

RAFAEL ANDRÉ DA SILVA

Galunisertibe atenua a transição glial-mesenquimal em células gliais de Müller

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientadora: Dânia Emi Hamassaki

Versão Parcial.

São Paulo

2021

DA SILVA, R. A. G Galunisertibe atenua a transição glial-mesenquimal em células gliais de Müller. 45 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

Diversos fatores, principalmente o envelhecimento, podem contribuir para o surgimento de membranas fibrosas na superfície interna da retina (membranas epirretinianas). A composição destas membranas mostra-se heterogênea, mas existem evidências da presença de células gliais de Müller, que sofrem uma transição glial-mesenquimal e adquirem características miofibroblásticas. Desta forma, células de Müller transdiferenciadas sintetizam em excesso componentes da matriz extracelular e podem levar à contração do tecido, descolamento da retina e perda da visão. O principal gatilho é a via de sinalização de TGF- β , cuja desregulação está associada a diversas doenças fibróticas do sistema visual. Considerando que na clínica oftalmológica ainda não existem tratamentos farmacológicos que atenuam a formação destas membranas fibróticas, neste trabalho investigamos a ação de galunisertibe (GAL), inibidor da via TGF- β que tem sido usado em ensaios clínicos, sobre a transição glial-mesenquimal e contratilidade das células de Müller da linhagem humana MIO-M1. Análises da expressão proteica e gênica foram realizadas por meio de imunofluorescência, Western blotting e qPCR. Nossos resultados apontam que GAL apresenta efeito benéfico, não demonstra citotoxicidade nas concentrações avaliadas e mantém o fenótipo das células de Müller, garantindo a expressão normal do marcador glutamina-sintetase mesmo sob influência negativa de TGF- β 1. Através da diminuição de pSMAD3, GAL foi suficiente para atenuar a expressão de α -actina do músculo liso, principal marcador miofibroblástico, evitando a contração de células de Müller em gel de colágeno. Embora mais estudos sejam necessários, esses ensaios *in vitro* sugerem que galunisertibe pode ser um potencial candidato para atenuar a formação de membranas fibrocontráteis e prevenir o descolamento da retina e consequente perda da visão.

Palavras chave: Célula de Müller. Transição glial-mesenquimal. TGF- β . Retina. Galunisertibe.

DA SILVA, R. A. Galunisertib attenuates the glial-mesenchymal transition in Müller's glial cells. 2021. 45 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

ABSTRACT

Several factors, especially aging, can contribute to the formation of fibrous membranes on the inner surface of the retina (epiretinal membranes). The composition of these membranes is heterogeneous, but there is evidence of the presence of Müller glial cells, which undergo a glial-mesenchymal transition and acquire myofibroblastic characteristics. Thus, transdifferentiated Müller cells synthesize an excess of extracellular matrix components, and may lead to tissue contraction, retinal detachment, and loss of vision. The main trigger is the TGF- β signaling pathway, whose dysregulation is associated with several fibrotic diseases of the visual system. Considering that there are still no pharmacological treatments that attenuate the formation of these fibrotic membranes in ophthalmology, we investigated the action of galunisertib (GAL), an inhibitor of the TGF- β pathway that has been used in clinical trials, on the glial-mesenchymal transition and contraction of Müller cells (MIO-M1 human lineage). Protein and gene expression analyses were performed using immunofluorescence, Western blotting, and qPCR. Our results show that GAL has a beneficial effect, does not show cytotoxicity at the concentrations evaluated and maintains the phenotype of Müller cells, ensuring the normal expression of the glutamine-synthetase marker even under the negative influence of TGF- β 1. By decreasing pSMAD3, GAL was efficient to attenuate the expression of α -smooth muscle actin, the main myofibroblastic marker, preventing the contraction of Müller cells in collagen gel. Although more studies are needed, these in vitro assays suggest that galunisertib may be a potential candidate to attenuate the formation of fibrocontractile membranes and prevent retinal detachment and consequent loss of vision.

Keywords: Müller cell. Glial-mesenchymal transition. TGF- β . Retina. Galunisertibe.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Retina

Nossa visão começa com a luz incidindo sobre um grande número de células fotossensíveis localizadas na retina. A luz é convertida em sinais elétricos que são inicialmente processados nessa estrutura e, posteriormente, no encéfalo. Desde a obra de Ramon y Cajal, mais de um século de anatomia comparada revelam uma diversidade considerável de retinas de vertebrados. Algumas retinas como as de salamandras são aparentemente simples, com pequeno número de células, se comparadas com a das aves, com complexos sinápticos espessos e maior número de corpos celulares em todas as camadas nucleares (BADEN; EULER; BERENS, 2019). A retina faz parte do Sistema Nervoso Central e é considerada a principal estrutura do olho. Topograficamente, a retina se localiza no fundo do globo ocular e forma um disco circular de aproximadamente 35 mm de diâmetro nos seres humanos. O campo circular de aproximadamente 6 mm ao redor da fóvea é considerado como retina central e, além desse ponto até a *ora serrata*, é considerado como retina periférica.

