder received culture medium, with or without the addition of 0.5 mg/mL bevacizumab. After 48 hours, retinal explants were either fixed in paraformaldehyde for immunohistochemistry or immersed in RNA stabilization agent (RNAlater; Qiagen) for quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR).

Histological Procedures

The retinal explants were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.4, for 1 hour, followed by immersion in a 30% sucrose solution in phosphate buffer. Tissue orientation was verified under a stereoscopic microscope. Cross-sections that were 10-µm thick were prepared with a cryostat (Leica CM3000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), mounted on poly-L-lysine-coated slides, and maintained at -20°C until processing. The orientation procedure ensured that sectioning through the tissue was almost exactly orthogonal to the surface of the retina.

Immunohistochemistry

For immunodetection, sections were incubated with 0.1% Triton X-100 in PBS, washed once with PBS/Triton, and treated for 60 minutes at room temperature with a blocking solution (10% bovine serum albumin [BSA]) diluted in PBS. After blocking, sections were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies at 1:100 dilution (anti-neurocan: C-12 clone, anti-phosphacan: C-19 clone PTP₂ and anti-syndecan-3: sc-1110 clone; all purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in 5% BSA diluted in PBS. Further processing was done by incubation for 2 hours at room temperature with specific fluorescent secondary antibody at 1:400 dilution (donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted in 1% PBS-BSA. After the reactions, preparations using fluorescent-conjugated secondary antibodies were mounted in mounting medium (Fluoromount Aqueous Mounting Medium; Sigma-Aldrich Corp.) and conserved at 4°C in a darkened refrigerator. Negative control sections were processed in the absence of primary antibodies (data not shown).

The sections were observed, first under a conventional fluorescence microscope (Zeiss Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss Optical, Inc., Baltimore, MD, USA), then under a confocal microscope (Leica TCS-SP5; Leica Microsystems) at 543-nm wavelength of excitation for the fluorochrome used. All images were acquired at a resolution of 512 × 512 pixels, using 75% laser transmittance, 0.7-µm optical slices, and 1-minute scanning-time in the same value of the detector gain. Negative and positive controls for the reactions were prepared (data not shown). Sections containing the central or peripheral retinal areas from treated and control eyes were evaluated both under the light microscope (×63 objective) and the confocal

Bevacizumab Reduces Neurocan Content

IOVS | August 2014 | Vol. 55 | No. 8 | 5111

TABLE. Primer Sequences, Expected Product Length and GenBank Accession Number Used in RT-PCR Analysis

Gene	Primer Sequences	Length	Accession Number
Neurocan	Sense: 5'-ACC TGG TAA CCC TGG AAG TGA-3'	77 bp	NM_031653.1
	Antisense: 5'-AGC GAA GGT CAA CGC ATA GC-3'		
Phosphacan	Sense: 5'-TGG GAC TGA AAG TGT TTA GTC GTT TT-3'	78 bp	NM_001170685.1
	Antisense: 5'-GGA GTT TGG CAG GAG GTT CTG-3'		
SDC-3	Sense: 5'-CTT GGC CTC CAC GAC AAT-3'	84 bp	NM_053893.3
	Antisense: 5'-GCA CCT CCT TCC GCT CTA AGT-3'		
ARBP	Sense: 5'-ACATTTGTCTACATGGTACTCT-3'	89 bp	NM_098898.2
	Antisense: 5'-GGCGCCCTATATACGATGAC-3'		

bp, base pairs.

microscope. Three fields of each section of the retina (nine fields of treated and control retinas) were chosen at random.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

For quantitative RT-PCR, total RNA was isolated from rat retinal explants using an RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Subsequently, cDNAs were generated from 2 µg total RNA using a reverse transcriptase kit (Invitrogen). The Table shows the primer sequences used for RT-PCR amplification. Following the manufacturer's PCR kit (Qiagen) protocol, the resulting cDNA was submitted to a 40-cycle PCR amplification in order to quantify neurocan, phosphacan, and syndecan-3 transcripts. For each gene analysis, three replicates of the acidic ribosomal phosphoprotein (*ARBP*) gene were run. We used *ARBP* as an endogenous reference gene due to the absence of significant expression abnormalities from all groups (data not shown).

Adequate standard curve slopes for each gene indicated efficient amplification of neurocan, phosphacan, and syndecan-3. The relative quantification method ($\Delta\Delta C_t$) was used, with the ratio of target mRNA, normalized with respect to *ARBP* mRNA and relative to a calibrator sample using high-resolution melting analysis software (Rotor-Gene ScreenClust HRM; Qiagen).

