



Vinicius Moraes de Paiva Roda

**Efeitos de um inibidor de Rho kinase (ROCK)
sobre células gliais de Müller – potencial utilização
para tratamento de membranas epirretinianas**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**Trabalho apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção de Título**

Vinicius Moraes de Paiva Roda

**Efeitos de um inibidor de Rho kinase (ROCK)
sobre células gliais de Müller – potencial utilização
para tratamento de membranas eprretinianas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2022

Vinicius Moraes de Paiva Roda

**Efeitos de um inibidor de Rho kinase (ROCK)
sobre células gliais de Müller – potencial utilização
para tratamento de membranas epi-retinianas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular,
Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Marinilce Fagundes dos Santos.

Versão original.

São Paulo
2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moraes de Paiva Roda, Vinicius
Efeitos de um inibidor de Rho kinase (ROCK)
sobre células gliais de Müller: potencial utilização
para tratamento de membranas epirretinianas /
Vinicius Moraes de Paiva Roda; orientadora
Marinilce Fagundes dos Santos. -- São Paulo, 2023.
60 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Rho kinase (ROCK). 2. Células gliais de
Müller. 3. Retina. 4. Membrana epirretiniana. I.
Fagundes dos Santos, Marinilce, orientador. II.
Título.



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICE III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.064/2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **075/2015/CEUA**, datado de 28/08/2015, e por solicitação da Profa. Dra. **Dânia Emi Hamassaki**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Vinícius Moraes de Paiva Roda** (Iniciação científica) ao Projeto de Pesquisa "**Degeneração e regeneração da retina e vítreo**", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 27 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Agradecimentos

Segue meus agradecimentos para:

Meu pai, Joaquim, e o meu irmão, Marcelo, por serem especiais na minha vida e me darem todo apoio possível.

Minha orientadora, Prof^a Marinilce Fagundes dos Santos, por sempre ser compreensiva e me ajudar nos momentos em que eu necessitava do seu auxílio. Agradeço também os seus conselhos, compartilhamento de seu conhecimento e de suas experiências. O trabalho desenvolvido em conjunto foi muito importante para minha formação pessoal e acadêmica.

Prof^a Dania Emi Hamassaki, por ter me aceitado desde a iniciação científica e por termos conduzido esta dissertação em colaboração. Grande parte da minha formação científica e conhecimento foi moldado pelo laboratório e, agradeço por ter aprendido muitas coisas durante todo este tempo. Gostaria de ressaltar que você sempre foi compreensiva, flexível e me deu ótimos conselhos.

Sayami, por me ensinar muita coisa da esfera acadêmica e científica enquanto estive no laboratório da prof^a Dania. Todo o seu conhecimento repassado foi essencial para mim.

Meus colegas de laboratório, Paula, Gabi, Douglas, Cilene, Júlia, Monique por sempre me ajudarem quando necessário, e também por compartilharmos nossos dias juntos e o nosso conhecimento. Em especial, agradeço ao Rafael por ter me ajudado muito no laboratório e também em questões não relacionadas ao trabalho.

Pessoal do Laboratório de células-tronco retiniana, a Prof^a Carol e a Bárbara, por sempre me darem suporte e me ajudarem quando necessário.

Gabi Malheiros, Ivanir e Kelly, por todo auxílio técnico que me deram, por todas as vezes que me ajudaram, seja em questão de experimentos, análises de resultados ou conversas sobre coisas da vida.

Pessoal do Laboratório da Prof^a Vanessa Moraes, principalmente o Nícolas, por sempre me ajudar e alegrar os meus dias.

Aos funcionários do CEFAP, principalmente Mário, Natália, Jô e Ricardo, por toda ajuda concedida em relação ao uso dos equipamentos.

Todos os funcionários do ICB-USP, agradeço demais a contribuição de vocês, mesmo que esta seja de forma indireta, tudo poderia ser mais difícil do que já foi sem a presença de vocês.

FAPESP, CNPq e CAPES por financiarem o laboratório, para compra de insumos e equipamentos, além das bolsas, tanto a minha quanto dos meus colegas.

RODA, V. M. P. Efeitos de um inibidor de Rho kinase (ROCK) sobre células gliais de Müller – potencial utilização para tratamento de membranas epirretinianas. [Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Resumo

A membrana epirretiniana é um tecido fibrocontrátil que se forma na superfície interna da retina, podendo causar desde uma deficiência visual até o descolamento da retina. As células gliais de Müller participam ativamente da formação desta membrana. Atualmente, há uma busca por novas abordagens terapêuticas que visam prevenir ou tratar as disfunções celulares envolvidas na progressão desta fibrose. A via de sinalização das GTPases Rho está envolvida na regulação de vários processos celulares que podem ser associados à membrana, como proliferação, migração e contração celulares. Em especial, a enzima Rho quinase (ROCK), efetora da GTPase RhoA, é um potencial alvo terapêutico a ser investigado. Este estudo tem como principais objetivos avaliar, em células de Müller humanas, os efeitos de um inibidor de ROCK (Y27632) sobre a viabilidade, crescimento, organização do citoesqueleto, expressão de componentes da matriz extracelular, diferenciação em miofibroblastos, migração e contratilidade. Para isso, células da linhagem MIO-M1 foram cultivadas e tratadas por diferentes períodos com o inibidor. A viabilidade foi avaliada por ensaio com 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) e pelo método de exclusão com azul de tripan. O crescimento foi avaliado por curva de crescimento e por ensaio de incorporação de BrdU. O citoesqueleto de actina foi evidenciado com faloidina fluorescente, enquanto filamentos intermediários e microtúbulos foram avaliados por imunofluorescência para vimentina e α -tubulina. A expressão gênica e proteica de colágenos I e V, laminina e fibronectina foi avaliada por rt-PCR e imunofluorescência. A migração celular direcionada e espontânea foi estudada por ensaio em câmara bipartite e por observação de células vivas em microscopia de contraste de fase, respectivamente. A contratilidade celular foi avaliada por ensaio de contração em gel de colágeno. Os resultados mostraram que a inibição de ROCK com Y27632 não alterou a viabilidade e diminuiu o crescimento e a proliferação celular após 72 h. Houve alteração da morfologia celular e da organização da actina filamentosa (F-actina), com redução do corpo celular, desaparecimento de fibras de estresse e formação de prolongamentos celulares longos e ramificados. O citoesqueleto de microtúbulos e filamentos intermediários também foi alterado, possivelmente como consequência de alterações da F-actina. O inibidor também reduziu a expressão gênica e imunorreatividade de α -actina de músculo liso, um marcador de miofibroblastos. A expressão de componentes da matriz extracelular não foi afetada pelo inibidor. A migração celular direcionada também não foi alterada, embora a contratilidade celular tenha sido substancialmente reduzida. Não foi observada migração espontânea de células MIO-M1. Em

conclusão, a inibição farmacológica de ROCK em células de Müller sugere que esta pode ser uma abordagem potencial interessante no tratamento de membranas epirretinianas, prevenindo a proliferação, contratilidade e transdiferenciação dessas células, sem alterar a viabilidade celular.