Genericamente dez principais tipos de células na retina humana são descritos, podendo ser divididos em células neuronais (bastonete, cone, célula horizontal, amácrina, bipolar e ganglionar) e células não neuronais, (célula de Müller, micróglia, astrócitos e células do epitélio pigmentado retiniano). As cinco classes de neurônios ficam distribuídas em três camadas nucleares (camada nuclear externa, ONL; camada nuclear interna, INL e camada de células ganglionares, GCL) e se comunicam através de projeções em duas camadas plexiforme, (camada plexiforme interna, IPL e camada plexiforme externa, OPL). Além dos pericários de células bipolares, horizontais e amácrinas na INL, encontramos também os das células gliais de Müller, objeto de nosso estudo e que serão descritas a seguir.

1.2 Célula Glial de Müller

As células de Müller são altamente preservadas evolutivamente, com a mesma assinatura gênica e função sendo observada em todo o reino animal, de répteis a aves e mamíferos. As células de Müller e os neurônios da retina são derivados da mesma célula progenitora, que é multipotente em todos os estágios da histogênese da retina. Durante a retinogênese, a neurogênese precede a gliogênese, como em outras partes do

SNC. Portanto, as células de Müller são consideradas o último tipo de célula diferenciada durante a retinogênese de vertebrados (COWAN et al., 2020).

As células de Müller podem ser identificadas e caracterizadas de acordo com sua localização e morfologia. No entanto, a utilização de marcadores imunoquímicos facilita o estudo dessas células. Os principais marcadores são a proteína do ciclo visual CRALBP (proteína de ligação ao retinaldeído celular), GLAST (transportador de glutamato aspartato), GS (glutamina sintetase) e o filamento intermediário de vimentina (BRINGMANN et al., 2006).

Embora seu corpo celular encontre-se na INL, a glia de Müller é o único tipo de célula que abrange todas as camadas da retina. Os processos citoplasmáticos laterais da célula da glia se expandem para as camadas plexiformes, onde formam bainhas em torno das sinapses, limitando o microambiente sináptico. Esses processos citoplasmáticos também se estendem para as camadas nucleares, onde incorporam o pericário neuronal. Além disso, contribuem para integridade das membranas limitantes externa e interna (REICHENBACH; REICHEL, 1986). Na sua porção mais interna, a retina está em íntimo contato com o vítreo e é delimitada por uma membrana limitante interna, constituída pelos pés terminais das células glias de Müller e a membrana basal, composta por proteínas da matriz extracelular que incluem membros da família de lamininas, nidogênio, colágenos IV, VI e heparan sulfato (TOFT-KEHLER; SKYTT; KOLKO, 2018). Desta forma, a presença da célula de Müller é essencial para a atividade normal da retina, devido às suas funções na manutenção estrutural, barreira hemato-retiniana e homeostase sináptica (REICHENBACH; BRINGMANN, 2020).

A célula de Müller apresenta uma relação íntima com neurônios, sendo essencial para a depuração de glutamato extracelular e para a síntese de glutamato e GABA na retina (BRINGMANN et al., 2013; VECINO et al., 2016). O glutamato é um aminoácido central para vários processos metabólicos e neurotransmissores nas células. No ciclo do glutamato da retina, o glutamato é liberado dos neurônios e os processos das células de Müller em torno da fenda sináptica transportam o glutamato extracelular para as células de Müller, principalmente por meio do transportador de aminoácido excitatório 1 ou transportador de glutamato/aspartato (GLAST) (RIEPE; NORENBURG, 1977). Ao entrar na célula de Müller, a enzima GS converte rapidamente o glutamato em glutamina.

Ao longo dos anos, novas funções foram atribuídas às células de Müller (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2017; REICHENBACH; BRINGMANN, 2013). Células de Müller podem atuar como fibras ópticas guiando a luz com perda de intensidade

mínima através da retina para as células fotorreceptoras (AGTE et al., 2011). Em várias espécies de mamíferos as densidades locais de cones e células de Müller foram descritas como sendo aproximadamente iguais, mas diferentes de bastonetes, que em geral estão presentes em maior número (LINDENAU et al., 2019).

