

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

TARCYANE BARATA GARCIA

O FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO INIBE O EDEMA CITOTÓXICO DE
CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES DA RETINA DE RATO POR
MEIO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS GLIAIS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO E PURINÉRGICO

BELÉM

2015

TARCYANE BARATA GARCIA

O FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO INIBE O EDEMA CITOTÓXICO DE
CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES DA RETINA DE RATO POR
MEIO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS GLIAIS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO E PURINÉRGICO

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, ICB-UFPA.

BELÉM

2015

TARCYANE BARATA GARCIA

O FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO INIBE O EDEMA CITOTÓXICO DE
CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES DA RETINA DE RATO POR
MEIO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS GLIAIS: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO E PURINÉRGICO

Tese de Doutorado submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, ICB-UFPA.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. LUIZ CARLOS DE LIMA SILVEIRA – 1º Avaliador
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Prof. Dr. GIVAGO DA SILVA SOUZA– 2º Avaliador
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

Prof^a. Dr^a. KAREN RENATA HERCULANO MATOS OLIVEIRA – 3º Avaliador
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. EVANDER DE JESUS OLIVEIRA BATISTA – Suplente
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

BELÉM

2015

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Patofisiologia da Neuroglia no Instituto de Pesquisa Cerebral Paul-Flechsig (PFI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Leipzig na Alemanha, sob a supervisão dos professores Dr. Andreas Reichenbach e Dr. Andreas Bringmann, na vigência de auxílios concedidos pela Comunidade Alemã para Manutenção e Promoção da Pesquisa (*Deutsche Forschungsgemeinschaft*) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Ciência sem fronteiras (SWE), Processo 237567/2012-1. A última parte do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano, na vigência de auxílios concedidos pelo CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). Os resultados da presente tese foram publicados no periódico internacional *Journal of Neurochemistry*.

Àqueles que amo, que me amam e
compartilham dos meus sonhos,
meus pais **Tarcízio e Maria Garcia**,
minha irmã **Tarcymara Garcia**,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Todo meu reconhecimento e sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e me apoiaram na realização desta tese, em especial:

Ao meu orientador **Prof. Dr. Anderson Herculano** pelo apoio e incentivo durante todos estes anos de convivência e pesquisa científica. Aos meus orientadores do doutorado sanduíche, **Prof. Dr. Andreas Reichenbach**, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e me deu a oportunidade de realizar esta pesquisa em Leipzig, me permitindo crescer científica e culturalmente; e **Prof. Dr. Andreas Bringmann**, que muito me auxiliou no delineamento dos experimentos e na elaboração do manuscrito.

Às agências de fomento, **CNPq** e **CAPES** que tornaram este trabalho financeiramente viável. A **UFPA**, **ICB**, **PNBC** e seus servidores. Aos alunos e professores do **LNE**, um grupo de pesquisa forte e competente. A **Universidade de Leipzig** e membros do **PFI**, em particular aos meus co-orientadores **Thomas Pannicke**, **Antje Grosche** e **Stefanie Vogler** que me ajudaram a dar os primeiros passos na Alemanha e me ensinaram as técnicas realizadas neste estudo. Ao Prof. **Wolfgang Härtig** e aos colegas de laboratório **Saddam Rahman**, **Heidrun Kuhrt**, **Valentina Dallacasagrande**, **Silke Agte**, **Anett Karl**, **Claudia Göhler**, **Lysann Wagner**, **Nicole Körber**, e em especial a **Benjamin Berk** com quem eu pude compartilhar a autoria de dois artigos, resultantes de um ótimo trabalho em dupla.

Às garotas que me incentivam e me animam sempre. As amigas do coração que me enchem de orgulho, **Tatiane Mota**, **Keuri Eleutério**, **Adriene Seabra**, **Susanne Suely**, **Suellen Moraes** e **Danielle Braga**.

A minha vizinha **Dora**, meus tios, tias, primos e primas paternos e maternos, meus irmãos **Arleidson** e **Daniele**, que estão sempre dispostos a ajudar.

Meu namorado **Tino Radoi** que alegrou os meus dias, me deu mais motivos para continuar em Leipzig, me apoiou fortemente durante o doutorado e que me faz querer ir sempre além. E a nossa família, **Britta** e **Michael Radoi**, **Nicole**, **Tobias** e **Jasmin**, que tornaram o período do sanduíche recheado de momentos doces.

A minha família, meus pais **Maria da Paz** e **Tarcízio Garcia**, e a minha irmã **Tarcymara Garcia**, que são as pessoas que não me deixam desistir nunca. Pessoas para as quais nunca haverá palavras suficientes para expressar minha gratidão. Amo vocês! E também, a meu **Deus** que é grande e nunca me abandonou.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

O fator de crescimento do nervo (NGF) pode retardar a degeneração celular na retina de ratos em diferentes injúrias retinianas. O acúmulo de água em células da retina contribui para o desenvolvimento de edema retiniano e degeneração neuronal. Em atribuição ao seu efeito protetor, este trabalho teve por objetivo avaliar se o NGF influencia o edema celular osmótico em células de Müller e células bipolares. Assim, montagens planas, fatias de retina e células isoladas da retina de ratos foram superfundidas com solução hipo-osmótica na presença de BaCl₂. Secções retinianas foram utilizadas para imunomarcações, e a liberação de adenosina foi medida por cromatografia líquida de alta eficácia, em montagens planas. A área de secção transversal celular foi medida antes e após a superfusão em meio hipo-osmótico, em fatias de retina e suspensões celulares. Tanto células de Müller quanto células bipolares foram imunopositivas para TrkA, mas somente células de Müller foram marcadas contra p75^{NTR} e NGF. A hipo-osmolaridade induziu um rápido e significativo aumento da liberação de adenosina endógena em retinas controle, mas não em retinas perfundidas com BaCl₂. O NGF inibiu o edema citotóxico em células de Müller e em células bipolares em fatias de retina controle e retinas pós-isquêmicas submetidas a condições hipo-osmóticas. Por outro lado, NGF impediu o edema citotóxico da célula de Müller isolada, mas não da célula bipolar isolada (em meio hipo-osmótico contendo íons Ba²⁺). Isto sugere que NGF induz a liberação de fatores por células de Müller, os quais inibem o edema citotóxico de células bipolares em fatias de retina. O efeito inibitório do NGF sobre o edema citotóxico de células de Müller foi mediado pela ativação do receptor TrkA, mas não de p75^{NTR}, e foi anulado por bloqueadores de receptores metabotrópicos de glutamato, receptores de adenosina A₁, e receptores do fator de crescimento de fibroblasto (FGF). O bFGF evitou o edema citotóxico de células de Müller isoladas, mas inibiu somente em parte o edema citotóxico de células bipolares isoladas. O bloqueio de FGFR impediu o efeito inibidor de edema celular da adenosina, sugerindo que a liberação de bFGF ocorre após à ativação autócrina/parácrina de receptores A₁. Além de bFGF, GDNF e TGF-β1 reduziram em parte o edema citotóxico da célula bipolar. Estes dados sugerem que o efeito neuroprotetor do NGF é em parte mediado pela prevenção de edema citotóxico de células gliais e bipolares da retina.

Palavras-chave: NGF, estresse osmótico, isquemia, edema celular, retina.

ABSTRACT

Nerve growth factor (NGF) stimulates two types of receptors (TrkA and p75^{NTR}), and it delays cell degeneration in rats under several retinal injuries, including retinitis pigmentosa, glaucoma and retinal ischemia. Because water accumulation in retinal neurons and glial cells are pathogenic factors involved in retinal degeneration under ischemic-hypoxic and inflammatory conditions, we tested whether NGF may influence the osmotic swelling of rat Müller glial and bipolar cells. Retinal slices and freshly isolated cells were perfused with hypoosmotic solution in the presence of BaCl₂. Post-ischemic retinal cells were also superfused with hypoosmotic solution in the absence of BaCl₂. We observed that NGF inhibits the osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells induced by superfusion of retinal slices with a hypoosmotic solution containing barium ions. NGF also reduced the hypoosmotic swelling of Müller and bipolar cells in the post-ischemic retina. On the other hand, NGF prevented the swelling of freshly isolated Müller cells, but not of isolated bipolar cells. This suggests that NGF induces a release of factors from Müller cells which inhibit the swelling of bipolar cells in retinal slices. The inhibitory effect of NGF on the Müller cell swelling was mediated by activation of TrkA, but not p75^{NTR}, and was prevented by blockers of metabotropic glutamate receptors, purinergic P2Y₁ receptors, adenosine A₁ receptors, and fibroblast growth factor (FGF) receptors. bFGF fully prevented the osmotic swelling of isolated Müller cells, but inhibited only in part the swelling of isolated bipolar cells. Because inhibition of FGF receptors prevented the swelling-inhibitory effect of adenosine, it is suggested that NGF-induced autocrine/paracrine activation of adenosine A₁ receptors induces a release of bFGF from Müller cells. In addition to bFGF, GDNF and TGF-β1 reduced in part the swelling of bipolar cells. Both Müller and bipolar cells displayed TrkA immunoreactivity, while Müller cells were also immunostained for p75^{NTR} and NGF. The data may suggest that the neuroprotective effect of NGF in the retina is in part mediated by prevention of the cytotoxic swelling of retinal glial and bipolar cells.

Key words: NGF, osmotic stress, ischemia, cell swelling, retina.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1.	Organização laminar da retina de vertebrados	18
Figura 2.	Célula de Müller e célula bipolar da retina	22
Figura 3.	Tipos de edema e regulação de volume osmótico	26
Figura 4.	Receptores com atividade cinase	34
Figura 5.	Representação esquemática do sistema de perfusão	50
Figura 6.	Aparatos utilizados para análise da mudança de volume celular em fatias de retina.....	53
Figura 7.	Mensuração do aumento de volume celular.....	58
Figura 8.	Imunolocalização de NGF na retina de rato	60
Figura 9.	Imunolocalização de TrkA na retina de rato	61
Figura 10.	Imunolocalização de p75 ^{NTR} na retina de rato	63
Figura 11.	Identificação de células de Müller e células bipolares da retina de rato	65
Figura 12.	Perfil da liberação temporal de adenosina endógena em condições de hipo-osmolaridade	67
Figura 13.	Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico dos somas de células de Müller e células bipolares em fatias da retina de rato.....	68
Figura 14.	Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares recém-isoladas da retina de rato.....	69
Figura 15.	Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico dos somas de células de Müller e células bipolares da retina pós-isquêmica de rato.....	71
Figura 16.	Efeito do bloqueio dos receptores de NGF, TrkA e p75 ^{NTR} sobre a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller mediada por NGF.....	72

Figura 17.	Avaliação da transativação de receptor sobre a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares induzida por NGF.....	74
Figura 18.	Análise da ativação da sinalização de bFGF sobre o efeito de inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller, mediado por NGF (1 ng/ml)	75
Figura 19.	Análise da relação entre as vias de sinalização de bFGF e adenosina sobre a inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller.....	76
Figura 20.	Efeito de diferentes citocinas (10 ng/ml) sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares em fatias de retina e recém-isoladas...	78
Figura 21.	Dependência da inibição de inchaço sobre a abertura de canais iônicos	80
Figura 22.	Esquema hipotético da via de sinalização induzida por NGF, envolvida na regulação de volume de células de Müller e células bipolares da retina de rato.....	90
Quadro 1.	Fatores tróficos com reconhecidas atividades no sistema nervoso ...	33
Tabela 1.	Efeitos protetores de vários fatores neurotróficos em diferentes tipos celulares da retina de rato, investigados na última década.....	35
Tabela 2.	Efeito protetor do NGF sobre a redução de diferentes tipos celulares na retina em vários modelos de injúria retiniana em ratos..	39
Tabela 3.	Lista de anticorpos primários e secundários utilizados nas imunomarcações e suas respectivas concentrações de uso	49
Tabela 4.	Substâncias-Teste aplicadas por um sistema de perfusão mantido por gravidade	56