Palavras-chave: células de Müller; retina; ROCK; membrana epirretiniana

RODA, V. M. P. Effects of a Rho kinase inhibitor (ROCK) on Müller glial cells – potential use for treatment of epiretinal membranes. [Master's thesis (Masters in Life Systems Biology)] – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Abstract

The epiretinal membrane is a fibrocontractile tissue that forms on the inner surface of the retina, causing from visual impairment to retinal detachment. Müller glial cells actively participate in the formation of this membrane. Current research seeks new therapeutic approaches that aim to prevent or treat cellular dysfunctions involved in the progression of this common fibrosis. The Rho GTPases signaling pathway regulates several processes associated with the epiretinal membrane, such as cell proliferation, migration and contraction. Rho kinase (ROCK) in particular, an effector of the RhoA GTPase, is an interesting potential therapeutic target. This study aimed to evaluate, in human Müller cells, the effects of a ROCK inhibitor (Y27632) on cell viability, growth, cytoskeletal organization, expression of extracellular matrix components, myofibroblast differentiation, migration and contractility. Müller cells of the MIO-M1 lineage were cultured and treated for different periods with the inhibitor. Viability was evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay and trypan blue exclusion method. Growth was evaluated by growth curve and BrdU incorporation assay. The actin cytoskeleton was stained with fluorescent phalloidin, while intermediate filaments and microtubules were stained by immunofluorescence for vimentin and α -tubulin. Gene and protein expression of collagens I and V, laminin and fibronectin were evaluated by rt-PCR and immunofluorescence. Chemotactic and spontaneous cell migration were studied by transwell assay and time-lapse observation of live cells, respectively. Cell contractility was assessed by collagen gel contraction assay. The results showed that ROCK inhibition by Y27632 did not affect cell viability and decreased cell growth and proliferation after 72 h. There was a change in cell morphology and organization of filamentous actin (F-actin), with a reduction in the cell body, disappearance of stress fibers and formation of long, branched cell extensions. The cytoskeleton of microtubules and intermediate filaments was also affected, possibly as a consequence of F-actin alterations. The inhibitor also reduced gene expression and immunoreactivity of smooth muscle α -actin, a marker of myofibroblasts. The expression of extracellular matrix components was not affected by the inhibitor. Directed (chemotactic) cell migration was also unchanged, although cell contractility was substantially reduced. No spontaneous migration of MIO-M1 cells was observed. In conclusion, pharmacological inhibition of ROCK in Müller cells may be a potentially interesting approach to treat epiretinal membranes, preventing cell proliferation, contractility and transdifferentiation, without effects on cell viability.

Keywords: Müller glial cells; retina; ROCK; epiretinal membrane

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo da miosina II nas suas conformações inativa e ativa.....	16
Figura 2. Representação esquemática da fibra de estresse	17
Figura 3. Domínios das isoformas da proteína ROCK.....	18
Figura 4. Representação esquemática dos componentes celulares da retina e sua organização	22
Figura 5. Exemplo esquemático do surgimento e progressão de um tipo de membrana epirretiniana secundária.	24
Figura 6 Marcação das isoformas de Rho em células MIO-M1	36
Figura 7. Viabilidade celular, curva de crescimento e ensaio de proliferação em células MIO-M1 após tratamento com Y27632	38
Figura 8. Efeito de Y27632 sobre as células de Müller por ensaio de MTT	39
Figura 9. Evidenciação do citoesqueleto após tratamento com Y27632	40
Figura 10 Morfologia das células MIO-M1 em contraste de fase.....	41
Figura 11. Imunofluorescência de proteínas de matriz após inibição de ROCK com Y27632	43
Figura 12. Expressão de genes de proteínas de matriz extracelular após a inibição farmacológica de ROCK.....	44
Figura 13. Imunofluorescência de α -SMA e expressão do gene <i>ACTA2</i> após a inibição de ROCK com Y27632.....	45
Figura 14. Avaliação da migração celular por ensaio de transwell após o tratamento com Y27632	46
Figura 15. Ensaio de contração no gel de colágeno.....	47

Lista de Abreviaturas

ACTA2 - *Actin alpha 2*
ARBP - *Attachment region binding protein*
ARPE-19 - *Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19*
a-SMA - *Alpha-smooth muscle actin*
ATP - *Adenosina trifosfato*
BrdU - *5-Bromo-2'-Desoxiuridina*
Cdc 42 - *Cell division cycle 42*
CDK - *Cyclin dependent kinase*
cDNA - *DNA complementar*
COL1A1 - *Collagen type I alpha 1 chain*
COL1A2 - *Collagen type I alpha 2 chain*
COL5A2 - *Collagen type V alpha 2 chain*
Ct - *Cycle threshold*
CTGF - *Connective tissue growth factor*
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DAPK1 - *Death-associated protein kinase 1*
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
dNTP - *2' deoxynucleoside 5'-triphosphate*
DTT - *Ditiotreitol*
ELC - *Essential light chain*
FGF - *Fibroblast growth factor*
Fig - *Figura*
FN1 - *Fibronectin 1*
GDI - *Guanosine Nucleotide Dissociation Inhibitor*
GDP - *Guanosina difosfato*
GEF - *Guanosine Nucleotide Exchange Factor*
GFAP - *Glial fibrillary acid protein*
GTP - *Guanosina trifosfato*
HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
kDa - *Kilodalton*
LAMA1 - *Laminin subunit alpha 1*
LIMK1 - *LIM domain kinase 1*
MHC - *Myosin heavy chain*

MIO-M1 - *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*
MLC - *Myosin light chain*
MLCK - *Myosin Light Chain Kinase*
MLCP - *Myosin light chain phosphatase*
MRTF - *Myocardin-related transcription factor*
MTT - *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*
MYPT1 - *Myosin phosphatase target subunit 1*
PB - *Phosphate buffer*
PCR - *Polimerase chain reaction*
PDGF - *Platelet-derived growth factor*
PDR - *Proliferative diabetic retinopathy*
PFA - *Paraformaldeído*
PIPES - *1,4-Piperazinediethanesulfonic acid*
PP1c - *Protein phosphatase 1 catalytic subunit*
Rac1 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
Rho - *Ras homology*
RLC - *Regulatory light chain*
ROCK - *Rho-associated coiled-coil containing kinases*
RPE - *Retinal pigmented epithelium*
SEM - *Standard error of the mean*
Ser - *Serina*
SFB - *Soro fetal bovino*
SRF - *Serum responsive factor*
TA - *Temperatura ambiente*
TGF- β - *Transforming growth factor-beta*
Thr - *Treonina*
TNF- α - *Tumor necrosis factor-alpha*
TRITC - *Tetramethylrhodamine*
ZIPK - *Zipper-interacting protein kinase*

Sumário

1. Introdução	15
1.1 GTPases Rho e Rho quinase (ROCK)	15
1.2 ROCK1 e ROCK2	18
1.3 Inibidores de ROCK	21
1.4 Membranas epirretinianas	22
1.5 Células Gliais de Müller e membranas epirretinianas	23
1.6 Miofibroblastos e membranas epirretinianas	27
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Metodologia	30
3.1 Cultura de células de Müller	30
3.2 Curva de crescimento e viabilidade por ensaio de exclusão com azul de tripan	30
3.3 Ensaio de proliferação por incorporação de 5-Bromo-2'-Desoxiuridina (BrdU)	30
3.4 Ensaio MTT	31
3.5 Time-lapse	31
3.6 Marcação do citoesqueleto de F-actina	32
3.7 Imunofluorescência	32
3.8 Real time PCR (rt-PCR)	33
3.8.1 Extração do RNA total.....	33
3.8.2 Síntese do cDNA.....	34
3.8.3 Reação real time PCR.....	34
3.8.4 Primers.....	34
3.8.5 Análise dos dados de rt-PCR.....	35
3.9 Ensaio de migração celular por transwell	35
3.10 Ensaio de contração em gel de colágeno tipo I	36
3.10.1 Extração do colágeno tipo I da cauda de rato	36
3.10.2 Avaliação da contratilidade celular em géis de colágeno .	36

3.11 Análise estatística	37
4. Resultados	37
4.1 Isoformas RhoA e RhoB são expressas em células gliais de Müller da linhagem MIO-M1	37
4.2 Viabilidade, crescimento e proliferação celular após o tratamento com Y27632	39
4.3 Morfologia e organização do citoesqueleto após a inibição de ROCK	40
4.4 Expressão gênica e proteica de componentes da matriz extracelular após tratamento com inibidor de ROCK	44
4.5 Efeitos na expressão de α-SMA após inibição de ROCK	47
4.6 Migração celular na presença do inibidor de ROCK	48
4.7 Contratilidade celular na presença do inibidor de ROCK	48
5. Discussão	49
6. Conclusão	53
Referências	55

1. Introdução

1.1 GTPases Rho e Rho quinase (ROCK)

A família de GTPases Rho está envolvida na sinalização que regula a organização do citoesqueleto, progressão do ciclo celular, polaridade, tráfego de vesículas, migração e adesão celular (HODGE; RIDLEY, 2016). Essas GTPases são muito conservadas em eucariontes, sendo as mais amplamente expressas e melhor estudadas: Rho propriamente dita (isoformas A, B e C), Rac 1 e Cdc42.