Embora seja pouco discutido, as células de Müller estão envolvidas na fagocitose (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2017). A fagocitose é considerada o estágio final da morte celular programada e desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento do sistema visual dos vertebrados. As células de Müller são capazes de fagocitar detritos de células mortas e diversos corpos estranhos. Detritos celulares gerados durante o processo de degeneração na retina dos vertebrados são removidos por uma variedade de células, incluindo fagócitos migratórios profissionais e fagócitos estacionários não profissionais e também por células de Müller (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2017).

Células de Müller apresentam notoriedade devido sua capacidade de promover regeneração da retina (AHMAD et al., 2011; RUEDA et al., 2019). Células de Müller de mamíferos não exibem potencial neurogênico, entretanto, essas células quando enriquecidas exibem características centrais das células-tronco neurais, ou seja, a capacidade de se autorrenovar e diferenciar em linhagens neuronais e gliais (DAS et al. 2006). Além disso, a compreensão de vias de sinalização que facilitam a reentrada das células no ciclo celular, pode garantir uma nova perspectiva para gerar novas células progenitoras da retina para doenças degenerativas que causam cegueira (DEL DEBBIO et al, 2016; CHOCHAN et al., 2016).

Mais recentemente estudos têm elucidado a participação de microRNAs na regulação das respostas da célula de Muller, na manutenção da retina. Os miR-9, -125 e let-7 regulam a diferenciação de células progenitoras, enquanto miR-216 e let-7a afetam a decisão neuronal versus glial e a diferenciação final da célula de Müller (QUINTERO; LAMAS, 2017). Nosso grupo, demonstrou recentemente que let-7b e let-7c aumentam no envelhecimento do vítreo e foram expressos in vitro pelas células gliais de Müller e suas vesículas extracelulares (AKAMINE et al., 2021). Sobretudo, células de Müller apresentam funções multifacetadas no desenvolvimento e homeostase da retina normal, assim como patológica, como é o caso da formação das membranas epirretinianas

1.3 Membrana Epirretiniana

A membrana epiretiniana (ERM) é uma proliferação fibrocelular na superfície interna da retina. O desenvolvimento dessas membranas assemelha-se a um processo fibrótico, que vai desde uma desordem assintomática representando uma membrana fina e transparente (maculopatia celofane; grau 0 como proposto por Gass) até à metamorfopsia e perda visual central associada a uma membrana progressivamente espessa e contrátil (fibrose macular preretinal; grau 2). O amplo espectro de gravidade da ERM é representado por uma variedade de nomes (maculopatia celofane, fibrose epiretinal, gliose epiretinal, pucker macular e fibrose macular preretinal). A formação da ERM parece ser multifatorial e vários eventos, incluindo inflamação (JOSHI; AGRAWAL; CHRISTOFORIDIS, 2013), proliferação, migração, contratilidade celular (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2009), e diferenciação em fenótipo semelhante ao miofibroblasto (KANDA et al., 2019) podem contribuir para o seu desenvolvimento.

A prevalência das ERMs pode variar entre diferentes etnias, e uma revisão com meta-análise de estudos baseados na população mostrou uma prevalência de 9,1% na população adulta em geral (XIAO et al., 2017). O aumento da idade foi consistentemente detectado como fator de risco para o desenvolvimento da ERM em diferentes estudos epidemiológicos (CHEUNG et al., 2017; XIAO et al., 2017). A ERM pode ser dividida em idiopática (primária, iERM) e secundária a uma doença ocular existente (p.ex. retinopatia diabética), trauma, ou intervenção cirúrgica (FUNG; GALVIN; TRAN, 2021), e a via de TGF- β (fator de crescimento transformante beta) parece desempenhar um papel relevante nesse processo.

1.4 Via TGF- β

A via de sinalização do TGF- β permanece como uma das vias mais universais e conservadas no reino animal. A sinalização de TGF- β desempenha papéis essenciais no crescimento celular, migração, proliferação e morte celular, tanto durante o desenvolvimento ocular quanto na homeostase do tecido durante a idade adulta (ARK; CAO; LI, 2018; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020)

Brevemente, a ativação tem início após a ligação do TGF- β a uma combinação de receptores com atividade serina-treonina quinase. TGF- β se liga ao seu receptor tipo II (TGFRII), que fosforila e ativa o receptor tipo I (TGFRI). Este por sua vez fosforila proteínas citoplasmáticas (SMADs), SMAD2 e SMAD3, que formam complexos com SMAD4 e translocam-se para o núcleo para regular a expressão gênica. Além da

sinalização dependente de SMAD (canônica), os receptores TGF- β também ativam várias vias de sinalização que são coletivamente chamadas de sinalização independente de SMAD (não canônica). Sinalização dependente de SMAD e independente de SMAD são refinadas para gerar sinais específicos para o tipo celular ou dependentes do contexto (HATA; CHEN, 2016; MASSAGUÉ, 2000; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020)