LISTA DE SIGLAS

- ARV** – Aumento Regulador de Volume
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BDNF** – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
- bFGF ou FGF-2** – Fator de Crescimento de Fibroblasto básico
- BHR** - Barreira Hemato-Retiniana
- BMPs** – Proteínas Morfogenéticas Ósseas
- CaMK**– Proteína-Cinase dependente de Ca^{2+}
- CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCG** – Camada de Células Ganglionares
- CGR** – Células Ganglionares da Retina
- CLAE**– Cromatografia Líquida de Alta Eficácia
- CNE** – Camada Nuclear Externa
- CNI** – Camada Nuclear Interna
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPE** – Camada plexiforme Externa
- CPI** – Camada Plexiforme Interna
- DMRI** – Degeneração Macular Relacionada à Idade
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DRV** – Diminuição Reguladora de Volume
- EGF** – Fator de Crescimento Epidérmico
- EGFR** – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
- EPM** – Erro Padrão da Média
- EPO** – Eritropoietina
- EPR** – Epitélio Pigmentar Retiniano
- FGFR** – Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblasto

GABA– Ácido γ -aminobutírico

GDNF – Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem Celular Glial

GFAP – Proteína Fibrilar Glial Ácida

GS – Glutamina Sintetase

GSH – Glutathiona Reduzida

HB-EGF – fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

JNK – c-Jun N-terminal Cinase

LSM – Microscópio Confocal de Varredura a Laser

MTO - *Mitotracker Orange*

NGF – Fator de Crescimento do Nervo

NT3, 4 – Neurotrofina 3, 4

OPN – Osteopontina

p75NTR – Receptor pan-NT75

PBS – Tampão Fosfato Salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K– Cinase do Fosfatidilinositol 3

PKC– Proteína Cinase C

PLC – Fosfolipase C

RET – Receptor Tirosina-cinase

SFR – Segmentos de Fotorreceptores

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF- α,β – Fator de crescimento transformante- α,β

TRAR6 – Fator 6 Associado ao Receptor TNF

TrkA – Receptor tirosino-cinase subtipo A

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 RETINA	17
2.1.1 Células de Müller	19
2.1.2 Células bipolares	21
2.2 PROPRIEDADES OSMÓTICAS E ALTERAÇÃO DO VOLUME CELULAR	23
2.3 EDEMA	25
2.4 MANUTENÇÃO E REGULAÇÃO DO VOLUME OSMÓTICO	27
2.4.1 Regulação do volume celular na retina de roedores	29
2.5 O PAPEL DOS FATORES NEUROTROFICOS NA RETINA	31
2.5.1 Fator de crescimento do nervo (NGF)	32
2.5.2 Fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF-2, bFGF)	38
2.5.3 Fator de crescimento epidérmico (EGF)	40
2.5.4 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	41
2.5.5 Fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF)	42
2.5.6 Fator de crescimento transformante-β1 (TGF-β1)	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 ANIMAIS.....	47
4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	47
4.3 IMUNOCITOQUÍMICA.....	48
4.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE ADENOSINA	48
4.4.1 Perifusão dos tecidos retinianos	48
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE)	51
4.5 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO RETINIANA	52

4.6	PREPARO DAS FATIAS DE RETINA	52
4.7	PREPARO DE CÉLULAS RETINIANAS ISOLADAS	54
4.8	SOLUÇÕES	54
4.9	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE VOLUME CELULAR	55
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	59
5.1	LOCALIZAÇÃO DE NGF, TRKA E P75 ^{NTR} NA RETINA	59
5.2	IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES EM FATIAS DE RETINA	62
5.3	PERFIL DE LIBERAÇÃO DE ADENOSINA ENDÓGENA EM CONDIÇÕES HIPO-OSMÓTICAS	66
5.4	INCHAÇO HIPO-OSMÓTICO DO SOMA DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES	66
5.5	INIBIÇÃO DE INCHAÇO OSMÓTICO POR NGF	70
5.6	DEPENDÊNCIA DO EFEITO DO NGF SOBRE A TRANSATIVAÇÃO DE RECEPTOR	73
5.7	DEPENDÊNCIA DO EFEITO DO NGF SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCINA	73
5.8	DEPENDÊNCIA DA LIBERAÇÃO GLIAL DE bFGF SOBRE A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DE ADENOSINA	77
5.9	DEPENDÊNCIA DA INIBIÇÃO DE INCHAÇO SOBRE A ABERTURA DE CANAIS IÔNICOS	79
6	DISCUSSÃO	81
6.1	IMUNOREATIVIDADE PARA NGF, TRKA E P75 ^{NTR}	81
6.2	LIBERAÇÃO DE ADENOSINA	82
6.3	INCHAÇO OSMÓTICO DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES DA RETINA	83
6.4	MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO INCHAÇO OSMÓTICO POR NGF	84
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
7	CONCLUSÃO	91
8	REFERÊNCIAS	93
9	APÊNDICE	115

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de edema tecidual é uma complicação notória em doenças hipóxico-isquêmicas e inflamatórias retinianas, incluindo a retinopatia diabética, uveíte e doença vascular aterosclerótica. Devido à compressão mecânica de neurônios retinianos, fibras nervosas e vasos sanguíneos, o edema contribui para condições hipóxico-isquêmicas, bem como, enfraquecimento funcional e morte de fotorreceptores e neurônios (BRINGMANN *et al.*, 2004, 2005).

Somado ao desarranjo da barreira hematoencefálica (edema vasogênico) e à liberação irregular de fluido através das células gliais e do epitélio pigmentar retinianos, o inchaço osmótico de neurônios e células gliais (edema citotóxico) é um mecanismo patogênico associado ao desenvolvimento de edema retiniano (BRINGMANN *et al.*, 2004, 2005). Em modelos animais de hipóxia-isquemia retiniana e retinopatia diabética experimental, observa-se o acúmulo de água no espaço intersticial da retina e no interior de células gliais de Müller (STEPINAC *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2013).

Células gliais de Müller e bipolares da retina se diferenciam fisiologicamente em sua resposta à mudança de volume celular em situação de estresse osmótico. Enquanto as células de Müller não incham quando sujeitas a estresse osmótico, células bipolares exibem um rápido inchaço de seus corpos celulares sob essas condições (VOGLER *et al.*, 2013). O inchaço hipo-osmótico de células bipolares é induzido pela ativação de receptores metabotrópicos de glutamato e transportadores de glutamato dependentes de Na^+ . A atividade destas proteínas resulta em influxo de Na^+ , o qual está associado com fluxo de água (VOGLER *et al.*, 2013). Em condições homeostáticas, o inchaço celular é controlado por canais de K^+ retificadores de influxo, os quais podem ser bloqueados por íons Ba^{2+} (NEWMAN, 1989). Células de Müller submetidas a condições hipo-osmóticas na presença de íons Ba^{2+} apresentam inchaço imediato de seus somas. Assim, sugere-se que o fluxo transmembrana passivo de K^+ é uma forma de regulação de volume destas células (PANNICKE *et al.*, 2004). Além disso, as células de Müller possuem um mecanismo de sinalização glutamatérgico-purinérgico endógeno que impede o inchaço osmótico (UCKERMANN *et al.*, 2006; WURM *et al.*, 2008). Alguns fatores neuroprotetores, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), ativam a cascata de sinalização inibidora de inchaço de células de Müller (WURM *et al.*,

2008; KRÜGEL et al., 2010; WAHL et al., 2013), o que pode representar um dos seus mecanismos de neuroproteção.

Vários fatores de crescimento e citocinas, incluindo o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF ou FGF-2), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF), promovem a sobrevivência de fotorreceptores, células ganglionares e bipolares, em condições patogênicas (SIEVERS et al., 1987; FAKTOROVICH et al., 1992; MANSOUR-ROBAEY et al., 1994; WEXLER et al., 1998; Revisado em BRINGMANN et al., 2009a). Sabe-se que as ações simultâneas de vários fatores tróficos é necessária para promover efetivamente a sobrevivência de fotorreceptores (OGILVIE et al., 2000), e que a sobrevivência destas células e neurônios é, pelo menos em parte, diretamente influenciada pela regulação da produção de fatores tróficos por células gliais de Müller (WEXLER et al., 1998; HARADA et al., 2002).

O fator de crescimento do nervo (NGF) é expresso na retina, onde controla a sobrevivência neuronal por dois tipos de receptores: o receptor de alta-afinidade, tirosina-cinase subtipo A (TrkA) e o receptor de baixa-afinidade pan-NT (p75^{NTR}) (COASSIN et al., 2008; LEBRUN-JULIEN et al., 2009; BAI et al., 2010).

Os resultados de estudos *in vitro* sobre os efeitos do NGF na sobrevivência de neurônios retinianos são contraditórios. Primeiramente, verificou-se que NGF diminui a produção de bFGF por células de Müller, resultando em elevada apoptose de fotorreceptores (HARADA et al., 2000; NAKAMURA et al., 2005). Em outro estudo, a ativação de p75^{NTR} parece ter engatilhado a liberação de bFGF por células de Müller, resultando em maior sobrevivência de células bipolares (WEXLER et al., 1998). Em ratos diabéticos, a apoptose retiniana está associada com o aumento da expressão de p75^{NTR}, entretanto o tratamento com NGF impede a morte de células ganglionares da retina e células de Müller (HAMMES et al., 1995). Por fim, o NGF tem se mostrado como um fator significativamente protetor em diferentes modelos experimentais de injúria retiniana (CARMIGNOTO et al., 1989; SILIPRANDI et al., 1993; LENZI et al., 2005; SUN et al., 2007; SIVILIA et al., 2009; COLAFRANCESCO et al., 2011; KOKONA et al., 2012). Uma vez que, o acúmulo de água em neurônios e células gliais da retina é um fator patogênico envolvido na degeneração retiniana, em condições hipóxico-isquêmicas e inflamatórias, no presente trabalho testamos se o NGF pode influenciar o inchaço de células gliais de Müller e células bipolares da retina de rato em condições hipóxico-isquêmicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RETINA

A retina é uma parte do sistema nervoso central (SNC), caracterizada como uma fina camada de tecido nervoso, responsável pela conversão de energia luminosa em atividade neural (DOWLING, 1970; WU, 2010; ERSKINE; HERRERA, 2014).

A retina de mamíferos é composta por mais de 60 tipos celulares diferentes, cada um exercendo um papel específico no processamento da informação visual (MASLAND, 2011, 2012). Estas células estão agrupadas em categorias distintas que, por sua vez, apresentam várias subclassificações. Dentre as principais classes, destacam-se os fotorreceptores (cones e bastonetes), células horizontais, células bipolares, células amácrinas, células ganglionares da retina (CGR) e glia de Müller (DONOVAN; DYER, 2005; MASLAND, 2011).