Classicamente, as GTPases Rho ciclam entre o estado conformacional inativo (ligadas ao GDP) e ativo (ligadas ao GTP) (HODGE; RIDLEY, 2016). Sua ativação é regulada por GEFs (*Guanine-nucleotide-Exchange Factors*), que facilitam a troca de GDP por GTP, e sua inativação é catalisada por GAPs (*GTPase-Activating Proteins*), que aceleram a hidrólise do GTP. Adicionalmente, proteínas Rho inativas são sequestradas por GDIs (*Guanine-nucleotide-Dissociation Inhibitors*), que impedem a interação da GTPase com a membrana plasmática, impedindo sua interação com GEFs e mantendo-as inativas no citoplasma (CARPENTER *et al.*, 1999; HANSEN; NELSON, 2001).

Na forma ativa, GTPases Rho interagem com diferentes proteínas efetoras. Dentre os efetores, as quinases de serina/treonina ROCKs (*Rho-associated coiled-coil forming kinases*) exercem um papel crucial na regulação da reorganização da actina durante a proliferação, adesão celular, migração e contração (AMANO; NAKAYAMA; KAIBUCHI, 2010).

As miosinas constituem uma superfamília de proteínas motoras que podem caminhar sobre filamentos de actina e proporcionar o seu deslizamento, para gerar força de tensão sobre os mesmos. Esta função requer energia, que é proveniente da hidrólise de ATP e necessita da existência de sítios catalíticos com atividade ATPásica nas miosinas. A maioria das miosinas pertence à classe II que, juntamente com a actina, compõem as estruturas contráteis do tecido muscular. No entanto, moléculas de miosina II que se assemelham às isoformas musculares em relação à estrutura e função também estão presentes em todas as células não musculares eucariontes (VICENTE-MANZANARES *et al.*, 2011). As miosinas do tipo II não musculares são compostas por 3 pares de cadeias peptídicas: duas cadeias pesadas de 230 kDa (MHC), duas cadeias leves reguladoras de 20 kDa (MLC ou RLC) e duas cadeias leves essenciais de 17

kDa (ELC). As duas cabeças globulares presentes nas cadeias pesadas contém os sítios de ligação para ATP e actina, seguidas da região do pescoço, onde se ligam duas diferentes cadeias leves (ELC e MLC). A região do pescoço funciona como uma alavanca para ampliar a rotação da cabeça da miosina, devido à transformação da energia química de ATP em energia mecânica para realizar o movimento de deslocamento (VICENTE-MANZANARES *et al*, 2009).

A ativação de miosinas envolve a fosforilação reversível na cadeia leve regulatória (MLC) nos sítios de serina (Ser19) ou treonina (Thr18), ou ambos. A miosina II inativa (não fosforilada) encontra-se compactada (Fig. 1).

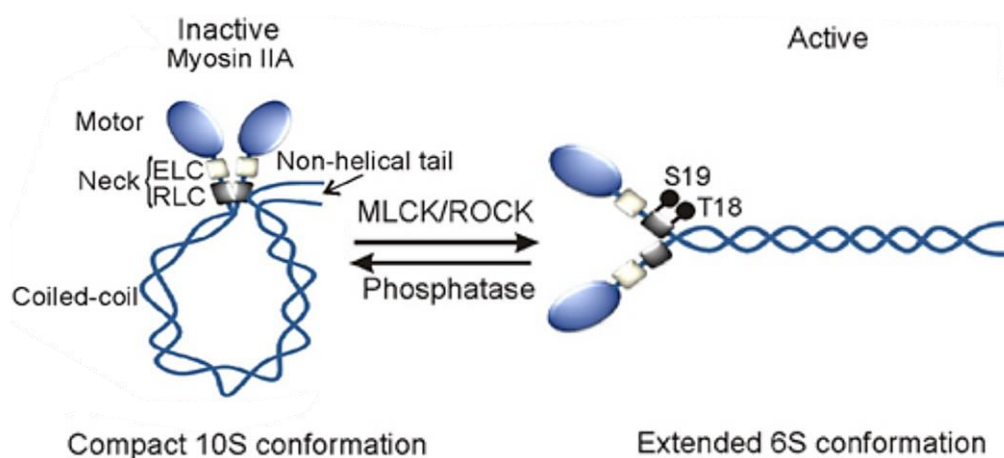


Figura 1. Esquema representativo da miosina II nas suas conformações inativa e ativa. Modificado de Betapudi (2014).

A fosforilação por ROCK ou por outra quinase permite que a molécula atinja sua conformação ativada, formando filamentos duplos bipolares (através da interação das suas α -hélices), que promovem a interação com os filamentos de actina (VICENTE-MANZANARES *et al*, 2009). Esta interação com a actina ocorre por meio do domínio da cabeça, havendo uma mudança conformacional que promove o deslocamento antiparalelo dos filamentos de actina. A formação de feixes contráteis de actina e miosina origina as estruturas conhecidas como fibras de estresse, importantes no processo de contração do corpo celular e amadurecimento de adesões junto à matriz extracelular (VICENTE-MANZANARES *et al*, 2009) (Fig. 2). Outras quinases regulatórias de MLC são a *Miosin Light Chain Kinase* (MLCK), *Citron kinase* e ZIPK ou DAPK3 (*Leucine Zipper Interacting Kinase*) (WENDT *et al*, 2001; MATSUMURA, 2005; TAN *et al*, 2008).

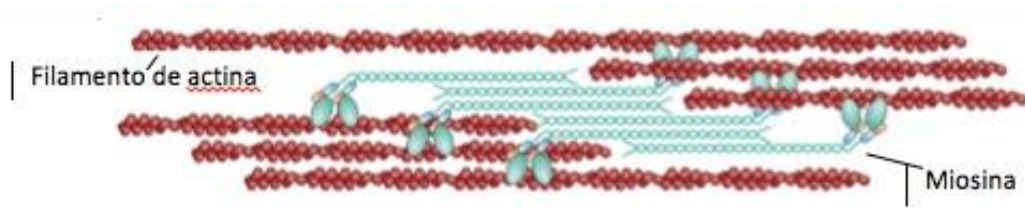


Figura 2. Representação esquemática da fibra de estresse. Os filamentos de actina estão representados em vermelho e os de miosina em azul. Durante a contração celular, a cabeça da miosina interage com a actina, realizando o encurtamento das fibras de estresse. Modificado de Vicente-Manzanares *et al.* (2009).

ROCK também atua sobre a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), que defosforila a miosina II ativada. A MLCP é composta por três subunidades: a subunidade catalítica (PP1c), a subunidade alvo 1 da miosina fosfatase (MYPT1 ou MBS) e uma pequena subunidade não catalítica, sem função definida. A fosforilação nos resíduos de MYPT1 por ROCK (JULIAN; OLSON, 2014) inibe a atividade da MLCP (KIMURA *et al.*, 1996; JULIAN; OLSON, 2014) e aumenta a possibilidade de fosforilação de MLC, consequentemente aumentando a contratilidade celular (RIENTO; RIDLEY, 2003).

Outro alvo de ROCK é a LIM quinase 1 (LIMK1) que, uma vez ativada por ROCK, irá fosforilar e, consequentemente, inativar a proteína cofilina, levando à inibição da despolimerização dos filamentos de actina (OHASHI *et al.*, 2000). Assim, por meio de vias de sinalização que envolvem as proteínas miosina II e LIMK1, RhoA/ROCK atuam regulando os processos de motilidade, contração, formação de fibras de estresse e amadurecimento de adesões nas células (AMANO *et al.*, 1996; OHASHI *et al.*, 2000; RIENTO; RIDLEY, 2003; SHI *et al.*, 2013; JULIAN; OLSON, 2014). O amadurecimento das adesões junto à matriz extracelular para que se tornem pontos de ancoragem para as células depende da atividade de miosina II e da inserção das fibras de estresse (PARSONS *et al.*, 2010).