Esta via de sinalização celular apresenta características multifuncionais que regulam vários genes relacionados à diferenciação, apoptose, migração, resposta imunológica e produção de proteínas da matriz extracelular. Além disso, a sinalização de TGF- β é bem conhecida na angiogênese, ontogenia e no crescimento do tumor. Exemplo comum no desenvolvimento embrionário, a deficiência de TGF- β conduz a graves defeitos no desenvolvimento vascular, pois é uma via que atua como um regulador chave do desenvolvimento tanto das células endoteliais vasculares quanto das células musculares lisas (GHOSH et al., 2018; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020).

1.5 Células de Müller e a via TGF- β na fibrose da retina

O aumento da atividade de TGF- β pode induzir respostas inflamatórias desfavoráveis e fibrose tecidual. A função e expressão das isoformas de TGF- β não são uniformes e totalmente compreendidos, entretanto, considerando a família TGF- β , mais de 30 isoformas foram mostradas envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos (BRANTON; KOPP, 1999; HU et al., 2018). Acredita-se que TGF- β seja o ligante mais importante na patogênese das doenças fibróticas oculares (DE GRAMONT; FAIVRE; RAYMOND, 2017). Assim como em outros tecidos, a superexpressão do TGF- β está intimamente ligada à patogênese de doenças fibróticas relacionadas à cicatrização de feridas nos tecidos oculares, que prejudicam a visão e a homeostase do tecido ocular. Em adição, TGF- β é um dos ligantes envolvidos na modulação do comportamento celular nos tecidos oculares. Isso inclui a modulação da migração e proliferação celular, morte celular, síntese de proteínas extracelular, reparo de tecidos e outros processos fisiológicos ou patológicos (DE OLIVEIRA; WILSON, 2020; SAIKA et al., 2008; WILSON, 2020, 2021).

As células de Müller na membrana limitante interna em condições patológicas podem se expandir para criar membranas fibróticas contráteis, mais frequentemente em pacientes afetados por diabetes, retinopatia vascular, lesões mecânicas ou glaucoma (EDWARDS et al., 2016). O TGF- β é o principal gatilho da mudança comportamental

das células de Müller (WU et al., 2020). TGF- β 1 e TGF- β 2 são regulados positivamente no vítreo e nas membranas epirretinianas, sugerindo um envolvimento no iERM (IANNETTI et al., 2011; MINCHIOTTI et al., 2008). O TGF- β 1 induziu a suprarregulação das fibras de estresse α -SMA que resultou na contração das células de Müller, mas uma diminuição da imunomarcação do colágeno tipos I, II e VI; por outro lado, a glia de Müller α -SMA-negativa continuou a produzir colágeno (BU et al., 2015).

Além de sintetizar e secretar diferentes tipos de colágenos, como I-VII, IX e XI, a glia de Müller   fonte importante de citocinas e fatores de crescimento, incluindo fator estimulador de col nias de granulócitos, proteína-1 quimioatrativa de monócitos, crescimento derivado de plaquetas fator-bb (PDGF-bb), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e TGF- β (EASTLAKE et al., 2016). A maioria dos fatores identificados em células humanas de Müller imortalizadas (MIO-M1) também foram detectados em espécimes de retina e 70% foram regulados positivamente na retina gli tica associada   vitreoretinopatia proliferativa, que   caracterizada por ruptura/descolamento da retina seguido por inflama o, cicatriza o de feridas, e forma o de ERM (EASTLAKE et al., 2016).

O TGF- β também induz a expressão de fatores de transcri o SNAIL, SLUG, ZEB e TWIST, que aumentam a diferencia o de miofibroblastos em uma variedade de células epiteliais (SHU; LOVICU, 2017). Foi sugerido um novo conceito de transi o glial-mesenquimal de Müller via eixo TGF- β -SNAIL como o mecanismo de diferencia o de miofibroblastos na patogênese do iERM. Entre várias citocinas pró-fibróticas, TGF- β sozinho induziu exclusivamente a expressão de marcadores de transi o epitelial-mesenquimal em células Müller. Além disso, eles sugeriram um mecanismo de auto-indu o glial de Müller que poderia facilitar e amplificar tanto a fibrogênese, via transi o glial-mesenquimal induzida por TGF- β 1/2, quanto a angiog nese, aumentando a produ o de VEGF-A (KANDA et al., 2019)