As células da retina estão organizadas em camadas, designadas com relação ao centro do globo ocular (Fig. 1). Assim, a camada mais interna é a camada de células ganglionares (CCG), onde estão os corpos celulares das CGR. A seguir está a camada nuclear interna (CNI), que contém os corpos celulares das células bipolares, células horizontais e amácrinas. A camada posterior é denominada camada nuclear externa (CNE), onde estão os corpos celulares dos fotorreceptores. Por fim, encontra-se a camada dos segmentos externos dos fotorreceptores (SFR), (ou camada de cones e bastonetes), que contém os elementos sensíveis a luz, embebidos em um epitélio pigmentar. Entre a camada de células ganglionares e a camada nuclear interna está a camada plexiforme interna (CPI) – onde se estabelecem contatos sinápticos entre células bipolares, amácrinas e ganglionares. Já entre as camadas nuclear interna e externa encontra-se a camada plexiforme externa (CPE), onde os fotorreceptores estabelecem contatos sinápticos com células bipolares e horizontais (DOWLING, 1970; WU, 2010).

Para separar a retina neural da circulação sanguínea, uma barreira hemato-retiniana (BHR) é formada, restringindo o transporte de substâncias e

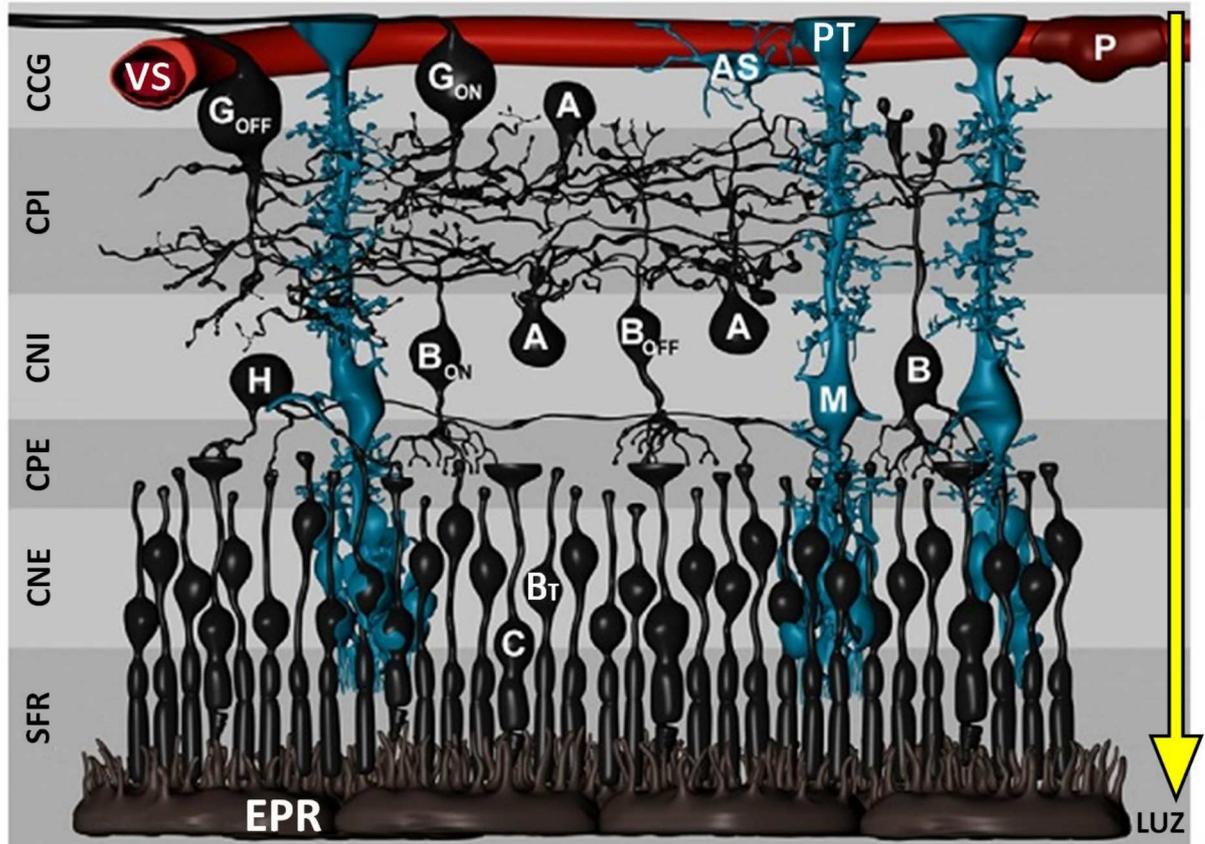


Figura 1. Organização laminar da retina de vertebrados. A retina neural é formada por diferentes camadas. Na camada nuclear externa (CNE), podem ser observados os corpos celulares de fotorreceptores, cones (C) e bastonetes (B_T); Na camada nuclear interna (CNI), observam-se os corpos celulares de células bipolares (B), horizontais (H), amácrinas (A) e células de Müller (M); Na camada de células ganglionares (CCG), estão localizados os corpos celulares de células ganglionares (G); Na camada plexiforme externa (CPE) observam-se os contatos sinápticos entre fotorreceptores e células bipolares e horizontais; Na camada plexiforme interna (CPI) se estabelecem contatos sinápticos entre células bipolares, amácrinas e ganglionares. A camada de segmentos dos fotorreceptores (SFR) se estende em direção ao espaço subretiniano; os segmentos externos são circundados por microvilosidades do epitélio pigmentar retiniano (EPR). Em retinas vascularizadas, a parte mais interna da retina contém vasos sanguíneos (VS), com pericitos (P), bem como, astrócitos (AS), os quais fazem contato com fibras nervosas e vasos sanguíneos. Os processos citoplasmáticos mais externos das células de Müller circundam os somas de fotorreceptores, enquanto que seus processos citoplasmáticos mais internos formam pés-terminais (PT). A transmissão dos sinais visuais é mediada por fotorreceptores, células bipolares ON e OFF, e células ganglionares. O processamento de informação lateral é mediado por células horizontais e amácrinas. A luz deve passar através de diversas camadas de células antes de atingir os fotorreceptores na parte posterior da retina. Fonte: Modificado e adaptado de Bringmann et al., 2009a.

assim proporcionando um meio seguro e constante (HOSOYA; TOMI, 2005). A BHR é subdividida em duas barreiras celulares: a barreira hemato-retiniana interna, formada pela junção ocludente das células endoteliais dos capilares retinianos, recobertos por pericitos e células glias; e a barreira hemato-retiniana externa, formada por células do epitélio pigmentar retiniano (EPR) (KUBO; HOSOYA, 2012).

A via mais direta para o processamento da informação visual na retina, a via radial, parte dos fotorreceptores em direção às células bipolares e, por conseguinte para às células ganglionares. Estas últimas disparam potenciais de ação em resposta à luz, que se propagam para o restante do encéfalo, através do nervo óptico. As células horizontais e as células amácrinas também participam do processamento visual na retina, compondo as vias laterais. Estas primeiras recebem aferentes dos fotorreceptores e projetam neuritos lateralmente para influenciar as células bipolares vizinhas e os fotorreceptores, enquanto que as últimas recebem aferentes das células bipolares e projetam lateralmente para influenciar células ganglionares, células bipolares e outras células amácrinas adjacentes (WU, 2010).

2.1.1 Células de Müller

Presente na retina de todos os vertebrados, a célula de Müller é a glia radial, a qual se estende verticalmente por toda a profundidade da retina (DOWLING, 1970). Seu corpo celular está localizado na parte central da CNI, de onde partem dois processos citoplasmáticos diretos. Um deles termina em um dilatado pé-terminal na borda interna da retina, adjacente ao humor vítreo, enquanto que o outro termina na camada dos segmentos de fotorreceptores (Fig. 1, NEWMAN; REICHENBACH, 1996).

As células de Müller interagem, virtualmente, com todos os neurônios da retina (BRINGMANN et al., 2006), formando um vínculo anatômico e funcional entre os neurônios retinianos e os compartimentos com os quais eles precisam realizar trocas de moléculas, incluindo os vasos sanguíneos e a câmara vítrea. Podem também fornecer substâncias tróficas aos neurônios e remover os resíduos metabólicos

(BRINGMANN et al., 2009a). Juntamente com os astrócitos, as células de Müller removem a maior parte do glutamato presente no espaço extracelular, incluindo o conteúdo que se difunde para fora da fenda sináptica, desta forma, impedindo a propagação lateral do neurotransmissor (RAUEN et al., 1998). A remoção de glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) do espaço extracelular e a metabolização destes transmissores por células de Müller fazem parte do ciclo glutamato-glutamina, e estão relacionadas com outras funções celulares como o suporte metabólico aos neurônios e a detoxificação do excesso de amônia (BRINGMANN et al., 2013).

Como outras células gliais, as células de Müller também expressam diversos tipos de canais iônicos controlados por voltagem, bem como, canais de K^+ retificadores de influxo e canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (NEWMAN; REICHENBACH, 1996). Muitos tipos de receptores e transportadores de neurotransmissores (glutamatérgicos, gabaérgicos e purinérgicos) também podem ser observados na membrana das células de Müller (BELECKY-ADAMS, 2013).

Interações neurônio-glia são mediadas em parte pela liberação de substâncias por células gliais (NEWMAN, 2004a). Sugere-se que o estímulo luminoso pode levar à liberação de adenosina trifosfato (ATP) neuronal, a qual pode ativar receptores P2Y na membrana de células de Müller na retina de rato (NEWMAN, 2005). Já o ATP liberado por células de Müller também pode influenciar a atividade de disparo de células ganglionares da retina (NEWMAN, 2004b).

As células de Müller da retina de rato apresentam um trocador cistina-glutamato independente de Na^+ (POW, 2001; TOMI et al., 2003). Normalmente cistina é captada por meio deste trocador e reduzida à cisteína, usada para a produção do tripeptídeo antioxidante glutatona (GSH). Na retina recém-isolada, a maior parte da GSH está presente principalmente em células de Müller, as quais podem disponibilizar a molécula antioxidante para neurônios em condições isquêmicas na retina (SCHÜTTE; WERNER, 1998).

Novas funções foram recentemente atribuídas às células de Müller, incluindo: dispersão de luz – reduzindo-se a acuidade e sensibilidade à

luz em áreas fora da fóvea; direcionamento de luz – agindo como fibras óticas que guiam a luz através das camadas retinianas mais internas em direção aos fotorreceptores; formação de um substrato macio para proteção de neurônios em caso de um trauma mecânico e para plasticidade neuronal; liberação de moléculas de sinalização neuroativas; regulação autócrina de volume celular; e funcionamento como células-tronco/progenitoras para a neuroregeneração (REICHENBACH; BRINGMANN, 2013).

A figura 2A reúne as principais funções da célula glial de Müller na retina de mamíferos.

2.1.2 Células bipolares

Células bipolares são interneurônios retinianos, cruciais para a sinalização visual. A partir do corpo destas células dois grupos de processos citoplasmáticos são originados (EGGERS; LUKASIEWICZ, 2011).

Enquanto seus dendritos residem na CPE, os terminais sinápticos das células bipolares encontram-se na CPI (Fig. 1), onde estão expostos a uma variedade de circuitos que modulam as aferências sinápticas (WAN; HEIDELBERGE, 2011).