Além da regulação da contratilidade, foi observado em alguns tipos celulares que a ativação de ROCK também pode levar à transição epitélio-mesênquima por meio da ativação do fator de transcrição relacionado à miocardina (MRTF). O MRTF está ligado à actina globular (G-actina), que ao ser polimerizada para formar actina filamentosa (F-actina), pela via de ROCK libera o MRTF para formar um complexo com o fator responsivo ao soro (SRF). Este

complexo, por sua vez, ativará a transcrição de genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima, como por exemplo a α -actina de músculo liso (α -SMA) (KOROL; TAIYAB; WEST-MAYS, 2016; YOKOTA *et al*, 2017).

1.2 ROCK1 e ROCK2

Sabe-se que a ativação de quinases regulatórias de MLC ocorre sob estímulos diferentes: Ca^+ -calmodulina ativa MLCK e a GTPase RhoA ativa ROCK e *Citron kinase*, por exemplo. Segundo Totsukawa e col. (2000 e 2004), a MLCK, em alguns tipos celulares, localiza-se mais na periferia, enquanto ROCK estaria localizada mais na região central. Essa diferença na localização significa que as estruturas de actina e miosina na região central da célula, como fibras de estresse e adesões focais maduras, são mais estáveis do que as que se encontram na periferia. Existem, no entanto, duas diferentes isoformas de ROCK em humanos (ROCK1 e ROCK2), e muito pouco se sabe a respeito do papel diferencial de cada isoforma nas células.

Em humanos, as isoformas ROCK1 e ROCK2 (Fig. 3) possuem peso molecular de 160 kDa (NAKAGAWA *et al*, 1996). O gene para ROCK1 encontra-se no cromossomo 18 (18q11.1), enquanto que o gene para ROCK2 encontra-se no cromossomo 2 (2p24). As duas isoformas compartilham 64% de homologia na sequência primária de aminoácidos, 92% de homologia no domínio quinase e o domínio *coiled-coil* é o que apresenta a menor homologia (55%) (NAKAGAWA *et al*, 1996). ROCK1 e ROCK2 apresentam níveis de expressão diferentes entre os órgãos (JULIAN; OLSON, 2014). As duas isoformas possuem grande similaridade, podendo ser reguladas por mecanismos comuns ou por mecanismos específicos de cada uma (SHI *et al*, 2013; JULIAN; OLSON, 2014; HARTMANN; RIDLEY; LUTZ, 2015).

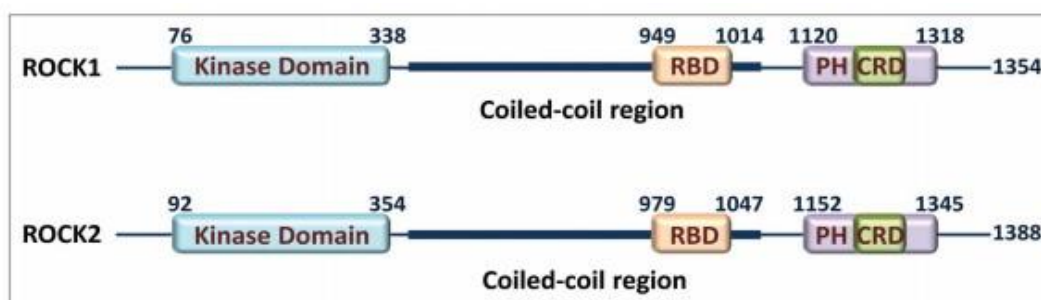


Figura 3. Domínios das isoformas da proteína ROCK. Modificado de: JULIAN; OLSON, 2014.

Com relação à localização e função de cada isoforma, Newell-Litwa e colab. (2015) mostraram que ROCK1 e ROCK2 regulam vias moleculares distintas após ativação por RhoA, e sua ação coordenada controla a polarização e motilidade celular. Ambas as isoformas regulam a contratilidade e formação de fibras de estresse, mas ROCK2 também regula a atividade da GTPase Rac1 (indiretamente) e de cofilina na periferia das células, sendo muito importante para a remodelação de actina e maturação de adesões junto à matriz extracelular.

1.3 Inibidores de ROCK

Inibidores de ROCK têm demonstrado possuir potencial terapêutico para uma variedade de condições patológicas, que incluem doenças cardiovasculares (ex: vasoespasmos coronais e vasoespasmos cerebrais; DONG *et al*, 2010), fibrose pulmonar (KNIPE *et al*, 2018) e doenças oculares (ex: glaucoma, retinopatia diabética e retinopatia vítreo-proliferativa; MOURA-COELHO *et al*, 2019).

Dentre os inibidores de ROCK mais utilizados temos o Y-27632 e o Fasudil, que inibem ROCK1 e 2 de maneira equivalente, tendo como alvo o domínio quinase dependente de ATP (LIAO; SETO; NOMA, 2007). O Fasudil inibe ROCK competindo com o ATP para se ligar à quinase, apresentando resultados positivos para o tratamento de vasoespasmos cerebrais, isquemia cerebral aguda e angina (SHIMOKAWA; RASHID, 2007). De maneira geral, inibidores de ROCK inibem a contratilidade celular; por exemplo, o Y-27632 aboliu a formação de fibras de estresse em células Swiss-3T3 na concentração de 10 μ M (ISHIZAKI *et al*, 2000).

Na Oftalmologia, os inibidores de ROCK começaram a ser utilizados para o tratamento de glaucoma, uma vez que efeitos positivos para a redução da pressão intraocular foram obtidos (HONJO; TANIHARA, 2018). Ademais, foram encontrados efeitos positivos dos inibidores de ROCK *in vitro* em processos relacionados com doenças que acometem a córnea, a retina (retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, descolamento da retina) e na retinopatia vítreo-proliferativa (MOURA-COELHO *et al*, 2019). O Fasudil

apresentou efeitos positivos para retinopatia diabética (ARITA; HATA; ISHIBASHI, 2010) e na progressão de retinopatia vítreo-proliferativa, na concentração de 30 μ M em modelo animal (KITA *et al*, 2008). Neste último estudo, também foi observada diminuição da contração de hialócitos (células presentes no vítreo) tratados com o vítreo de pacientes com retinopatia vítreo-proliferativa (KITA *et al*, 2008). O Ripasudil, desenvolvido pela Kowa Company, que também inibe de forma potente e seletiva as duas isoformas de ROCK (GARNOCK-JONES, 2014), foi aprovado para o tratamento de glaucoma e hipertensão ocular em 2014 no Japão.

Outros efeitos promovidos por inibidores de ROCK foram: neuroproteção e atenuação do processo de gliose induzidos por estresse na retina de roedores (TURA *et al*, 2009), redução da transdiferenciação em miofibroblastos (células que apresentam elevada contratilidade) de diferentes tipos celulares *in vitro* (HTWE *et al*, 2017; PITHA *et al*, 2018; ZHANG *et al*, 2019) e supressão da expressão de proteínas de matriz relacionadas à fibrose em células do epitélio pigmentado da retina (ZHU *et al*, 2013). Em células gliais de Müller retinianas, o inibidor Y-27632 diminuiu a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) induzida pelo estresse oxidativo (ZHANG; FENG; WANG, 2018). Contudo, não existem estudos que elucidem suficientemente o papel da via de ROCK em células de Müller, principalmente em processos celulares que são importantes em diferentes condições patológicas que acometem a retina (particularmente as membranas epirretinianas), evidenciando a necessidade de novas investigações.

1.4 Membrana epirretiniana

Membranas epirretinianas são membranas de composição fibrocelular, resultantes de um processo de fibrose, que se desenvolvem na superfície interna da retina. Podem ser primárias ou idiopáticas (quando a sua origem não é identificada) (BU *et al*, 2014) ou secundárias, devido a uma condição patológica prévia, como é o caso de membranas de retinopatia vítreo-proliferativa (MUDHAR, 2020) e de retinopatia diabética proliferativa (HENG *et al*, 2013). Apesar das membranas idiopáticas e secundárias terem as suas próprias características, elas podem causar distorção da retina, metamorfopsia e gerar

trações, inclusive com a possibilidade de levar ao descolamento de retina (BU *et al*, 2014; PASTOR *et al*, 2016).