Em espécimes de iERM, estudos anteriores demonstraram que as células gliais de Müller são um dos principais componentes (EASTLAKE et al., 2016; KANDA et al., 2019; OBERSTEIN et al., 2011; WU et al., 2020; DA SILVA et al., 2021) e uma importante fonte de diferencia o de miofibroblastos, conforme observado por imunohistoquímica em ERM e *in vitro* (EASTLAKE et al., 2016; KASE et al., 2006). Além disso, as células de Müller sofrem uma gliose reativa caracterizada por hipertrofia celular, prolifera o e extensão citoplasmática, contribuindo para a forma o epirretiniana (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2009). ERMs idiopáticas mostraram

colocalizações de GFAP / CRALBP, α -SMA / CRALBP e GFAP / α -SMA, que são consistentes com a ativação e transdiferenciação de células de Müller em miofibroblastos (BU et al., 2015).

1.6 Inibidor da via TGF- β - Galunisertibe (LY2157299)

A inibição da via TGF- β é amplamente utilizada para tratamento de tumores, pois é capaz de atenuar a metástase e invasão tumoral (ALVAREZ et al., 2019; XIE et al., 2018). Diversos inibidores de TGF- β foram propostos na clínica, dentre eles estão os anticorpos monoclonais, proteínas, pequenas moléculas inibidoras da serina/treonina quinase do receptor TGF- β (TEICHER, 2020). O desenvolvimento moléculas inibidoras da via TGF- β deve ser cautelosa, pois podem causar toxicidade, especialmente levando a lesões cardíacas (KOVACS et al., 2015).

Entre as pequenas moléculas inibidoras da via TGF- β , o Galunisertibe (LY2157299 monohidrato), um medicamento desenvolvido por Eli Lilly, é um dos mais avançados e mostrou resultados interessantes em ensaios clínicos de fase II. GAL é um inibidor do TGFRI, foi sintetizado em uma abordagem convergente de quatro etapas para gerar um composto químico similar a uma molécula de adenosina trifosfato (ATP). A co-cristalização do GAL com uma subunidade recombinante de TGFRI revelou que GAL se liga ao local de ligação do ATP do TGF- β RI, impedindo a fosforilação do receptor (YINGLING et al., 2018).

O Galunisertibe (GAL) supera os outros bloqueadores de TGF- β pois a partir de estudos de dose e margem de segurança suficiente, GAL mostra-se seguro e não inclui nenhuma toxicidade cardíaca em humanos, principal preocupação com os inibidores de TGF- β de primeira geração testados na clínica (HERBERTZ et al., 2015; KOVACS et al., 2015). O GAL é estudado em diferentes contextos, patologias, organismos, *in vivo* e *in vitro* e também em diferentes concentrações, portanto deve-se levar em consideração o organismo e condição que o fármaco é testado, porque a os diferentes organismos apresentam respostas distintas (ISAKA, 2018; LUANGMONKONG et al., 2017; MAZZA et al., 2020; RANI et al., 2018; ZHANG et al., 2021)

O GAL foi utilizado em estudos de ensaios básicos e clínicos para tratamento de diversos tumores, incluindo neoplasias prostáticas e glioblastoma (ALSAFFAR et al., 2021; HERBERTZ et al., 2015). A utilização de GAL na clínica mostra-se promissor, uma vez que essa droga tem sido empregada em estudos de grandes coortes em *Clinical*

Trial de fase I e II. Nesses estudos, GAL é suficiente para aumentar a sobrevida de pacientes oncológicos e interromper o crescimento tumoral (GIANNELLI et al., 2020; RODÓN et al., 2015). Além de explorar os benefícios do fármaco, os estudos de *Clinical Trial* investigaram doses seguras e a tolerância de GAL. Os estudos apontam um perfil de toxicidade favorável de curto e longo prazo (KELLEY et al., 2019; RODON et al., 2015; RODÓN et al., 2015). Em adição, GAL tem sido investigado em condições oftalmológicas, mostrando-se pró-resolutivo (ZHANG et al., 2021; WANG et al., 2017)

3 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que GAL pode ser um potencial candidato para atenuar a formação de membranas epirretinianas e a contração do tecido retiniano, que poderiam levar ao descolamento de retina e perda da visão. Considerando que na clinica oftalmológica não existem tratamentos farmacológicos eficientes, GAL pode constituir uma alternativa para as doenças fibrocontráteis vítreo-retinianas