Na retina de vertebrados, as células bipolares fazem contato com todos os outros tipos neuronais e formam a principal via através da qual a informação visual codificada por fotorreceptores é transmitida da retina externa para a retina interna e então para os neurônios eferentes da retina, as células ganglionares. (WAN; HEIDELBERGE, 2011; EULER et al., 2014).

Morfologicamente as células bipolares são classificadas de acordo com seu padrão de ramificação, número de fotorreceptores com os quais fazem contato, bem como, a forma e a estratificação de seus axônios na CPI (WÄSSLE et al, 2009). Até pouco tempo, 12 subtipos de células bipolares haviam sido identificadas em camundongos, sendo 11 células bipolares dos cones e 1 célula bipolar dos bastonetes (Fig. 2B, WÄSSLE

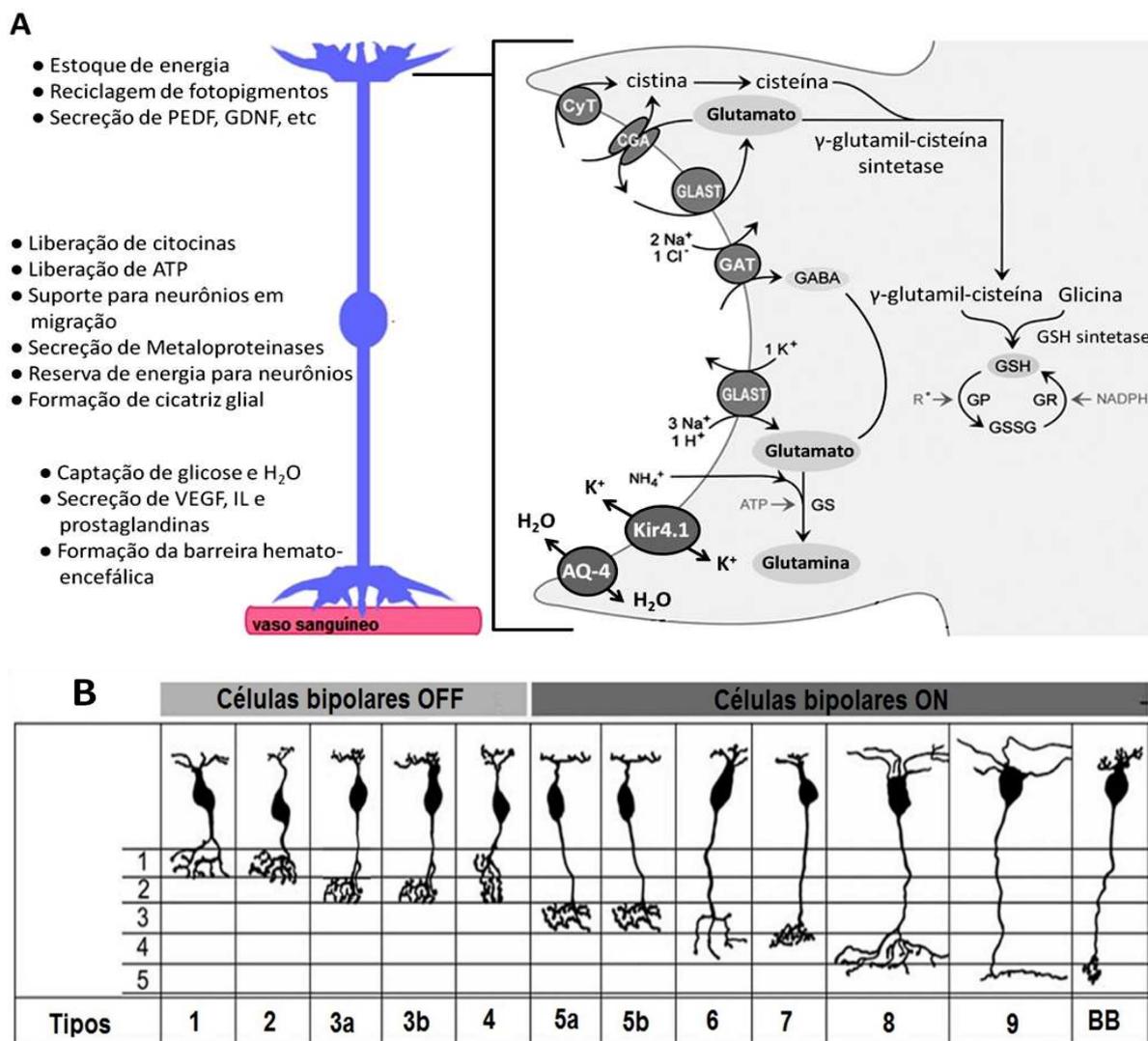


Figura 2. Célula de Müller e célula bipolar da retina. (a) Funções das células de Müller na retina de mamíferos. O lado direito mostra os sistemas de captação de neurotransmissores e algumas vias metabólicas. Glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e amônia (NH_4^+) são captados e podem ser convertidos a glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS). Cistina pode ser captada e reduzida à cisteína, utilizada na síntese do antioxidante glutatona (GSH). Em condições de estresse oxidativo, GSH pode ser liberada pelas células de Müller e captada por neurônios. As células de Müller podem ainda contribuir com a regulação de volume osmótico por meio da remoção do fluido retiniano, com o transporte de K^+ e água pelo canal Kir4.1 e por meio do canal de água glial, aquaporina-4 (AQ-4), respectivamente. GDNF, fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; IL, interleucina; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; CGA, trocador cistina-glutamato; CyT, transportador de cistina; GLAST, transportador de glutamato/aspartato; GAT, transportador de GABA; GP, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase, GSSG, glutatona dissulfeto. Fonte: Modificado de Bringmann et al., 2009 e Belecky-Adams et al., 2013. (b) Representação esquemática dos Tipos de células bipolares da retina de camundongo determinados por Ghosh et al. (2004), complementados por Wässle et al. (2009). BB, célula bipolar dos bastonetes. Fonte: Modificado de Wässle et al. (2009).

et al, 2009; MASLAND, 2012). Mais recentemente, uma última pesquisa descreveu um novo tipo de célula bipolar, a qual foi denominada 'XBC' (HELMSTAEDTER et al., 2013). Funcionalmente, as células bipolares podem ser classificadas, de acordo com suas respostas à luz, em células bipolares ON e células bipolares OFF. Esta diferença se dá pela expressão de distintos receptores de glutamato nas sinapses entre fotorreceptores e células bipolares (EGGERS; LUKASIEWICZ, 2011).

Tipos diferentes de células bipolares reúnem e moldam os sinais provenientes de fotorreceptores para processamento adicional na retina interna, e com isso realizam as primeiras operações básicas do sistema visual (EULER et al., 2014).

2.2 PROPRIEDADES OSMÓTICAS E ALTERAÇÃO DO VOLUME CELULAR

Com raras exceções, a membrana citoplasmática da célula animal é altamente permeável à água e pouco permeável aos íons Na^+ , K^+ e Cl^- (LANG, 1998; HOFFMANN; LAMBERT; PEDERSEN, 2008). O movimento de água através de uma membrana semipermeável, a partir de uma solução com menor concentração de soluto para uma solução com maior concentração de soluto, é chamado osmose, e a pressão requerida para deter tal movimento é denominada pressão osmótica (LORD, 1999; STRANGE, 2004). Este fluxo de água deverá continuar até que a concentração do soluto em ambas as soluções seja igualada e o equilíbrio termodinâmico seja alcançado (KAHLE et al., 2009). Ademais, o fluxo de água dependerá da diferença de concentração do soluto e da natureza da permeabilidade da membrana.

A pressão osmótica é determinada pelo número total de partículas presentes na solução independente da natureza molecular. Já o número total de partículas irá depender do grau de dissociação do soluto (LORD, 1999; STRANGE, 2004). O número de partículas presentes na solução é chamado de concentração osmolar, a qual pode ser expressa de duas maneiras: osmolalidade – número total de partículas em um quilograma de solvente (mmol/Kg) – e osmolaridade – número total de partículas em um litro de solvente (mmol/L) (LORD, 1999; STRANGE, 2004).

Os termos osmolalidade/osmolaridade e tonicidade são usados para descrever a relação osmótica entre as células e seu ambiente circundante. Contudo uma distinção deve ser feita: a osmolalidade/osmolaridade depende do número de partículas do soluto presente em uma solução, enquanto que a tonicidade depende das características de permeabilidade da membrana e conseqüentemente do gradiente osmótico através desta membrana (LORD, 1999). A tonicidade pode ser definida como o efeito que a solução extracelular exerce sobre o movimento osmótico de água para dentro ou fora das células (LORD, 1999; PEDERSEN; KAPUS; HOFFMANN, 2011). Assim, o volume celular será determinado pelo teor de compostos osmoticamente ativos, bem como, pela tonicidade extracelular (HOFFMANN; LAMBERT; PEDERSEN, 2008).

As alterações de volume celular podem ser classificadas em duas amplas categorias: alteração de volume iso-osmótica – ocorre após modificações do conteúdo de soluto intracelular – e alteração de volume aniso-osmótica – a qual ocorre após mudanças do conteúdo de soluto extracelular (STRANGE, 1992, 2004; KAHLE et al., 2009). Se os fluidos intra e extracelular possuem a mesma concentração osmótica, nenhum movimento líquido ocorrerá, a pressão osmótica será a mesma e a solução extracelular será denominada isotônica ou iso-osmótica. Quando a concentração osmótica da solução extracelular é maior que aquela do fluido intracelular, o fluido extracelular é dito hipertônico ou hiperosmótico, e por definição esta exposição hipertônica causa uma perda de água pela célula e diminuição no volume celular (retração ou encolhimento celular). De maneira oposta, quando a concentração osmótica da solução extracelular é menor que aquela do fluido intracelular, a solução extracelular é caracterizada como hipotônica ou hipo-osmótica. Esta exposição hipotônica resulta em ganho de água pela célula levando ao aumento do volume celular (inchaço ou turgidez celular) (LANG et al., 1998; PEDERSEN; KAPUS; HOFFMANN, 2011). A diminuição da osmolaridade do fluido extracelular é considerada a forma mais simples de se induzir o inchaço celular (KIMELBERG, 2005).

2.3 EDEMA

O equilíbrio da composição de solutos e volume cerebral é providenciado por uma rigorosa regulação do transporte de íons e água em todos os quatro compartimentos de fluido cerebral: no sangue e nos fluidos cerebrospinal, intersticial e intracelular (STRANGE, 1992). O acúmulo anormal de fluido em qualquer um destes compartimentos após diversas injúrias é denominado edema cerebral (SHARMA, 2006). O equivalente retiniano do edema cerebral é chamado edema macular, resultante do acúmulo de fluido nas camadas retinianas ao redor da fóvea (COSCAS; CUNHA-VAZ; SOUBRANE, 2010).

O edema pode ser classificado em diferentes subtipos dependendo da sua origem (JOO; KLATZO, 1989; MARMAROU, 2004; COSCAS; CUNHA-VAZ; SOUBRANE, 2010). O edema vasogênico ocorre devido ao acúmulo de fluido proveniente dos vasos sanguíneos adjacentes às células, subsequente a danos em vasos cerebrais, ocorrendo extravazamento de água e proteínas plasmáticas. Já o edema citotóxico ou inchaço celular é um acúmulo de água dentro da célula após mudanças no metabolismo celular ou injúria (Fig. 3A) (KLATZO, 1987). Normalmente, os edemas vasogênico e citotóxico ocorrem concomitantemente no encéfalo (KIMELBERG, 2005), e ambos os tipos podem ocorrer na retina neurosensorial (BRINGMANN et al., 2004).