Existem diversos tipos celulares que podem ser encontrados nas membranas epirretinianas, como por exemplo miofibroblastos, células gliais de Müller, hialócitos, células do epitélio pigmentado da retina e células do sistema imune (SCHUMANN *et al*, 2014; BU *et al*, 2015; VOGT *et al*, 2018; GUENTHER *et al*, 2019). Contudo, a composição celular e a predominância de diferentes células podem diferir em membranas primárias e secundárias. Foi demonstrada uma maior quantidade de células do sistema imune e de células do epitélio pigmentado da retina em membranas de retinopatia vítreo-proliferativa, em comparação a membranas idiopáticas, que apresentavam uma maior quantidade de células gliais (OBERSTEIN *et al*, 2011, DA SILVA *et al*, 2022). Além disso, os miofibroblastos estão presentes nas diferentes membranas e parecem ser as células mais comumente encontradas (BU *et al*, 2015; GUENTHER *et al*, 2018; DA SILVA *et al*, 2022).

Além de células, a matriz extracelular também é um importante componente presente nas membranas epirretinianas. Fazem parte da constituição do tecido fibroso: fibronectina (IOACHIM *et al*, 2005; GEORGE *et al*, 2009), tenascina (IOACHIM *et al*, 2005), laminina (SCHEIFFARTH *et al*, 1988; IOACHIM *et al*, 2005) e diferentes tipos de colágenos, tais como os tipos I, II, III, IV e V (SCHEIFFARTH *et al*, 1988; IOACHIM *et al*, 2005; KRITZENBERGER *et al*, 2011).

1.5 Células Gliais de Müller e membranas epirretinianas

As células de Müller são células gliais presentes na retina dos vertebrados que atuam no suporte aos neurônios e contribuem no processamento da informação (NEWMAN; REICHENBACH, 1996; BRINGMANN; REICHENBACH, 2001). Além disso, estas células promovem a estabilidade estrutural da retina, sendo encontradas por toda a extensão da retina neural (Fig. 4). Os corpos celulares das células de Müller estão localizados na camada nuclear interna e deles se irradiam prolongamentos em direção à superfície interna da retina, formando uma expansão na região terminal adjacente ao humor vítreo. A lâmina

basal e os pés terminais das células de Müller formam a membrana limitante interna. Prolongamentos em direção à superfície externa apresentam microvilos em sua porção apical e formam junções tipo *tight* com os fotorreceptores, constituindo a membrana limitante externa. Além disso, as células de Müller possuem prolongamentos ramificados que se difundem e recobrem os corpos celulares dos neurônios fotorreceptores (NEWMAN; REICHENBACH, 1996).

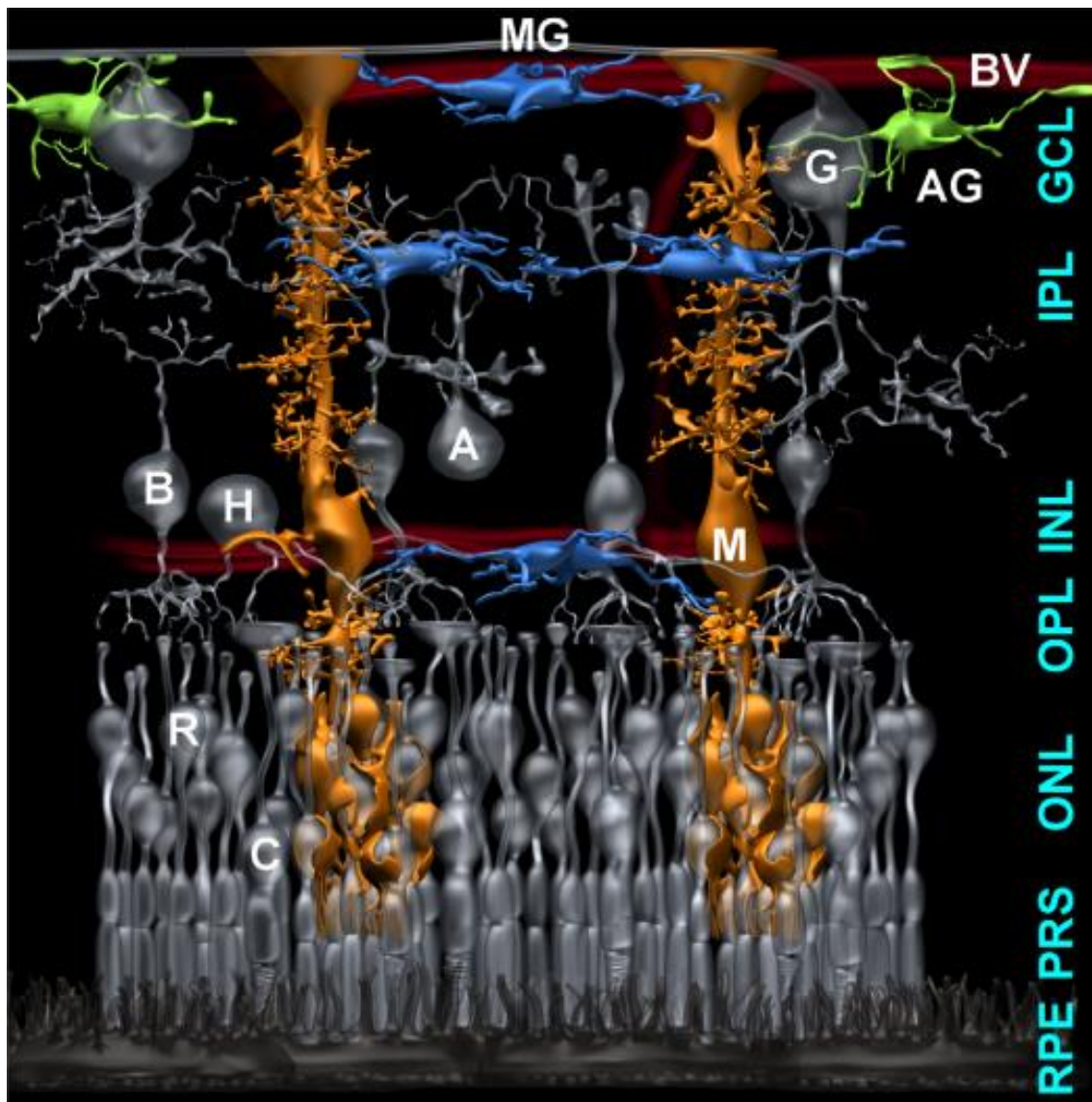


Figura 4. Representação esquemática dos componentes celulares da retina e sua organização. Células gliais de Müller se expandem por quase toda extensão retiniana, é possível observar que seus prolongamentos envolvem as células neuronais. Microglia (MG), astrócito/astroglia (AG), células de Müller (M), ganglionares (G), amácrinas (A), horizontais (H), bipolares (B), cones (C) e bastonetes (R). Epitélio pigmentado da retina (RPE), segmentos dos fotorreceptores (PRS), camada nuclear externa (ONL), camada plexiforme externa (OPL),

camada nuclear interna (INL), camada plexiforme interna (IPL), camada de células ganglionares (GCL), vasos sanguíneos (BV). Fonte: REICHENBACH; BRINGMANN, 2020.

Diversas funções importantes são desempenhadas por estas células, de modo a manter o funcionamento normal do tecido, tais como: 1) a manutenção das concentrações de íons que estão presentes no meio extracelular, principalmente K^+ e o controle da quantidade de água no meio extracelular (BRINGMANN; REICHENBACH, 2001; REICHENBACH; BRINGMANN, 2020); 2) auxílio no metabolismo dos neurônios, absorvendo glicose e convertendo em lactato, no controle do pH extracelular e na remoção de CO_2 gerado pelo metabolismo das células na retina (REICHENBACH; BRINGMANN, 2013; REICHENBACH; BRINGMANN, 2020) e 3) modulação da atividade neuronal, contribuindo no processamento da informação, controlando a concentração dos neurotransmissores que estão presentes no meio extracelular e fornecendo precursores de neurotransmissores aos neurônios (REICHENBACH; BRINGMANN, 2020). Outra característica importante dessas células é o seu potencial como célula progenitora na retina (AHMAD *et al*, 2011).