REFERÊNCIAS

- AGTE, S. et al. Müller Glial Cell-Provided Cellular Light Guidance through the Vital Guinea-Pig Retina. **Biophysical Journal**, v. 101,, p. 2611–2619, 2011.
- AHMAD, I. et al. Müller glia: a promising target for therapeutic regeneration.” **Investigative ophthalmology & visual science** vol. 52,8 5758-64, 2011.
- AKAMINE, P. S. et al. Age-related increase of let-7 family microRNA in rat retina and vitreous. **Experimental Eye Research**, v. 204, 2020, 2021.
- ALSAFFAR, R. M. et al. Immunomodulation: An immune regulatory mechanism in carcinoma therapeutics. **International Immunopharmacology**, v. 99, n. May, p. 107984, 2021.
- ALVAREZ, M. A. et al. TGF- β Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, p. 16–18, 2019.
- ARK, A. V.; CAO, J.; LI, X. TGF- β receptors : In and beyond TGF- β signaling. **Cellular Signalling**, v. 52, n. May, p. 112–120, 2018.
- BADEN, T.; EULER, T.; BERENS, P. Understanding the retinal basis of vision across species. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, p. 1–16, 2019.
- BEJARANO-ESCOBAR, R. et al. Muller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. **Journal of anatomy**, p. 471–483, 2017.
- BRANTON, M. H.; KOPP, J. B. TGF- β and fibrosis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 15, p. 1349–1365, 1999.
- BRINGMANN, A. et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 25, n. 4, p. 397–424, 2006.
- BRINGMANN, A. et al. GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. APR, p. 1–15, 2013.
- BRINGMANN, A.; WIEDEMANN, P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. **Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 247, n. 7, p. 865–883, 2009.
- BU, S. C. et al. Idiopathic epiretinal membrane. **Retina**, v. 34, n. 12, p. 2317–2335, 2014.
- BU, S. C. et al. Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and in Vitro Studies on the Effect of TGF- β on Müller Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 11, p. 6506–6514, 2015.
- CHEUNG, N. et al. Prevalence and risk factors for epiretinal membrane: The Singapore Epidemiology of Eye Disease study. **British Journal of Ophthalmology**, v. 101, n. 3, p. 371–376, 2017.

CHOHAN, A. et al. Müller stem cell dependent retinal regeneration. **Clinica Chimica Acta**, 2016.

CIARDIELLO, D. et al. Dual inhibition of TGF- β and AXL as a novel therapy for human colorectal adenocarcinoma with mesenchymal phenotype. **Medical Oncology**, v. 38, n. 3, p. 1–13, 2021.

COWAN, C. S. et al. Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. **Cell**, p. 1623–1640, 2020.

DA SILVA, R. A. et al. Cellular components of the idiopathic epiretinal membrane. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**. 2021.

DAS, A. V. et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. **Developmental Biology**. 2006.

DAS, A. et al. MGMT-inhibitor in combination with TGF- β RI inhibitor or CDK 4/6 inhibitor increases temozolomide sensitivity in temozolomide-resistant glioblastoma cells. **Clinical and Translational Oncology**, v. 23, n. 3, p. 612–619, 2021.

DEL DEBBIO, C. B. et al. Notch Signaling Activates Stem Cell Properties of Müller Glia through Transcriptional Regulation and Skp2-mediated Degradation of p27Kip1. **PLoS One**. 2016.

DE OLIVEIRA, R. C.; WILSON, S. E. Fibrocytes, Wound Healing, and Corneal Fibrosis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 61, n. 2, 2020.

EASTLAKE, K. et al. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. **Glia**, v. 64, n. 4, p. 495–506, 2016.

EDWARDS, M. M. et al. Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 150, p. 44–61, 2016.

FUNG, A. T.; GALVIN, J.; TRAN, T. Epiretinal membrane: A review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 49, n. 3, p. 289–308, 2021.

GHOSH, F. et al. Retinal neuroinflammatory induced neuronal degeneration - Role of toll-like receptor-4 and relationship with gliosis. **Experimental Eye Research**, v. 169, 2017, p. 99–110, 2018.

GIANNELLI, G. et al. Biomarkers and overall survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with TGF- β RI inhibitor galunisertib. **PLoS One**, p. 1–16, 2020.

HATA, A.; CHEN, Y. G. TGF- β signaling from receptors to smads. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, 2016.

HERBERTZ, S. et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate),

a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4479–4499, 2015.

HU, H. H. et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. **Chemico-Biological Interactions**, 2018.

HUANG, C. et al. Benzalkonium Chloride Induces Subconjunctival Fibrosis Through the COX-2-Modulated Activation of a TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 12, p. 8111–8122, 2014.

HUANG, H. et al. RNA-Seq reveals placental growth factor regulates the human retinal endothelial cell barrier integrity by transforming growth factor (TGF- β) signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2020.

HUANG, Y. et al. Xiaochaihu decoction relieves liver fibrosis caused by *Schistosoma japonicum* infection via the HSP47/TGF- β pathway. **Parasites & Vectors**, p. 1–12, 2020.