O edema cerebral está associado a diferentes condições de doença, incluindo trauma, neoplasma, abscesso ou condições potencialmente patogênicas como hipóxia (MARMAROU et al., 2006; LIANG et al., 2009). Durante o acidente vascular encefálico e injúria encefálica traumática, o edema citotóxico (inchaço astrocítico) é rapidamente observado (GARCIA et al., 1994; KIMELBERG, 2005). De fato, a maior parte do fluido no SNC está contida no compartimento de fluido intracelular. Logo, alterações na quantidade de solutos intra e extracelulares podem levar a mudanças no volume celular cerebral (KAHLE et al., 2009).

O edema retiniano também está associado a doenças oculares e retinianas, contribuindo para a degeneração de fotorreceptores e morte celular neuronal (ROTSOS; MOSCHOS, 2008). Nos quadros de retinopatia diabética e uveíte, por exemplo, o edema retiniano é a principal causa de deterioração visual (BRESNICK, 1983; ROTHOVA et al., 1996).

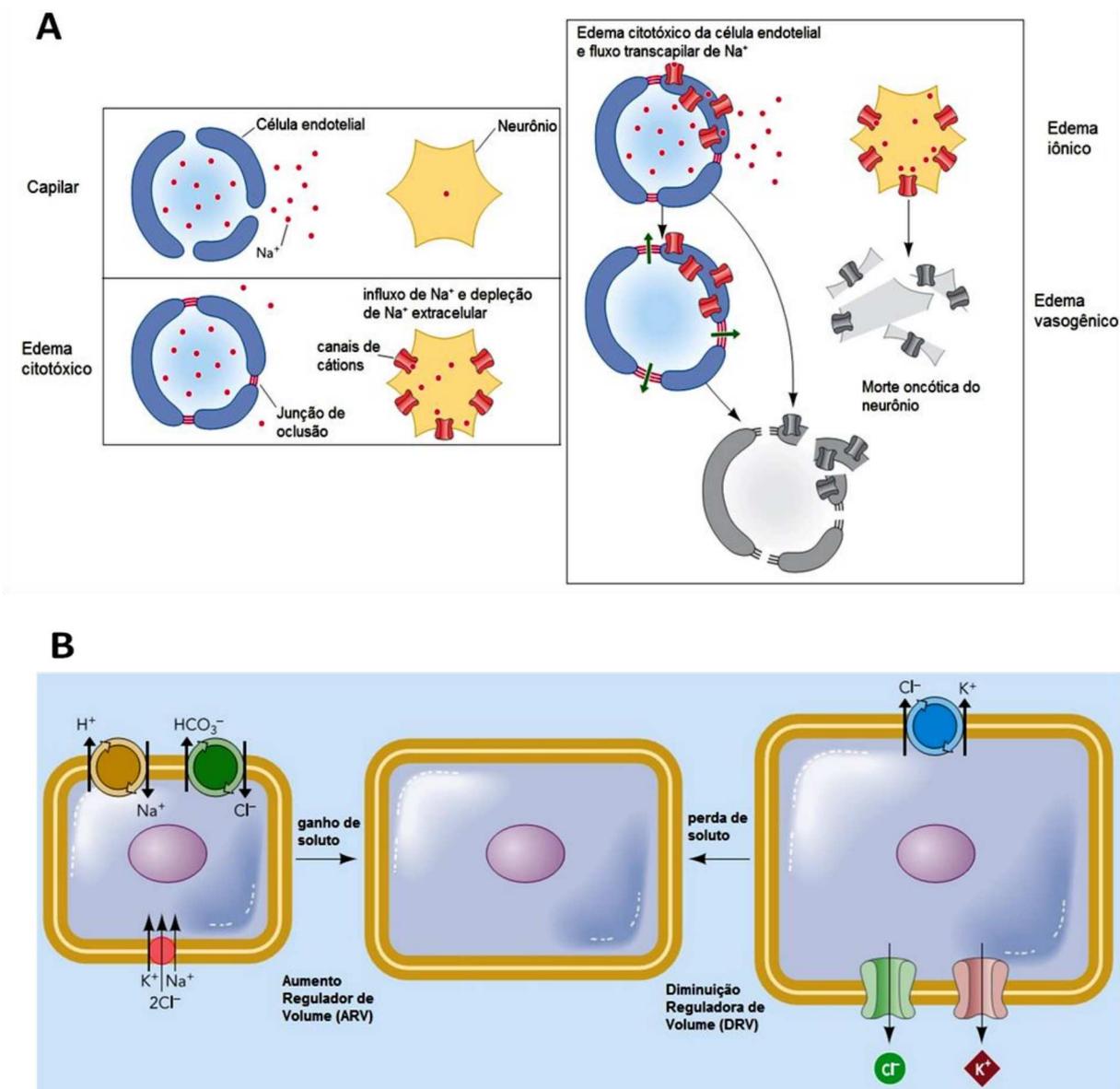


Figura 3. Tipos de edema e regulação de volume osmótico. **(a)** Mudanças na homeostase iônica formam a base para o desenvolvimento de diferentes tipos de edema que contribuem para o inchaço encefálico após diferentes injúrias isquêmicas. O edema citotóxico ocorre pela entrada de Na^+ (e outros solutos), estabelecendo gradientes iônicos e osmóticos entre o plasma e o fluido intersticial. O edema iônico ocorre quando o edema citotóxico acontece em células endoteliais, com extravasamento de Na^+ do compartimento intravascular para o espaço extracelular. O edema vasogênico resulta da quebra de junções de oclusão entre as células endoteliais, permitindo o extravasamento de fluido rico em proteínas para o fluido extracelular do cérebro. **(b)** O encolhimento celular agudo é contornado por mecanismos de aumento regulador de volume (ARV), o qual engatilha a ativação do influxo de Na^+ (com Cl^- e K^+) e água, assim aumentando o volume celular. Outras vias de influxo, como o trocador Na^+/H^+ , trabalhando em conjunto com o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, estão envolvidas. Já o inchaço celular agudo é contornado por mecanismos de diminuição reguladora de volume (DRV), envolvendo a perda celular de Cl^- e K^+ por co-transportadores de K^+/Cl^- e canais de K^+ e Cl^- ativados por inchaço. Fonte: Adaptado de Kahle et al., 2009. Originais em **(a)** McManus et al., 1995 e **(b)** Simard et al., 2007.

Tanto um aumento no volume do fluido extracelular quanto o inchaço de células glias de Müller podem contribuir para o desenvolvimento de edema retiniano (ROTSOS; MOSCHOS, 2008; COSCAS; CUNHA-VAZ; SOUBRANE, 2010). O inchaço de células de Müller parece preceder a formação de edema extracelular, que por sua vez, está associado com uma abertura na BHR, devido à quebra da barreira hemato-retiniana interna ou externa. O rompimento destas barreiras pode ser induzido pela liberação de citocinas inflamatórias locais e pode levar a liberação adicional de citocinas e fatores de crescimento pelas células que compõem a BHR (COSCAS; CUNHA-VAZ; SOUBRANE, 2010).

2.4 MANUTENÇÃO E REGULAÇÃO DO VOLUME OSMÓTICO

A manutenção do gradiente iônico e osmótico é crítica para o funcionamento adequado do SNC, uma vez que, mudanças de volume celular estão associadas a muitos processos fisiológicos, como crescimento, proliferação, diferenciação e migração (OKADA et al., 2001; WEHNER et al., 2003).

Para manter suas funções metabólicas, as células acumulam várias substâncias, incluindo proteínas, aminoácidos e carboidratos. A concentração celular em excesso destes compostos orgânicos é então contrabalanceada pela diminuição da concentração iônica intracelular (LANG et al., 1998). Desta forma, muitas células acionam bombas dependentes de energia para o transporte ativo de íons para fora da célula, contra seus gradientes eletroquímicos (OKADA et al., 2001). As bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, por exemplo, impedem respectivamente o acúmulo de Na^+ e Ca^{2+} dentro da célula, e em paralelo geram gradientes eletroquímicos necessários para o transporte iônico passivo e ativo secundário (KAHLE et al., 2009).

Além desta manutenção iônica homeostática acima descrita, o cérebro exhibe mecanismos osmorregulatórios rigorosos que lhe permitem, em condições fisiológicas, manter sua composição iônica e volume dentro de limites estreitos, quando a composição de soluto e a osmolaridade sofrem

constantes variações (STRANGE, 1992; LANG et al., 1998; WEHNER et al., 2003).

O volume celular pode ser regulado pelo ganho ou perda de compostos osmoticamente ativos, primariamente íons inorgânicos (Na^+ , K^+ e Cl^-) e/ou pequenas moléculas orgânicas denominadas osmólitos orgânicos, os quais estão agrupados em três classes distintas, polióis, metilaminas e aminoácidos como o mio-inositol, a betaína e a taurina, respectivamente (WEHNER et al., 2003; STRANGE, 2004). A água naturalmente acompanha o movimento destes osmólitos orgânicos e inorgânicos pela membrana, desta forma, restaurando o volume da célula (KAHLE et al., 2009). O transporte de água pode ser acelerado por uma classe de canais de água especializados, as aquoporinas (KIMELBERG, 2005; LIANG et al., 2009).

Os processos de regulação do volume fisiológico, em conjunto, são denominados: Diminuição reguladora de volume (DRV) e Aumento regulador de volume (ARV), os quais podem ser efetuados dentro de poucos segundos ou minutos após exposição a meio anisotônico (Fig. 3B) (LANG et al., 1998; OKADA et al., 2001; STRANGE, 2004; KAHLE et al., 2009). O processo de DRV leva ao aumento da saída de Cl^- e K^+ e osmólitos orgânicos, enquanto que o processo de ARV leva ao aumento da entrada de Na^+ , pela indução do cotransporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, pela troca Na^+ / H^+ e ativação de canais catiônicos não seletivos (OKADA et al., 2001; HOFFMANN; LAMBERT; PEDERSEN, 2008).

O volume celular é normalmente regulado por meio de alterações na expressão e atividade de canais iônicos e transportadores – em nível de osmólitos inorgânico – e por mudanças no transporte de membrana e/ou no metabolismo celular – em nível de osmólitos orgânicos (KAHLE et al., 2009).

Os mecanismos de regulação de volume celular podem ser eliciados por pelo menos três tipos de sinais desencadeados pelo estresse osmótico: (1) alta concentração de macromoléculas, (2) força iônica e (3) mudanças químicas ou mecânicas na bicamada lipídica ou matriz extracelular e o citoesqueleto ao qual ela está acoplada (PEDERSEN; KAPUS; HOFFMANN, 2011).

Em condições patológicas, as células mostram uma regulação de volume enfraquecida e conseqüentemente exibem inchaço ou retração celular

persistentes, normalmente acoplados à morte celular necrótica ou apoptótica (OKADA et al., 2001).