As células de Müller desempenham um papel importante na patogênese de membranas epirretinianas (Fig. 5). A capacidade de responder aos estímulos do microambiente, entrar em gliose e proliferar pode contribuir para a progressão do tecido fibrótico (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2009). Além disso, a sua capacidade de se diferenciar em miofibroblastos e gerar trações na matriz extracelular também está associada com a progressão da doença (GUIDRY, 2005).

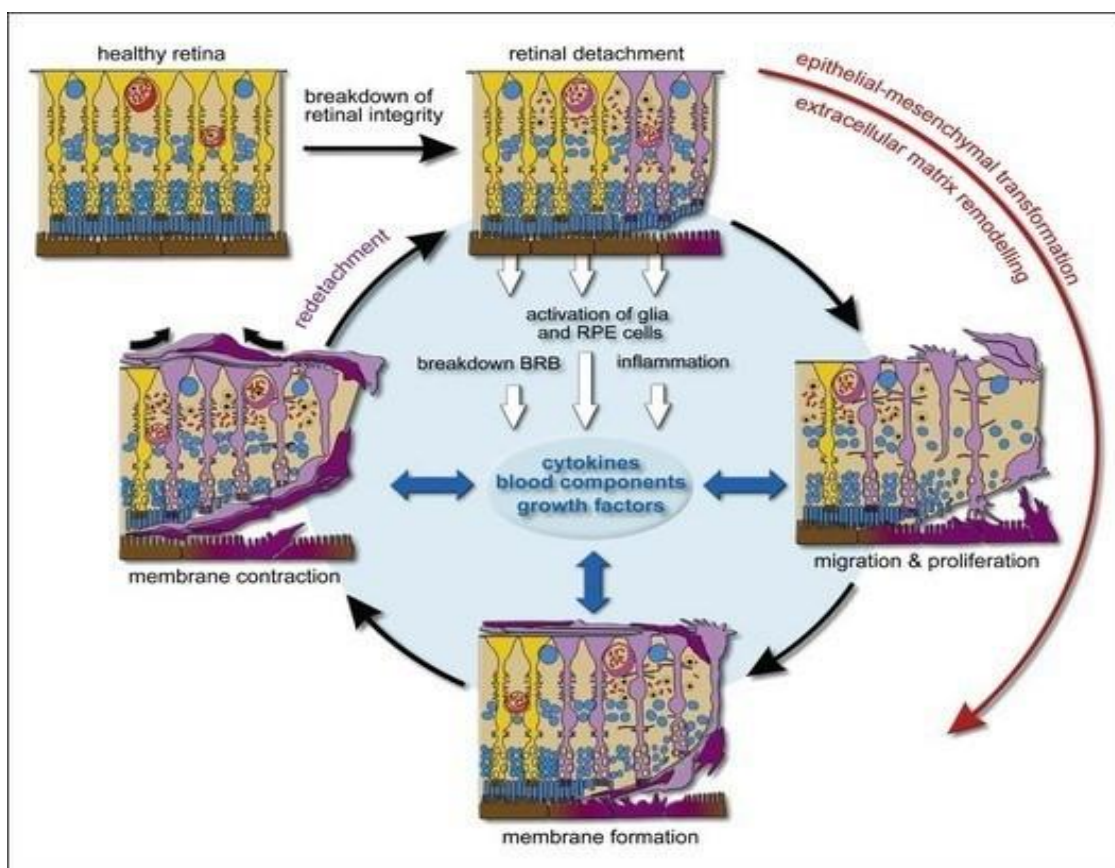


Figura 5. Exemplo esquemático do surgimento e progressão de um tipo de membrana epirretiniana secundária. Células de Müller (amarelo) se tornam ativas (violeta) devido a mudanças no microambiente retiniano e participam ativamente da formação das membranas fibróticas e na tração do tecido. Ryan *et al*, 2012.

Outro aspecto a se considerar na progressão das membranas é o papel das citocinas e fatores de crescimento na sinalização celular. Estudos demonstraram que fatores como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) estão elevados no vítreo de indivíduos com retinopatia vítreo-proliferativa (WIEDEMANN, 1992) e estão presentes na retina gliótica (EASTLAKE *et al*, 2016); ademais, as células de Müller são fontes destes fatores de crescimento (EASTLAKE *et al*, 2016). Além disso, fatores como o PDGF e TGF- β foram capazes de induzir a contração de células de Müller humanas *in vitro*, em maior e menor magnitude respectivamente (GUIDRY; BRADLEY; KING, 2003). Em resposta ao TGF- β , células gliais de Müller da linhagem humana MIO-M1 aumentaram a expressão de α -SMA, colágeno I e fibronectina (KANDA *et al*, 2019), indicando aumento na transição glial-mesenquimal, promovendo contratilidade e um perfil pró-fibrótico.

As células de Müller são capazes de responder ao microambiente em que estão inseridas e modular a expressão de genes relacionados com a membrana epirretiniana, como os genes de fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), de tenascina C, de colágeno I e de colágeno IV, que podem ser regulados pela rigidez da matriz extracelular (DAVIS *et al*, 2012). Isto sugere que a matriz extracelular retiniana não apresenta apenas um papel como componente estrutural, mas também pode exercer um papel regulatório no comportamento celular.

1.6 Miofibroblastos e membranas epirretinianas

O miofibroblasto é o tipo celular considerado mais abundante nas membranas fibrocontráteis que acometem a retina (DA SILVA *et al*, 2022). Este tipo celular é caracterizado pela expressão de α -SMA, possui a capacidade de contração e de gerar trações, além de produzir diferentes componentes da matriz extracelular (GUIDRY, 2005; ABU EL-ASRAR; MISSOTTEN; GEBOES, 2011). Considerando a importância dos miofibroblastos para a progressão e formação das membranas fibrocontráteis, podemos questionar qual seria a origem destas células, uma vez que não estão presentes no tecido retiniano. Em condições patológicas, em que há formação de membranas retinianas, considera-se que dentre as principais células que dão origem aos miofibroblastos estão as células gliais de Müller (FEIST *et al*, 2014, BU *et al*, 2015).

As células de Müller derivadas de animais, quando mantidas por períodos prolongados em cultura, passam pelo processo de transdiferenciação miofibroblástica, no qual ocorre o aumento na expressão de α -SMA e diminuição da expressão de marcadores gliais como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (GUIDRY, 1996). Inclusive, por esta razão, estima-se que a população de miofibroblastos derivados de células de Müller presentes nas membranas seja maior, uma vez que os marcadores comumente utilizados para confirmar sua origem são perdidos durante o processo de transdiferenciação (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2009). As células de Müller transdiferenciadas em um fenótipo miofibroblástico, similar ao observado em cultura, estão presentes nas membranas retinianas (GUIDRY, 2005; FEIST *et al*, 2014). Além do mais, células gliais de Müller transdiferenciadas ao perfil miofibroblástico têm a capacidade de

contrair *in vitro*, principalmente quando estimuladas por determinados fatores de crescimento (GUIDRY, 1997).

A busca por novas abordagens terapêuticas é importante no contexto das membranas epirretinianas, uma vez que os tratamentos atuais podem não apresentar um bom resultado para todos os casos. Além disso, para as membranas epirretinianas não existe um tratamento farmacológico, apenas a intervenção cirúrgica, que é mais invasiva. Considerando os processos celulares que estão envolvidos na gênese da membrana epirretiniana, tais como transdiferenciação miofibroblástica, contração, migração e produção de matriz extracelular, a proteína ROCK (e, conseqüentemente, sua via de sinalização) pode ser considerada um potencial alvo terapêutico a ser investigado.