IANNETTI, L. et al. Role of the Intravitreal Growth Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Epiretinal Membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 5786–5789, 2011.

ISAKA, Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–13, 2018.

JOSHI, M.; AGRAWAL, S.; CHRISTOFORIDIS, J. B. Inflammatory Mechanisms of Idiopathic Epiretinal Membrane Formation. **Mediators of Inflammation**, 2013.

KANDA, A. et al. TGF- β -SNAIL axis induces Müller glial-mesenchymal transition in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

KASE, S. et al. Expression of glutamine synthetase and cell proliferation in human idiopathic epiretinal membrane. **British Journal of Ophthalmology**, v. 90, n. 1, p. 96–98, 2006.

KELLEY, R. K. et al. A Phase 2 Study of Galunisertib (TGF- β 1 Receptor Type I Inhibitor) and Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. **Clinical and Translational Gastroenterology**, p. 1–9, 2019.

KITA, T. et al. Functional Characteristics of Connective Tissue Growth Factor on Vitreoretinal Cells. **Diabetes**, v. 56, p. 1421–1428, 2007.

LIMB, G. A. et al. In Vitro Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Müller Cell Line (MIO-M1). **Investigative ophthalmology & visual science**, p. 864–869, 2002.

LINDENAU, W. et al. Cone-to-Müller cell ratio in the mammalian retina : A survey of seven mammals with different lifestyle. **Experimental Eye Research**, v. 181, p. 38–48, 2019.

- LUANGMONKONG, T. et al. Evaluating the antifibrotic potency of galunisertib in a human ex vivo model of liver fibrosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 18, p. 3107–3117, 2017.
- LUO, W. et al. Epo inhibits the fibrosis and migration of Müller glial cells induced by TGF- β and high glucose. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 254, n. 5, p. 881–890, 2016.
- LUTTY, G. A. et al. Heterogeneity in localization of isoforms of TGF-beta in human retina, vitreous, and choroid. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 34, n. 3, 1993.
- MAIER, A. et al. Anti-tumor activity of the TGF- β receptor kinase inhibitor galunisertib (LY2157299 monohydrate) in patient-derived tumor xenografts. **Cellular Oncology**, v. 3, p. 131–144, 2015.
- MASSAGUÉ, J. How cells read TGF-beta signals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 169–178, 2000.
- MATSUDA, M. et al. Cellular stress response in human Müller cells (MIO-M1) after bevacizumab treatment. **Experimental Eye Research**, v. 160, p. 1–10, 2017.
- MAZZA, G. et al. Cirrhotic Human Liver Extracellular Matrix 3D Scaffolds Promote Smad-Dependent TGF- β 1 Epithelial Mesenchymal Transition. **Cells**, p. 1–17, 2019.
- MELISI, D. et al. TGF- β receptor inhibitor galunisertib is linked to inflammation-and remodeling-related proteins in patients with pancreatic cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2019.
- MINCHIOTTI, S. et al. Human idiopathic epiretinal membranes express NGF and NGF receptors. **Retina**, v. 28, n. 4, p. 628–637, 2008.
- OBERSTEIN, S. Y. L. et al. Cell proliferation in human epiretinal membranes: characterization of cell types and correlation with disease condition and duration. **Molecular Vision**, v. 17, n.2009, p. 1794–1805, 2011.
- QUINTERO, H. LAMA, M. microRNA expression in the neural retina: Focus on Muller glia. **Journal of Neuroscience Research**. p. 1–9, 2017.
- RIEPE, R. NORENBURG, M. D. Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. **Nature**, 1977.
- RANI, B. et al. Galunisertib suppresses the staminal phenotype in hepatocellular carcinoma by modulating CD44 expression. **Cell death and disease**, 2018.
- REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. New functions of müller cells. **Glia**, v. 61, n. 5, p. 651–678, 2013.
- REICHENBACH, A.; REICHEL, W. Postnatal development of radial glial (Müller) cells of the rabbit retina. **Neuroscience Letters**, v. 71, p. 125–130, 1986.

REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Glia of the Human Retina. **American Journal of Ophthalmology**, v. 48, n. 5, p. 370–393, 2020.

RITTIÉ, L. Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. **Methods in Molecular Biology**, v. 1627, p. 287–308, 2017.

RODON, J. et al. First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 3, p. 553–560, 2015.

RODÓN, J. et al. Pharmacokinetic , pharmacodynamic and biomarker evaluation of transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor, galunisertib, in phase 1 study in patients with advanced cancer. **Investigational New Drugs**. p. 357–370, 2015.