Statistical Analysis

The results from the two groups (control and treatment) were expressed as median and interquartile range (IQR) and compared using the Mann-Whitney *U* test. The level of statistical significance was set at 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Our retinal explants displayed adequate histological organization with nuclear layers alternating with plexiform layers. Within the period of culture (48 hours), no noticeable changes occurred in either general structure or lamination of the retinal tissue as compared to the retina in situ (data not shown), similarly to what was observed in previous studies.³⁶ The maintenance of an adequate histological organization is a strong indication of the validity of the study model.

The immunohistochemical findings for the two groups (bevacizumab-treated and untreated) with regard to neurocan, phosphacan, and SDC-3 levels are displayed in Figure 1. Figure 2 shows quantitative immunohistochemical findings, with box plot graphs for each group. No significant difference in labeling was observed between the groups with regard to phosphacan (median = 0.26 and IQR = 0.32 in the study group versus median = 0.48 and IQR = 1.59 in the control group; $P = 0.361$) or syndecan-3 (median = 0.36 and IQR = 0.36 in the study group versus median = 0.24 and IQR = 0.25 in the control

group; $P = 0.075$). However, neurocan antibody levels were significantly lower in bevacizumab-treated retinas (median = 0.16, IQR = 0.46) than in controls (median = 1.41, IQR = 1.74; $P = 0.028$).

Figure 3 shows box plot graphs of the mRNA expression for neurocan, phosphacan, and syndecan-3. Bevacizumab treatment did not affect the mRNA expression for phosphacan (median = 0.53 and IQR = 0.11 in the study group versus median = 0.99 and IQR = 0.88 in the control group; $P = 0.221$) or syndecan-3 (median = 0.89 and IQR = 3.45 in the study group versus median = 0.07 and IQR = 0.05 in the control group; $P = 0.05$), with similar mRNA levels in the two groups. However, the neurocan mRNA content was significantly decreased in bevacizumab-treated retinas (median = 0.54,

FIGURE 1. Confocal laser scanning photomicrographs of bevacizumab-treated and control retinal explants stained (in green) immunohistochemically against: (A) neurocan, (B) phosphacan, and (C) syndecan-3. A significant reduction in immunohistochemical staining (in green) for neurocan in the bevacizumab-treated compared with the control group was observed while no significant difference occurred in both groups regarding phosphacan and syndecan-3 staining. GCL, ganglion cell layer.

FIGURE 2. Bar graphs for bevacizumab-treated and control retinal explants showing the intensity of immunofluorescence labeling antibodies against: (A) neurocan, (B) phosphacan, and (C) syndecan-3.

IQR = 0.20) compared with controls (median = 1.17, IQR = 0.28, $P = 0.014$).

DISCUSSION

For many years bevacizumab has been used as a therapeutic choice for a wide array of retinal diseases, although its possible toxicity to the retina has been an issue of much concern, particularly when used in children.^{57,58} Despite that concern, studies in general have failed to show significant toxicity to the retina; on histologic or electrophysiological analysis of adult^{16-19,21} or juvenile²⁰ animals or in cultured adult human retinal pigmented cells,³⁹ human vascular endothelial cells,³⁹ or adult rat retinal neurosensory cells.³⁹

However, other experimental animal studies have concluded that bevacizumab is not completely innocuous and can induce adverse structural and functional changes in retinal tissue. Inan et al.²¹ found mitochondrial disruption in the inner segments of photoreceptors on electron microscopy and intense apoptotic expression in the retina after intravitreal bevacizumab injection in adult rabbits. Avci et al.²² found that

bevacizumab caused a significant increase in apoptotic activity in rabbit photoreceptor cells. Using TUNEL assays and caspase-3 immunostaining, Jee et al.²⁴ observed significantly more apoptotic activity in bevacizumab-injected eyes of adult rabbits than in controls. Likewise, juvenile rabbits injected intravitreally with bevacizumab by Fusco et al.⁴⁰ displayed more apoptotic activity and gliosis in the retina than untreated controls.

Studies in vitro have also detected adverse effects of bevacizumab. Chen et al.⁴¹ showed that treatment with bevacizumab induced an epithelial-to-mesenchymal transition in the lineage of human retinal pigment epithelium cells (ARPE 19) by upregulation of the connective tissue growth factor, a profibrotic factor associated with the process of fibrosis.⁴² Using the same cell line, Schnichels et al.⁴³ also observed a slightly enhanced effect on cell death after bevacizumab treatment. Cell death and reduced viability were also detected for rat ganglion RGC-5 cells and mouse photoreceptor 661W cell lines.