2.4.1 Regulação do volume celular na retina de roedores

Atividade neuronal intensa está associada com o decréscimo na osmolaridade do fluido extracelular (DMITRIEV et al., 1999). A hiposmolaridade, por sua vez, pode causar um aumento dos níveis extracelulares de glutamato no tecido neural (HASKEW-LAYTON et al., 2008). Sugere-se que o meio hipo-osmótico induza a liberação de glutamato endógeno no tecido retiniano, o que pode levar ao inchaço de células bipolares (VOGLER et al., 2013). Na retina de ratos e camundongos, o glutamato liberado por células de Müller induz o inchaço do soma de células ganglionares independente de um estímulo hipo-osmótico (WURM et al. 2008; SLEZAK et al. 2012). Na retina de porquinho-da-índia, a aplicação de glutamato leva a um rápido inchaço de corpos celulares neuronais na CCG e na INL. Esse inchaço induzido por glutamato é causado por um influxo de íons através de receptores ionotrópicos, os quais estão associados com fluxo de água (UCKERMANN et al., 2004).

Em condições homeostáticas, as células de Müller conseguem regular seu volume celular ainda que a osmolaridade do meio seja reduzida (HIRRLINGER et al., 2008). Esta regulação, em animais saudáveis (e na ausência de bloqueadores de canais de K^+), é possivelmente mediada por um mecanismo endógeno de sinalização purinérgica, uma vez que, a deleção do receptor purinérgico P2Y1 e do receptor de adenosina A1 resulta em uma regulação de volume enfraquecida por células de Müller (WURM et al., 2010). Esta cascata purinérgica de inibição de inchaço, em condições hipo-osmóticas, pode ser engatilhada por glutamato após ativação de seus receptores metabotrópicos. (UCKERMANN et al., 2006; WURM et al., 2008). Tal fato sugere um papel dual para este neurotransmissor: enquanto glutamato induz o inchaço de neurônios, ele inibe o inchaço de células de Müller (WURM et al., 2011).

Porém, uma variedade de condições patofisiológicas pode modificar os mecanismos osmorregulatórios das células de Müller da retina. É bem estabelecido que o estímulo hipotônico induz o inchaço osmótico de células gliais de Müller em modelos de retinopatia diabética e isquêmica (PANNICKE et al., 2004, 2006). Em retinas pós-isquêmicas, a proteína Kir4.1 – o principal canal de K^+ das células gliais retinianas – é regulada negativamente. Por este motivo, as células não podem mais liberar íons K^+ rapidamente, em condições hipotônicas (o que iria dirigir o fluxo de água para fora da célula). A concentração de K^+ intracelular é então fixada em um nível constante, a relativa osmolaridade do citoplasma aumenta em comparação ao ambiente hipotônico, água entra na célula via aquoporinas, e conseqüentemente as células incham (PANNICKE et al., 2004). Condições de estresse oxidativo (na presença de H_2O_2 e SNAP), presença de mediadores inflamatórios (Ácido araquidônico e Prostaglandina E_2) e bloqueadores de canais de K^+ ($BaCl_2$) também induzem inchaço do soma de células de Müller em condições hipotônicas (PANNICKE et al., 2004, 2005, 2006; KRÜGEL et al., 2011)

Por outro lado, em condições nas quais as células de Müller perderam sua capacidade para a regulação de volume celular em meio hipo-osmótico, uma série de ligantes de receptores se mostraram efetivos para recompor esta habilidade de regulação de volume osmótico (WURM et al., 2011). Tal inibição de inchaço hipo-osmótico ocorre por um mecanismo de regulação de volume glutamatérgico-purinérgico mediado por receptor. Resumidamente, a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) pode estimular a liberação de ATP e adenosina. Então, a respectiva ativação autócrina dos receptores P2Y1 e A1 leva à abertura de canais de K^+ e Cl^- gliais, evitando o inchaço hipo-osmótico (UCKERMANN et al., 2006; WURM et al., 2008, 2010; KRÜGEL et al., 2010; BRÜCKNER et al., 2012). Sugere-se que a principal forma de remoção do fluido retiniano é o transporte simultâneo de K^+ e água por Kir4.1 e por meio do canal de água glial, aquoporina-4, respectivamente (KOFUJI et al., 2000; BRINGMANN et al., 2004).

Dentre os ligantes de receptores que se mostraram efetivos para inibir o inchaço osmótico retiniano, por meio da liberação de glutamato,

ATP e adenosina, destacam-se o peptídeo natriurético atrial, neuropeptídeo Y, esteroides sexuais e o fator de crescimento VEGF (KALISCH et al., 2006; WEUSTE et al., 2006; UCKERMANN et al., 2006; WURM et al., 2008; NEUMANN et al., 2010). A glicoproteína osteopontina (OPN) e o fator de sobrevivência eritropoietina (EPO) são aptos para inibir o inchaço do soma de células gliais em condições hipo-osmóticas, via liberação glial de VEGF, na retina de animais diabéticos e daqueles submetidos à isquemia transitória, respectivamente (KRÜGEL et al., 2010; WAHL et al., 2013).

Em meio hipertônico, as células de Müller exibem uma diminuição de seus somas, sugerindo que estas células são desprovidas de um mecanismo de regulação de volume endógeno em condições de hiperosmolaridade (PANNICKE et al., 2004; VOGLER et al., 2013). Já as células bipolares da retina são desprovidas de um mecanismo de regulação de volume endógeno em ambos os casos (hiper e hipo-osmolaridade). O soma destas células incha significativamente quando submetido a condições hipo-osmóticas ou ainda em meio iso-osmótico na presença de glutamato, como previamente mencionado. Além disso, quando submetidas a um meio hiperosmótico, seus somas diminuem de tamanho (VOGLER et al., 2013).

2.5 O PAPEL DOS FATORES NEUROTRÓFICOS NA RETINA

Fatores neurotróficos são importantes agentes para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e função de populações neuronais e outras células do sistema nervoso (WEN et al., 2012). Algumas classes de fatores de crescimento, atualmente com efeitos bem estabelecidos em neurônios e células gliais, foram antes pensadas agirem somente em células do sistema imune (SIEGEL et al., 2006). De fato, as citocinas são frequentemente referidas como fatores de crescimento, mas o reverso não é necessariamente o caso. Citocinas e fatores de crescimento são de alguma maneira similares em sua estrutura e mecanismo de ação. Ambos se ligam a receptores de superfície

específicos e podem ainda compartilhar os mesmos componentes de sinalização intracelular (FRIES, 2009). Nos últimos anos estes compostos foram categorizados em várias classes, famílias e superfamílias. O quadro 1 lista os principais fatores tróficos com reconhecida função no sistema nervoso.

Diversos fatores de crescimento exibindo efeito neuroprotetor na retina foram identificados. Observou-se que muitos deles se ligam a receptores com atividade cinase, principalmente a classe das tirosino-cinases (Fig. 4; CHAUM, 2003). Alguns fatores Neurotróficos são aptos para inibir a apoptose e promover a sobrevivência de neurônios retinianos e fotorreceptores (FAKTOROVICH et al., 1990; LAVAIL et al., 1992; DI POLO et al., 1998; FRASSON et al., 1999; CHONG et al., 1999; DELYFER et al., 2005; BRINGMANN et al., 2006; KOEBERLE; BÄHR, 2008). Pela liberação de fatores tróficos, as células de Müller podem regular a morte e sobrevivência destas células (KIRSCH et al., 1997; WAHLIN et al., 2001; BRINGMANN et al., 2006). A tabela 1 mostra as funções de diferentes fatores tróficos na retina de ratos.

A seguir serão descritas as principais características dos fatores tróficos e citocinas estudados no presente trabalho, bem como, alguns dos principais papéis por eles exercidos no tecido retiniano.

2.5.1 Fator de crescimento do nervo (NGF)

Por volta de 1952, Levi-Montalcini sugeriu que certos tumores liberavam fatores humorais, que ao atingirem os gânglios, promoviam um crescimento intenso de fibras. Para testar esta hipótese, neurônios ganglionares simpáticos e sensoriais de embriões de galinha foram cultivados em meio semi-sólido, envolvidos por fragmentos de sarcomas murinos. Em resposta, eles produziram um halo denso de fibras nervosas entre 12-24 horas (LEVI-MONTALCINI, 1982).

O fator humoral liberado pelos dois sarcomas de camundongos foi identificado pelo bioquímico Stanley Cohen. Por sua habilidade em induzir um crescimento maciço de neuritos, este fator foi batizado como “Fator de Promoção do Crescimento do Nervo”, nome posteriormente encurtado

Quadro 1. Fatores tróficos com reconhecidas atividades no sistema nervoso.

Neurotrofinas	Fator de crescimento do nervo (NGF) Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) Neurotrofina 3 (NT-3) Neurotrofina 4 (NT-4)
Neurocinas	Fator neurotrófico ciliar (CNTF) Fator inibidor de leucemia (LIF) Interleucina 6 (IL-6) Cardiotrofina 1
Fatores de crescimento de Fibroblasto	Fator 1 de crescimento de fibroblasto (ácido, aFGF ou FGF-1) Fator 2 de crescimento de fibroblasto (básico, bFGF ou FGF-2)
Superfamília do fator de crescimento transformante β	Família dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β) Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) Fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF) Neurturina
Superfamília do fator de crescimento epidérmico	Fator de crescimento epidérmico (EGF) Fator de crescimento transformante α (TGF- α) Neuregulinas
Grupo VEGF/PDGF	Família do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) Família do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Outros fatores	Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) Eritropoietina (EPO)