ROYBAL, C. N. et al. Personalized Proteomics in Proliferative Vitreoretinopathy Implicate Hematopoietic Cell Recruitment and mTOR as a Therapeutic Target. **American Journal of Ophthalmology**, v. 186, p. 152–163, 2018.

RUEDA, E. M. et al. The Hippo Pathway Blocks Mammalian Retinal Müller Glial Cell Reprogramming . **Cell Reports**, p. 1637–1649, 2019.

SAIKA, S. et al. Fibrotic Disorders in the Eye: Targets of Gene therapy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 27, n. 2, p. 177–196, 2008.

KOVACS, R. J. et al. Cardiac Safety of TGF- β Receptor I Kinase Inhibitor LY2157299 Monohydrate in Cancer Patients in a First-in-Human Dose Study. **Cardiovascular Toxicology**. p. 309–323, 2015.

SEROVA, M. et al. Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in ex vivo whole tumor tissue samples from patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21614–27, 2015.

SHU, D. Y.; LOVICU, F. J. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 60, p. 44–65, 2017.

SPENDER, L. C. et al. Preclinical Evaluation of AZ12601011 and AZ12799734, Inhibitors of Transforming Growth Factor b Superfamily Type 1 Receptors. **Molecular Pharmacology**, p. 222–234, 2018.

TEICHER, B. A. TGF- β -Directed Therapeutics : 2020. **Pharmacology & Therapeutics**, 2020.

TOFT-KEHLER, A. K.; SKYTT, D. M.; KOLKO, M. A Perspective on the Müller Cell-Neuron Metabolic Partnership in the Inner Retina. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 5353–5361, 2018.

TOSI, G. M.; ORLANDINI, M.; GALVAGNI, F. The Controversial Role of TGF- β in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Pathogenesis. **International Journal of**

Molecular Sciences, p. 1–16, 2018.

TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, p. 1–38, 2020.

VECINO, E. et al. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 51, p. 1–40, 2016.

WANG, X. et al. TGF- β participates choroid neovascularization through Smad2/3-VEGF/TNF- α signaling in mice with Laser-induced wet age-related macular degeneration. **Scientific Reports**, p. 1–13, 2017.

WHEELER, S. E., LEE, N. Y. Emerging Roles of Transforming Growth Factor β Signaling in Diabetic Retinopathy. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1–4, 2016.

WILSON, S. E. Corneal myofibroblasts and fibrosis. **Experimental Eye Research**, v. 201, p. 108272, 2020.

WILSON, S. E. TGF beta-1 , -2 and -3 in the modulation of fibrosis in the cornea and other organs. **Experimental Eye Research**, v. 207, p. 108594, 2021.

WU, D. et al. Involvement of müller glial autoinduction of TGF- β in diabetic fibrovascular proliferation via glial-mesenchymal transition. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 61, n. 14, 2020.

XIAO, W. et al. Prevalence and risk factors of epiretinal membranes: a systematic review and meta-analysis of population- based studies. **BMJ Open**. 2017.

XIE, F. et al. TGF- β signaling in cancer metastasis. **Acta Biochimica Biophysica Sinica**, v. 50, 2017, p. 121–132, 2018.

YANG, H. et al. Bellidifolin Ameliorates Isoprenaline-Induced Myocardial Fibrosis by Regulating TGF- β 1/Smads and p38 Signaling and Preventing NR4A1 Cytoplasmic Localization. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1–16, 2021.

YINGLING, J. M. et al. Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- β receptor type I inhibitor. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 6659–6677, 2018.

ZHANG, B. et al. Inhibition of TGF- β 1 accelerates regeneration of fibrotic rat liver elicited by a novel two-staged hepatectomy. **Theranostics**, v. 11, n. 10, 2021.

ZHANG, Q. et al. LY2157299 Monohydrate, a TGF- β R1 Inhibitor, Suppresses Tumor Growth and Ascites Development in Ovarian Cancer. **Cancers**, p. 1–15, 2018.

ZHANG, Y. L. et al. Epigallocatechin-3-gallate increases autophagic activity attenuating TGF- β 1-induced transformation of human Tenon's fibroblasts. **Experimental Eye Research**, v. 204, 2020, p. 108447, 2021.

ZHU, W. et al. Design, synthesis, and antifibrosis evaluation of 4-(benzo-[c][1,2,5]thiadiazol-5-yl)-3(5)-(6-methyl- pyridin-2-yl) pyrazole and 3(5)-(6-

methylpyridin-2-yl)-4-(thieno-[3,2,-c]pyridin-2-yl)pyrazole derivatives.
Journal of Medicinal Chemistry, v. 180, p. 15–27, 2019.

European