Only one previous study has evaluated the effect of bevacizumab on early developing retinas. The subject is important since VEGF, which is expressed by astrocytes in

FIGURE 3. Bar graphs showing the results of mRNA transcripts of: (A) neurocan, (B) phosphacan, (C) syndecan-3 in bevacizumab-treated and control retinal explants.

the retinal tissue during its development,^{44,45} apparently acts as a neuroprotective and neurotrophic factor for retinal cells, influencing neuronal growth, differentiation, and survival.^{7,23} Thus, Miguel et al.²⁶ observed changes in glial maturation with upregulation of vimentin and downregulation of GFAP mRNA in retinal explants of newborn rats treated with bevacizumab for 2 days *in vitro* compared with controls.

In this study, we employed the same rat retinal explant model to investigate cell development based on the behavior of three ECM and cell membrane PGs. While phosphacan and syndecan-3 levels remained unchanged, neurocan content was significantly decreased on immunohistochemistry and mRNA content was reduced on RT-PCR in the bevacizumab-treated group compared to controls. Neurocan is a nervous tissue-specific molecule, a major constituent of PGs in the brain and also abundantly expressed in the developing rat retina.⁵⁵ Inatani et al.⁵² found that neurocan is expressed at early postnatal stages (postnatal day [P]0–P3) and increases progressively in the neural retina, reaching a peak on P7 and decreasing thereafter to a faint expression in the adult retina. The molecule is believed to have an inhibitory effect on neurite outgrowth from cultured neuronal cells^{46,47} and in postnatal

rat retinal ganglion cells.⁴⁸ It is therefore likely to play a regulatory role in the formation of the neural network.⁴⁸ Neurocan is synthesized normally by neurons⁴⁹ but also by reactive glial cells.^{50,51} Since Miguel et al.²⁶ found changes in retinal glial maturation produced by bevacizumab, it is possible that such abnormality contributed to the reduced neurocan content observed in our study.

The finding of reduced neurocan content and gene expression in rat retina exposed to anti-VEGF bevacizumab is also interesting since previous studies have demonstrated that transient retinal ischemia upregulates neurocan expression⁵² and that retinal ischemia is associated with increased VEGF content in the retina.^{53,54} Because neurocan is a nervous tissue-specific PG, changes in neurocan expression may influence retinal damage and repair in eyes with transient ischemia. Since neurocan has an inhibitory effect on neurite outgrowth,⁴⁸ it conceivably reduces neuronal plasticity thereby possibly preventing the development of abnormal neuronal networks. The significant reduction in neurocan content and gene expression observed in our study therefore suggests that bevacizumab may interfere in neurite proliferation by causing a reduction in the inhibitory effect of neurocan. However,

Bevacizumab Reduces Neurocan Content

IOVS | August 2014 | Vol. 55 | No. 8 | 5114

further studies are necessary to confirm our findings and better understand how anti-VEGF agents modify neurocan content in the developing retina.

In conclusion, our study suggests that bevacizumab influences the early development of retinal cells in 2-day-old Lister hooded rat explants by downregulating neurocan gene expression and reducing neurocan content. Bevacizumab should therefore be used with caution when treating developing eyes, especially in newborn premature infants.

Acknowledgments

Supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 2011/12271-3), São Paulo, Brazil; Rio de Janeiro State Foundation for the Advancement of Science (FAPERJ, Grant No. E-26/111.777/2012), Rio de Janeiro, Brazil; and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Grants Nos. 476392/2011-0 and 306487/2011-0). The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Disclosure: P.G. Krempel, None; M. Matsuda, None; M.V. Marquezini, None; T.G. Seixas, None; G.M. Ventura, None; A. Sholl-Franco, None; N.C. Miguel, None; M.L. Monteiro, None