Contudo, o papel de ROCK em células gliais de Müller da retina ainda não está totalmente elucidado. A inibição da via de ROCK poderia contribuir para elucidar o papel desempenhado por esta proteína nestas células e esclarecer se há vantagens no uso de inibidores farmacológicos para ROCK, buscando por alvos terapêuticos efetivos nas membranas epirretinianas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel da proteína ROCK em células gliais de Müller da retina, por meio do uso de inibidor farmacológico, nos eventos celulares relacionados à membrana epirretiniana.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos de um inibidor de ROCK (Y27632) sobre as células de Müller em relação a:

- 1) viabilidade celular, diretamente por meio do ensaio de exclusão com azul de tripan e indiretamente por ensaio com brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT);
- 2) crescimento celular por meio de curva de crescimento;
- 3) proliferação celular por meio de ensaio de incorporação de 5-Bromo-2'-Desoxiuridina;

6. Conclusão

Os resultados deste estudo sobre a inibição farmacológica de ROCK nas células de Müller MIO-M1 sugerem que esta pode ser uma abordagem efetiva para prevenir a contratilidade dessas células, sem alterar a viabilidade celular. Além disso, pode atenuar a transição glial-mesenquimal, conforme sugerido pela diminuição na expressão de α -SMA, e reduzir a proliferação celular.

É importante que estudos sobre a inibição de ROCK *in vivo* sejam conduzidos, a fim de confirmar e complementar os resultados obtidos em cultura, uma vez que o microambiente é distinto. Contudo, os resultados se demonstram relevantes por descrever o papel regulatório de ROCK especificamente em células gliais de Müller, células importantes para a homeostase da retina e também com um papel relevante na patogênese das membranas epirretinianas. Esperamos que a inibição de ROCK possa prevenir a tração da retina propiciada pela capacidade contrátil das células nas membranas epirretinianas.

Referências

ABU EL-ASRAR, Ahmed M.; MISSOTTEN, Luc; GEBOES, Karel. Expression of myofibroblast activation molecules in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes. **Acta Ophthalmologica**, v. 89, n. 2, p. e115-e121, 2011.

AHMAD, Iqbal *et al.* Müller glia: a promising target for therapeutic regeneration. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, n. 8, p. 5758-5764, 2011.

ALTERA, Annalisa *et al.* The extracellular matrix complexity of idiopathic epiretinal membranes and the bilaminar arrangement of the associated internal limiting membrane in the posterior retina. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 259, n. 9, p. 2559-2571, 2021.

AMANO, Mutsuki *et al.* Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20246-20249, 1996.

AMANO, Mutsuki; NAKAYAMA, Masanori; KAIBUCHI, Kozo. Rho kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 9, p. 545-554, 2010.

ARITA, Ryoichi; HATA, Yasuaki; ISHIBASHI, Tatsuro. ROCK as a therapeutic target of diabetic retinopathy. **Journal of ophthalmology**, v. 2010, 2010.

BETAPUDI, Venkaiah. Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 45, 2014.

BISHOP, Anne L.; HALL, Alan. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 2, p. 241-255, 2000.

BRINGMANN, Andreas; REICHENBACH, Andreas. Role of Muller cells in retinal degenerations. **Front Biosci**, v. 6, p. 72-92, 2001.

BRINGMANN, Andreas; WIEDEMANN, Peter. 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, Shao-Chong *et al.* Idiopathic epiretinal membrane. **Retina**, v. 34, n. 12, p. 2317-2335, 2014.

BU, Shao-Chong *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.

CARPENTER, Christopher L. *et al.* Lipid kinases are novel effectors of the GTPase Rac1. **Advances in enzyme regulation**, v. 39, p. 299-312, 1999.

CHANG, Fei *et al.* ROCK inhibitor enhances the growth and migration of BRAF-mutant skin melanoma cells. **Cancer science**, v. 109, n. 11, p. 3428-3437, 2018.

CHATURVEDI, Lakshmi S.; MARSH, Harold M.; BASSON, Marc D. Role of RhoA and its effectors ROCK and mDia1 in the modulation of deformation-induced FAK, ERK, p38, and MLC mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 5, p. C1224-C1238, 2011.

CHEN, Jian *et al.* Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 49, n. 1, p. 175-183, 2008.

CHRISTAKOPOULOS, Christos *et al.* Proteomics reveals a set of highly enriched proteins in epiretinal membrane compared with inner limiting membrane. **Experimental eye research**, v. 186, p. 107722, 2019.

DA SILVA, Rafael André *et al.* Cellular components of the idiopathic epiretinal membrane. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 260, n. 5, p. 1435-1444, 2022.

DAVIS, Joshua T. *et al.* Müller cell expression of genes implicated in proliferative vitreoretinopathy is influenced by substrate elastic modulus. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 6, p. 3014-3019, 2012.

DONG, Ming *et al.* Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. **Drug discovery today**, v. 15, n. 15-16, p. 622-629, 2010.

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.

FEIST, Richard M. *et al.* Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 252, n. 2, p. 347-357, 2014.

GARNOCK-JONES, Karly P. Ripasudil: first global approval. **Drugs**, v. 74, n. 18, p. 2211-2215, 2014.

GEORGE, Biju *et al.* Extracellular matrix proteins in epiretinal membranes and in diabetic retinopathy. **Current eye research**, v. 34, n. 2, p. 134-144, 2009.

GOTO, Hidemasa *et al.* Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11728-11736, 1998.

GUENTHER, Stefanie R. *et al.* Comparison of surgically excised premacular membranes in eyes with macular pucker and proliferative vitreoretinopathy. **Current Eye Research**, v. 44, n. 3, p. 341-349, 2019.

GUIDRY, Clyde. Isolation and characterization of porcine Müller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 37, n. 5, p. 740-752, 1996.

GUIDRY, Clyde. Tractional force generation by porcine Müller cells. Development and differential stimulation by growth factors. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 38, n. 2, p. 456-468, 1997.

GUIDRY, Clyde. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. **Progress in retinal and eye research**, v. 24, n. 1, p. 75-86, 2005.

HAMAOKA, Kozue *et al.* ZIP kinase phosphorylated and activated by Rho kinase/ROCK contributes to cytokinesis in mammalian cultured cells. **Experimental Cell Research**, v. 386, n. 1, p. 111707, 2020.

HANSEN, Marc DH; NELSON, W. James. Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1: effector complex. **Current Biology**, v. 11, n. 5, p. 356- 360, 2001.

HARTMANN, Svenja; RIDLEY, Anne J.; LUTZ, Susanne. The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 276, 2015.

HENG, L. Z. *et al.* Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. **Diabetic Medicine**, v. 30, n. 6, p. 640-650, 2013.

HODGE, Richard G.; RIDLEY, Anne J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 8, p. 496, 2016.

HONJO, Megumi; TANIHARA, Hidenobu. Impact of the clinical use of ROCK inhibitor on the pathogenesis and treatment of glaucoma. **Japanese journal of ophthalmology**, v. 62, n. 2, p. 109-126, 2018.

HTWE, Su S. *et al.* Role of Rho-associated coiled-coil forming kinase isoforms in regulation of stiffness-induced myofibroblast differentiation in lung fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 56, n. 6, p. 772-783, 2017.

IOACHIM, E. *et al.* Immunohistochemical study of extracellular matrix components in epiretinal membranes of vitreoproliferative retinopathy and proliferative diabetic retinopathy. **European journal of ophthalmology**, v. 15, n. 3, p. 384-391, 2005.

ISHIZAKI, Toshimasa *et al.* Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. **Molecular pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 976-983, 2000.

JULIAN, Linda; OLSON, Michael F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) structure, regulation, and functions. **Small GTPases**, v. 5, n. 2, p. e29846, 2014.

KANDA, Atsuhiko *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.

KIMURA, Kazushi *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, n. 5272, p. 245-248, 1996.

KITA, Takeshi *et al.* Role of TGF- β in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 45, p. 17504-17509, 2008.

KNIPE, Rachel S. *et al.* The Rho kinase isoforms ROCK1 and ROCK2 each contribute to the development of experimental pulmonary fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 58, n. 4, p. 471-481, 2018.

KOMSA-PENKOVA, Regina; SPIROVA, Rositza; BECHEV, Blagovest. Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 32, n. 1, p. 33-43, 1996.

KOROL, Anna; TAIYAB, Aftab; WEST-MAYS, Judith A. RhoA/ROCK signaling regulates TGF β induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through MRTF-A. **Molecular medicine**, v. 22, n. 1, p. 713-723, 2016.