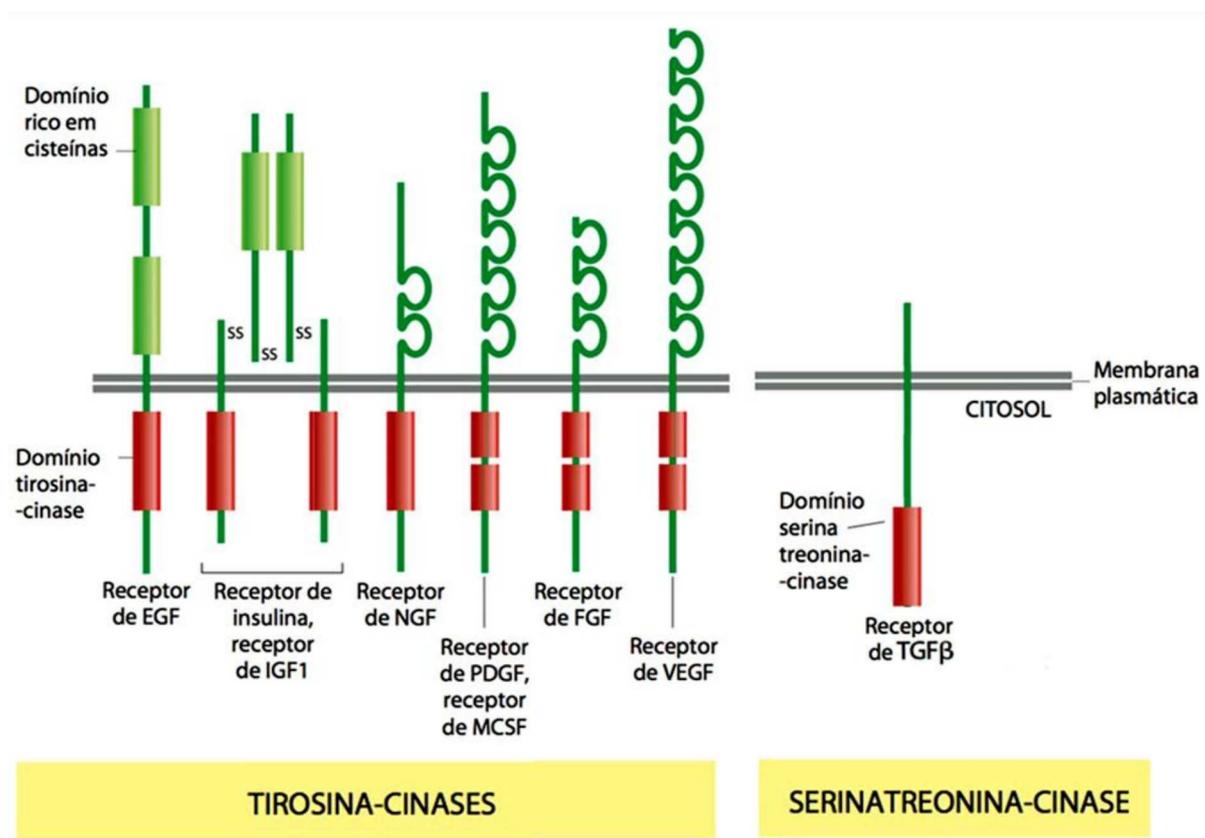


Figura 4. Receptores com atividade cinase. Representação esquemática dos receptores tirosina-cinases e receptor serinatreonina-cinase ativados por fatores de crescimento e citocinas com reconhecidas atividades neuroprotetoras na retina. São mostrados o tamanho e a localização de seus domínios catalíticos (em vermelho). Muitos destes receptores têm um domínio catalítico com 250 aminoácidos e sequência semelhante, sugerindo que tenham evoluído de uma cinase ancestral comum. A região N-terminal destes receptores está voltada para o lado extracelular da membrana, enquanto que a região C-terminal está localizada no lado citoplasmático da membrana plasmática. EGF, Fator de crescimento epidérmico; IGF-1, fator de crescimento 1 semelhante à insulina; NGF, fator de crescimento do nervo; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; MCSF, fator estimulador de colônia de macrófagos; FGF, Fator de crescimento de fibroblasto; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; TGF-β, Fator de crescimento transformante β. Fonte: Modificado de Alberts et al., 2010.

Tabela 1. Efeitos Protetores de vários fatores neurotróficos em diferentes tipos celulares da retina de rato, investigados na última década. CGR, células ganglionares da retina; CNTF, fator neurotrófico ciliar; NT-4, neurotrofina 4; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; TGF- β 1, fator de crescimento transformante β ; NGF, fator de crescimento do nervo; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; EPO, eritropoietina; GDNF, fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF-2, Fator 2 de crescimento de fibroblasto; IL-6, interleucina 6; GLAST, transportador de glutamato/aspartato.

Efeito	Tipo celular	Fator	Referência
Anti-apoptótico	Fotorreceptores	VEGF	Liljekvist-Soltic et al., 2008
	CGR	CNTF, NT-4, BDNF	Parrilla-Reverter et al., 2009
	CGR	TGF- β 1	Walshe et al., 2011
	CGR	NGF	Lambiase et al., 2009
	CGR	VEGF	Foxtan et al., 2013
	CGR	IGF-1	Yang et al., 2013
	CGR	EPO	Chang et al., 2013
	Não determinado	BDNF, NT-4	Oshitari et al., 2010, 2011
	Não determinado	GDNF	Wang et al., 2013
Regeneração	Fotorreceptores	CNTF	Li et al., 2010
	CGR	FGF-2	Sapieha et al., 2006
	CGR	IL-6	Leibinger et al., 2013
Diferenciação	CGR	TGF- β 1	Walshe et al., 2011
Proliferação	Células de Müller	PDGF	Moon et al., 2009
Regulação positiva de GLAST	Células de Müller	BDNF	Dai et al., 2012
	Células de Müller	GDNF	Wang et al., 2013
Regulação de	Células de Müller	VEGF	Wurm et al., 2008
Volume osmótico	Células de Müller	EPO	Krügel et al., 2010

para “Fator de Crescimento do Nervo” (COHEN; LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1954).

O NGF é uma proteína pertencente à família das neurotrofinas, responsável pelo crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de diferentes tipos celulares (LEVI-MONTALCINI et al., 1996).

Duas classes de receptores transmembrana completamente distintas podem mediar os efeitos do NGF: o receptor tirosina-cinase de alta afinidade, TrkA, e o receptor de baixa afinidade, p75^{NTR} (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008). Estes receptores podem funcionar independentemente e com frequência desencadeiam resultados opostos, onde TrkA quase sempre promove sobrevivência e diferenciação, e p75^{NTR} promove apoptose (ALI et al., 2008; COASSIN et al., 2008; LEBRUN-JULIEN et al., 2009; BAI et al., 2010). No entanto, quando estes receptores são co-expressos podem formar complexos, alterando a sinalização de ambas as partes (HUANG; REICHARDT, 2003). Ademais, observou-se que a ativação de p75^{NTR} pode ter efeitos de pró ou anti-sobrevivência na retina, dependendo do modelo experimental estudado (WEXLER et al., 1998; HARADA et al., 2000, 2002; ALLINGTON et al., 2001). Atualmente, sabe-se que a partir da ligação ao seu receptor TrkA, o NGF pode estimular múltiplas vias de sinalização. Ao contrário, o papel de p75^{NTR} é consideravelmente mais enigmático, em parte porque p75^{NTR} é desprovido de atividade cinase, não utilizando vias de sinalização convencionais, e pode também interagir com vários co-receptores (CUI, 2006). Outra diferença interessante entre TrkA e p75^{NTR} está no fato de que cada uma das pró-neurotrofinas e neurotrofinas maduras é capaz de ser ligar e ativar o receptor p75^{NTR}, enquanto que TrkA é específico para NGF (REICHARDT, 2006).

A ativação do receptor TrkA por NGF leva à dimerização do receptor e ativação de sua atividade cinase. Cada domínio cinase de ambos monômeros induz a fosforilação de resíduos de tirosina do domínio contralateral. Outras tirosinas expressas fora do domínio cinase levam à ativação de três principais vias de sinalização, a via cinase do fosfatidilinositol 3 (PI3K)/Akt, a via Ras/Map-cinase (Ras/ERK), e a via da fosfolipase C (PLC), que leva ao aumento dos níveis intracelulares de

Ca²⁺ e ativação de (1) proteína cinase dependente de Ca²⁺ e calmodulina (CaMK) e/ou (2) Proteína cinase C (PKC) (REICHARDT, 2006).

A ativação de p75^{NTR} por NGF desencadeia duas principais vias de sinalização, por meio da ativação de c-Jun N-terminal cinase (JNK) ou pela ativação do fator de transcrição NF-κB. A primeira envolve a fosforilação de proteínas apoptóticas, liberação de citocromo c e ativação de caspases (ROUX; BARKER, 2002). Já ativação de NF-κB resulta da indução de três principais vias: pelo recrutamento de TRAF6 (Fator 6 Associado ao Receptor TNF), com ativação da proteína cinase associada a IL-1 (IRAK), pelo recrutamento de RIP-2, e pela ativação de PI3K e Akt (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

O NGF e seus receptores estão localizados em numerosas áreas do sistema visual. No tecido retiniano, é produzido por algumas células neuronais e glia de Müller, bem como pelo epitélio pigmentar (RUIZ-EDERRA et al., 2003; MICERA et al., 2004; AGARWAL et al., 2007; LEBRUN-JULIEN et al., 2009; MORILLO et al., 2010).

Em modelos de diabetes experimental e humano, o estresse oxidativo engatilhado por peroxinitrito leva à neurodegeneração retiniana, pela diminuição da fosforilação de TrkA, devido a nitração de tirosinas e consequente inibição da sinalização de sobrevivência do NGF (ALI et al., 2008). Além disso, o tratamento de ratos diabéticos com NGF previne a apoptose em células de Müller e ganglionares, e também a perda de pericitos (HAMMES et al., 1995). O NGF retarda a degeneração de células retinianas em ratos com retinose pigmentada (LENZI et al., 2005) e protege as células ganglionares da retina da morte celular em glaucoma experimental e isquemia retiniana, bem como, após descolamento da retina e transecção do nervo óptico (SILIPRANDI et al., 1993; CARMIGNOTO et al., 1989; SUN et al., 2007; SIVILIA et al., 2009; COLAFRANCESCO et al., 2011a,b). Igualmente, o NGF, via ativação de TrkA, protege os neurônios retinianos da excitotoxicidade (KOKONA et al., 2012), e age também como antioxidante, protegendo neurônios e células do EPR contra o estresse oxidativo. Ademais, impede a apoptose de células de Müller induzida por oxidantes (PAN; PEREZ-POLO, 1993; SAMPATH et al., 1994; MATTSON et al., 1995; GIARDINO et al., 1998;

CAO et al., 2011). A tabela 2 exibe alguns trabalhos que mostram o efeito protetor do NGF sobre a redução do número de células nas diferentes camadas da retina em vários modelos de degeneração retiniana.

2.5.2 Fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF-2, bFGF)

O fator de crescimento do fibroblasto 2 (FGF-2), também conhecido como FGF básico (bFGF) é um fator de crescimento multifuncional o qual pertence à família FGF1-2 da superfamília dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) (WOODBURY; IKEZU, 2014). Em humanos, FGFs são codificados por 22 genes, FGF-1-14 e FGF16-23, e são subdivididos em sete subfamílias (RAJU et al., 2014).

bFGF possui efeitos pleiotrópicos em diferentes tecidos e órgãos, incluindo efeitos angiogênicos e um importante papel na diferenciação e funcionalidade do SNC (WOODBURY; IKEZU, 2014). Este fator exerce seus efeitos por meio da ativação de receptores tirosina-cinases de FGF (FGFR1-4) em cooperação com heparina ou proteoglicano de heparam sulfato (RAJU et al., 2014). Na retina, bFGF foi encontrado em astrócitos, células de Müller, células ganglionares e células do epitélio pigmentar (WALSH; VALTER; STONE, 2001). A expressão de bFGF é aumentada e este fator é rapidamente liberado no tecido retiniano em condições hipóxico-isquêmicas e injúria retiniana (GELLER; LEWIS; FISHER, 2001; WALSH; VALTER; STONE, 2001; YAFAI et al., 2013).

bFGF promove a sobrevivência de fotorreceptores em ratos distróficos (FAKTOROVICH et al., 1990; SAKAI et al., 2007), bem como, protege fotorreceptores de ratos e camundongos contra danos induzidos por exposição à luz (LIU et al., 1998; O'DRISCOLL et al., 2008) e também de camundongos expostos à hiperóxia (YAMADA et al., 2001).

A princípio, bFGF é considerado neuroprotetor na retina e a sua liberação em condições de injúria ou doença poder representar uma tentativa de regeneração celular, entretanto, bFGF pode também causar danos secundários ao tecido. Este fator pode induzir o crescimento de vasos aberrantes durante a neovascularização, a proliferação e

Tabela 2 – Efeito protetor do NGF sobre a redução de diferentes tipos celulares na retina em vários modelos de injúria retiniana em ratos. O número de células na retina foi contado após o tratamento com NGF. Todos os trabalhos mostraram um número maior de células retinianas após a administração de NGF quando comparados a retinas não-tratadas. *A sobrevivência de fotorreceptores foi estimada pela espessura da CNE. FR, fotorreceptores; CNE, camada nuclear externa; CH, células horizontais; CGR, células, ganglionares da retina; CNI, camada nuclear interna, CCG, camada de células ganglionares.