References

- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4–25.
- Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis*. 2010;6:107–114.
- Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp Neurol*. 2004;187:246–253.
- Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:233–235.
- Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11:617–624.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669–676.
- Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol*. 2007;171:53–67.
- Guo B, Wang Y, Hui Y, Yang X, Fan Q. Effects of anti-VEGF agents on rat retinal Muller glial cells. *Mol Vis*. 2010;16:793–799.
- Gunther JB, Altaweel MM. Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease. *Surv Ophthalmol*. 2009;54:372–400.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:391–400.
- Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. 2006;26:275–278.
- Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2006;113:1695.e1691–1615.
- Waisbourd M, Goldstein M, Loewenstein A. Treatment of diabetic retinopathy with anti-VEGF drugs. *Acta Ophthalmol*. 2011;89:203–207.
- Wu WC, Yeh PT, Chen SN, Yang CM, Lai CC, Kuo HK. Effects and complications of bevacizumab use in patients with retinopathy of prematurity: a multicenter study in Taiwan. *Ophthalmology*. 2011;118:176–183.
- Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ; BEAT-ROP Cooperative Group. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011;364:603–615.
- Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:257–261.
- Bakri SJ, Cameron JD, McCannel CA, Pulido JS, Marler RJ. Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal bevacizumab in a rabbit model. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:162–164.
- Shahar J, Avery RL, Heilweil G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina*. 2006;26:262–269.
- Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA Jr. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina*. 2006;26:882–888.
- Zayit-Soudry S, Zemel E, Barak A, Perlman I, Loewenstein A. Safety of intravitreal bevacizumab in the developing rabbit retina. *Retina*. 2011;31:1885–1895.
- Inan UU, Avci B, Kusbeci T, Kaderli B, Avci R, Temel SG. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:1773–1781.
- Avci B, Avci R, Inan UU, Kaderli B. Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3438–3446.
- Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on Muller cells and photoreceptors. *PLoS One*. 2008;3:e3554.
- Lee D, Lee WK. Inhibitory effect of intravitreal injection of bevacizumab on nerve growth factor. *Curr Eye Res*. 2012;37:408–415.
- Fusco MA, Portes AL, Allodi S, Moraes Junior HV, Monteiro ML, Miguel NC. Reduced occurrence of programmed cell death and gliosis in the retinas of juvenile rabbits after short-term treatment with intravitreal bevacizumab. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67:61–67.
- Miguel NC, Matsuda M, Portes AL, et al. In vitro effects of bevacizumab treatment on newborn rat retinal cell proliferation, death, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7904–7911.
- Rhodes KE, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*. 2004;204:33–48.
- Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol*. 1996;3:273–290.
- Oohira A, Katoh-Semba R, Watanabe E, Matsui F. Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci Res*. 1994;20:195–207.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267:26031–26037.
- Rauch U, Gao P, Janetzko A, et al. Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 1991;266:14785–14801.
- Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y. Identification of a nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, in developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2350–2359.
- Inatani M, Tanihara H. Proteoglycans in retina. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21:429–447.

Bevacizumab Reduces Neurocan Content

IOVS | August 2014 | Vol. 55 | No. 8 | 5115

34. Maeda N, Ishii M, Nishimura K, Kamimura K. Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem Res.* 2011;36:1228-1240.
35. da Silva AG, Campello-Costa P, Linden R, Sholl-Franco A. Interleukin-4 blocks proliferation of retinal progenitor cells and increases rod photoreceptor differentiation through distinct signaling pathways. *J Neuroimmunol.* 2008;196:82-93.
36. Linden R, Rehen SK, Chiarini LB. Apoptosis in developing retinal tissue. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:133-165.
37. Thaler S, Fiedorowicz M, Choragiewicz TJ, et al. Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage. *Acta Ophthalmol.* 2010;88:e170-e176.
38. Spandau U, Tomic Z, Ewald U, Larsson E, Akerblom H, Holmstrom G. Time to consider a new treatment protocol for aggressive posterior retinopathy of prematurity? *Acta Ophthalmol.* 2013;91:170-175.
39. Luthra S, Narayanan R, Marques LE, et al. Evaluation of in vitro effects of bevacizumab (Avastin) on retinal pigment epithelial, neurosensory retinal, and microvascular endothelial cells. *Retina.* 2006;26:512-518.
40. Fusco MA, Portes AL, Allodi S, HV, Junior Moraes Monteiro ML, Miguel NC. Reduced occurrence of programmed cell death and gliosis in the retinas of juvenile rabbits after short-term treatment with intravitreal bevacizumab. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67:61-67.
41. Chen CL, Liang CM, Chen YH, Tai MC, Lu DW, Chen JT. Bevacizumab modulates epithelial-to-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelial cells via connective tissue growth factor up-regulation. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:e389-e398.
42. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol.* 2003;81:355-363.
43. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, et al. Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol.* 2013;97:917-923.
44. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol.* 2003;264:275-288.
45. Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3135-3142.
46. Oohira A, Matsui F, Katoh-Semba R. Inhibitory effects of brain chondroitin sulfate proteoglycans on neurite outgrowth from PC12D cells. *J Neurosci.* 1991;11:822-827.
47. Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1994;125:669-680.
48. Inatani M, Honjo M, Otori Y, et al. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1930-1938.
49. Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 1996;366:34-43.
50. McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.* 1999;19:10778-10788.
51. Zhang Y, Kardaszewska AK, van Veen T, Rauch U, Perez MT. Integration between abutting retinas: role of glial structures and associated molecules at the interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:4440-4449.
52. Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y. Upregulated expression of neurocan, a nervous tissue specific proteoglycan, in transient retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2748-2754.
53. Vinore SA, Youssri AI, Luna JD, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol.* 1997;12:99-109.
54. Cervia D, Catalani E, Dal Monte M, Casini G. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *J Neurochem.* 2012;120:818-829.