KRITZENBERGER, Michaela *et al.* Different collagen types define two types of idiopathic epiretinal membranes. **Histopathology**, v. 58, n. 6, p. 953-965, 2011.

LAHNE, Manuela *et al.* Actin-Cytoskeleton-and Rock-Mediated INM are required for photoreceptor regeneration in the adult zebrafish retina. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 47, p. 15612-15634, 2015.

LAMMERS, Michael *et al.* Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 35236-35246, 2008.

LIMB GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.43, n. 3, p. 864-9, 2002.

LIAO, James K.; SETO, Minoru; NOMA, Kensuke. Rho kinase (ROCK) inhibitors. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 17, 2007.

MASAMUNE, Atsushi *et al.* Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 7, p. 1292-1302, 2003.

MATSUMURA, Fumio. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 7, p. 371-377, 2005.

MORIN, Pierre *et al.* Differing contributions of LIMK and ROCK to TGF β -induced transcription, motility and invasion. **European journal of cell biology**, v. 90, n. 1, p. 13-25, 2011.

MOURA-COELHO, Nuno *et al.* Rho kinase inhibitors—a review on the physiology and clinical use in Ophthalmology. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 257, n. 6, p. 1101-1117, 2019.

MUDHAR, Hardeep Singh. A brief review of the histopathology of proliferative vitreoretinopathy (PVR). **Eye**, v. 34, n. 2, p. 246-250, 2020.

NAKAGAWA, Osamu *et al.* ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. **FEBS letters**, v. 392, n. 2, p. 189-193, 1996.

NEWELL-LITWA, Karen A. *et al.* ROCK1 and 2 differentially regulate actomyosin organization to drive cell and synaptic polarity. **Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 2, p. 225-242, 2015.

NEWMAN, Eric; REICHENBACH, Andreas. The Müller cell: a functional element of the retina. **Trends in neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 307-312, 1996.

OBERSTEIN, Sarit Y. Lesnik *et al.* Cell proliferation in human epiretinal membranes: characterization of cell types and correlation with disease condition and duration. **Molecular vision**, v. 17, p. 1794, 2011.

OHASHI, Kazumasa *et al.* Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3577-3582, 2000.

OKADA, Morio *et al.* Histological and immunohistochemical study of idiopathic epiretinal membrane. **Ophthalmic research**, v. 27, n. 2, p. 118-128, 1995.

PARSONS, J. Thomas; HORWITZ, Alan Rick; SCHWARTZ, Martin A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 633-643, 2010.

PASTOR, J. Carlos *et al.* Proliferative vitreoretinopathy: a new concept of disease pathogenesis and practical consequences. **Progress in retinal and eye research**, v. 51, p. 125-155, 2016.

PIPPARELLI, Aurélien *et al.* ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62095, 2013.

PITHA, Ian *et al.* Rho-kinase inhibition reduces myofibroblast differentiation and proliferation of scleral fibroblasts induced by transforming growth factor β and experimental glaucoma. **Translational vision science & technology**, v. 7, n. 6, p. 6-6, 2018.

REICHENBACH, Andreas; BRINGMANN, Andreas. New functions of Müller cells. **Glia**, v. 61, n. 5, p. 651-678, 2013.

REICHENBACH, Andreas; BRINGMANN, Andreas. Glia of the human retina. **Glia**, v. 68, n. 4, p. 768-796, 2020.

RIENTO, Kirsi; RIDLEY, Anne J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews* **Molecular cell biology**, v. 4, n. 6, p. 446-456, 2003.

RITTIÉ, Laure. Type I collagen purification from rat tail tendons. In: **Fibrosis**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 287-308.

RUIZ-LOREDO, Ariadna Yolanda; LÓPEZ, Edith; LÓPEZ-COLOMÉ, Ana María. Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 2, p. 414-423, 2011.

SALHIA, Bodour *et al.* Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. **Cancer research**, v. 65, n. 19, p. 8792-8800, 2005.

SANTOS-BREDARIOL, Andréa Silveira *et al.* Small GTP-binding protein RhoB is expressed in glial müller cells in the vertebrate retina. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 6, p. 976-985, 2006.

SCHEIFFARTH, O. F. *et al.* Proteins of the extracellular matrix in vitreoretinal membranes. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 226, n. 4, p. 357-361, 1988.

SCHUMANN, Ricarda G. *et al.* Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 252, n. 12, p. 1887-1894, 2014.

SHAO, Jing-Zhi *et al.* In vitro inhibition of proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells by fasudil. **International journal of ophthalmology**, v. 11, n. 8, p. 1253, 2018.

SHI, Jianjian *et al.* Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. *Cell death & disease*, v. 4, n. 2, p. e483-e483, 2013.

SHIMOKAWA, Hiroaki; RASHID, Mamunur. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 6, p. 296-302, 2007.

SIMON, Perikles. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, v. 19, n. 11, p. 1439-1440, 2003.

SVITKINA, Tatyana. The actin cytoskeleton and actin-based motility. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 1, p. a018267, 2018.

TAN, Ivan *et al.* A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 123-136, 2008.

TOMASEK, James J. *et al.* Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. **Wound repair and regeneration**, v. 14, n. 3, p. 313-320, 2006.

TOTSUKAWA, Go *et al.* Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 4, p. 797-806, 2000.

TOTSUKAWA, Go *et al.* Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. **The Journal of cell biology**, v. 164, n. 3, p. 427-439, 2004.

TSUKAHARA, Rintaro *et al.* Dasatinib affects focal adhesion and myosin regulation to inhibit matrix contraction by Müller cells. **Experimental Eye Research**, v. 139, p. 90-96, 2015.

TURA, Aysegül *et al.* Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 50, n. 1, p. 452-461, 2009.

VICENTE-MANZANARES, Miguel *et al.* Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 11, p. 778-790, 2009.

VICENTE-MANZANARES, Miguel *et al.* Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. **Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 2, p. 381-396, 2011.

VOGT, Denise *et al.* Premacular membranes in tissue culture. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 256, n. 9, p. 1589-1597, 2018.

WEI, Yi-Hsuan *et al.* Simvastatin and ROCK inhibitor Y-27632 inhibit myofibroblast differentiation of Graves' ophthalmopathy-derived orbital fibroblasts via RhoA-mediated ERK and p38 signaling pathways. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1109, 2021.

WENDT, Thomas *et al.* Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 98, n. 8, p. 4361-4366, 2001.

WHEELER, Ann P.; RIDLEY, Anne J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. **Experimental cell research**, v. 301, n. 1, p. 43-49, 2004.

WIEDEMANN, Peter. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. **Survey of ophthalmology**, v. 36, n. 5, p. 373-384, 1992.

XU, Ning *et al.* Fasudil inhibits proliferation and collagen synthesis and induces apoptosis of human fibroblasts derived from urethral scar via the Rho/ROCK signaling pathway. **American journal of translational research**, v. 9, n. 3, p. 1317, 2017.

YOKOTA, Seiji *et al.* ROCK/actin/MRTF signaling promotes the fibrogenic phenotype of fibroblast-like synoviocytes derived from the temporomandibular joint. **International journal of molecular medicine**, v. 39, n. 4, p. 799-808, 2017.

ZHANG, Xuejiao *et al.* Rho kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity. **Cellular & molecular biology letters**, v. 16, n. 2, p. 279-295, 2011.

ZHANG, Xiao-hui; FENG, Zhao-hui; WANG, Xiao-yu. The ROCK pathway inhibitor Y-27632 mitigates hypoxia and oxidative stress-induced injury to retinal Müller cells. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 3, p. 549, 2018.

ZHANG, Jingjing *et al.* ROCK inhibitors alleviate myofibroblast transdifferentiation and vascular remodeling via decreasing TGF β 1-mediated RhoGDI expression. **General physiology and biophysics**, v. 38, n. 4, p. 271, 2019.

ZHANG, Ji-Gang *et al.* Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 α , RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling. **BMC cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

ZHOU, Hong *et al.* Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses high glucose-induced proliferation and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 6, p. 387-394, 2011.

ZHU, Jing *et al.* Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF- β in ARPE-19. **International journal of ophthalmology**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.