Modelo	Célula/ Camada	Administração de NGF		Referência
		Aplicação	Tempo de tratamento	
Retinose Pigmentada	FR (CNE)*	Injeção retrobulbar	Dias alternados (8 dias)	Lenzi et al., 2005
Excitotoxicidade	CH	Injeção intravítrea	24 h	Kokona et al., 2012
Glaucoma	CGR	Tópica (colírio)	2 vezes ao dia (3 semanas)	Colafrancesco et al., 2011a
	CGR	Tópica (colírio)	2 vezes ao dia (7 dias)	Colafrancesco et al., 2011b
	CGR	Tópica (colírio)	4 vezes ao dia (7 semanas)	Lambiase et al., 2009
Isquemia retiniana	CGR	Injeção intravítrea	Injeção única 24h pós-isquemia	Sivilia et al., 2009
Axotomia	CGR	Injeção intraocular	A cada 2.3 dias (5-7 semanas)	Carmignoto et al., 1989
Retinopatia Diabética	CGR	Tópica (colírio)	2 vezes ao dia (3 semanas)	Colafrancesco et al., 2011a
Descolamento Retiniano	CNE/ CNI/ CCG	Injeção intravítrea	A cada 4 dias	Sun et al., 2007

desdiferenciação de células de Müller, e possivelmente o aumento dos níveis de glutamato devido à regulação negativa de glutamina sintetase (BRINGMANN et al., 2009b).

2.5.3 Fator de crescimento epidérmico (EGF)

O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi descoberto em 1962 por Stanley Cohen, isolado e identificado como uma pequena proteína secretada, rica em pontes dissulfeto, capaz de aumentar o crescimento epidérmico e a queratinização (RONGO, 2011).

O EGF se liga ao receptor de EGF (EGFR), pertencente à família do receptor tirosina-cinase ERBB (homólogo do oncogene viral da leucemia eritroblástica), uma família composta por quatro membros: EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 e ErbB4. Outros ligantes para estes receptores incluem o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), a anfiregulina, betacelulina, epiregulina e as neuregulinas 1 a 4 (NRGs) (LU; KANG, 2010).

As pesquisas sobre o papel exercido pelo EGF na retina estiveram principalmente direcionadas para o efeito proliferativo deste fator em células do epitélio pigmentar (LIANG et al., 2010) e células gliais de Müller (KARL et al., 2008). Muitos destes estudos buscaram investigar os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de doenças oculares proliferativas e neurogênese.

Em experimentos *in vitro* observou-se que a sinalização engatilhada por EGF-EGFR está envolvida no crescimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células do RPE (LESCHEY et al., 1990; DEFOE; GRINDSTAFF, 2004; SPRAUL et al., 2004; LIANG et al., 2010).

Ambos EGF e o receptor tirosina-cinase de EGF são expressos na retina em desenvolvimento (ANCHAN et al., 1991; LILLIEN 1995) e estão envolvidos na neurogênese retiniana promovendo a proliferação de progenitores retinianos (ANCHAN et al., 1991), tanto quanto, retardando a diferenciação destes progenitores em bastonetes (AHMAD; DOOLEY; AFIAT, 1998). O efeito mitogênico do EGF em células de Müller foi

observado em diferentes espécies de mamíferos (UEKI; REH, 2013; CLOSE et al. 2005; SCHERER; SCHNITZER 1994; MILENKOVIC et al. 2003; HOLLBORN et al. 2005). Após dano retiniano induzido por NMDA, *in vivo*, EGF aumenta a proliferação de células de Müller as quais se diferenciam em células amácrinas (KARL et al., 2008).

2.5.4 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foi identificado em 1974 como um fator de crescimento sérico para fibroblastos, células musculares lisas e células gliais. Os membros da família PDGF incluem os homodímeros PDGF-AA, -BB, -CC, -DD, e o heterodímero PDGF-AB (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008; FUNA; SASAHARA, 2014).

As isoformas de PDGF exercem seus efeitos por meio da ligação a dois tipos de receptores tirosina-cinase: o receptor PDGFR- α , o qual liga as cadeias A-, B- e -C, e o receptor PDGFR- β , o qual liga as cadeias B- e D- (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). A ligação de PDGF a estes receptores leva à dimerização dos mesmos, sendo que PDGF-AA, -AB, -BB e -CC induzem a formação de homodímeros de receptores- α , enquanto que PDGF-BB e PDGF-DD levam à dimerização de receptores- β , e por fim, PDGF-AB, -BB, -CC e -DD promovem a formação de heterodímeros de receptores- $\alpha\beta$ (HELDIN, 2013).

Durante o desenvolvimento da retina, a inibição da sinalização de PDGF reduz a proliferação e migração de astrócitos, sugerindo que este fator é importante para a formação de uma rede de interação entre astrócitos e RGC (FRUTTIGER et al., 1996). Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que a aumentada proliferação de astrócitos (YAMADA et al., 2000) e células de Müller (MOON et al., 2009) estimulada por PDGF pode contribuir para a indução de gliose reativa com efeitos protetores, mas também prejudiciais (BRINGMANN et al., 2009b).

Na retina adulta, a isoforma PDGF-C exibe efeitos protetores em CGR e neurônios localizados na CNI e CNE, reduzindo a morte neuronal induzida por axotomia e excitotoxicidade (TANG et al., 2010). Em modelo

de degeneração retiniana focal e progressiva, que simula certas características da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), a isoforma PDGF-C igualmente inibe a degeneração de fotorreceptores pela supressão de vias apoptóticas (WANG et al., 2014). Injeções intravítreas das isoformas PDGF-AA e -AB também exibiram efeitos neuroprotetores na retina, aumentando a sobrevivência de CGR em modelo de glaucoma (JOHNSON et al., 2014).

2.5.5 Fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF)

O GDNF foi purificado em 1993 a partir de linhagem celular de glioma de rato e caracterizado como um fator capaz de promover a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos embrionários (LIN et al., 1993).

O GDNF e outros ligantes da família GDNF (artemina, neurturina e persefina) pertencem à superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (ALLEN et al., 2013). Estes quatro ligantes agem por meio do acoplamento ao receptor RET (Receptor Tirosina-cinase), que para ser ativado requer a associação com um dos quatro subtipos de uma classe de co-receptores conhecidos como receptores- α da família GDNF (GFR α 1-4). Assim, o GDNF exerce seus efeitos por meio da ligação à GFR α 1 e formação de um complexo com RET (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002).

Na retina, GDNF foi localizado em CGR, nos segmentos externos de fotorreceptores, em células do EPR, bem como, em células de Müller e astrócitos (KOEBERLE; BALL, 2002; BRINGMANN et al., 2009b). Este fator reduz a apoptose e aumenta a sobrevivência de CGR após axotomia (KOEBERLE; BALL, 2002), e igualmente diminui a degeneração de fotorreceptores em modelo murino de retinose pigmentada (FRASSON et al., 1999) e descolamento retiniano (WU et al., 2002). GDNF também se mostrou protetor em modelo de retinopatia diabética, diminuindo o número de células apoptóticas (WANG et al., 2013).

O papel neuroprotetor do GDNF na retina foi sugerido acontecer por efeitos diretos e indiretos. Seus efeitos indiretos poderiam ocorrer por meio da ativação de células de Müller (HAUCK et al., 2006). Isto porque, o GDNF modula a liberação de fatores tróficos por células de Müller (HARADA et al., 2003) e aumenta os níveis proteicos (KOEBERLE; BÄHR, 2008) e RNAm (DELYFER et al., 2005) dos transportadores de glutamato em cultura de células de Müller. Ademais, GFR α -1 é predominantemente expresso por células de Müller, sugerindo que estas células são o principal alvo para o fator (KOEBERLE; BALL, 2002). Não obstante, efeitos diretos do GDNF sobre a sobrevivência de fotorreceptores também foram reportados (POLITI; ROTSTEIN; CARRI, 2001).

2.5.6 Fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1)

Originalmente chamado fator de crescimento de sarcoma, TGF- β foi descoberto em 1983 em células neoplásicas. Posteriormente observou-se que este fator era capaz de induzir o crescimento de fibroblastos e a produção de colágeno (KUBICZKOVA et al., 2012).

TGF- β é um participante-chave nas cascatas de sinalização que precedem eventos apoptóticos e aqueles de proliferação e diferenciação celular, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto na homeostase do tecido adulto (KUBICZKOVA et al., 2012; ZHAO; CHEN, 2014). Este fator pertence a uma superfamília de citocinas composta por mais de 30 membros estruturalmente relacionados, incluindo o TGF- β , as ativinas, a proteína nodal, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), a família GDNF, entre outros (BOECK; DIJKE, 2012; ZHAO; CHEN, 2014).

Três isoformas deste fator foram identificadas em mamíferos (TGF- β 1-3) e dentre elas TGF- β 1 destaca-se como uma citocina pleiotrópica com importantes propriedades imunoreguladoras. Todas três isoformas do TGF- β funcionam por meio das mesmas vias de sinalização ativadas por receptor (YOSHIMURA; WAKABAYASHI; MORI, 2010; KUBICZKOVA et al., 2012). A transdução dos sinais eliciados por TGF- β ocorre por meio

de receptores serina-treonina-cinases pertencentes à família dos receptores TGF- β (TGF- β R), dividida em três subfamílias: tipo I (T β RI), II (T β RII) e III (T β RIII) (ZHAO; CHEN, 2014; KUBICZKOVA et al., 2012).

Sabe-se que as células de Müller liberam TGF- β 1 *in vitro* (ABUKAWA et al., 2009) e que as CGR de rato e camundongo expressam TGF- β 1 durante o desenvolvimento pós-natal (GORDON-THOMSON et al., 1998; GUÉRIN et al., 2001; CLOSE et al., 2005). Contudo, a participação da sinalização de TGF- β na sobrevivência e diferenciação de CGR em cultura é conflitante, uma vez que, TGF- β 1 (WALSHE; LEACH; D'AMORE, 2011) e TGF- β 2 (BRAUNGER et al., 2013) foram mostrados diminuir a morte celular programa de CGR quando administrados em baixa concentração (até 10 ng/ml), mas quando ambas as isoformas foram administradas em uma concentração cinco vezes maior, nenhum efeito protetor em CRG foi observado (KERRISON et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do NGF sobre a regulação do volume celular glial e neuronal em condições hipotônicas em retinas isquêmicas ou perfundidas com cloreto de bário, bem como, identificar a via de sinalização envolvida neste fenômeno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a distribuição da proteína NGF e a localização de seus receptores TrkA e p75^{NTR} no tecido retiniano e células isoladas da retina de rato, observando-se a sobreposição com anticorpos direcionados contra proteína fibrilar glial ácida (GFAP), glutamina sintetase (células gliais) e PKC- α (células bipolares);
- Analisar o perfil temporal de liberação de adenosina em retinas controles e retinas pré-tratadas com BaCl₂, submetidas à perfusão em solução hipo-osmolar.
- Investigar as mudanças de volume celular do soma das células de Müller e células bipolares da retina, em resposta à perfusão com solução hipotônica contendo BaCl₂, na presença de NGF, utilizando-se fatias de retina, bem como, células isoladas;
- Examinar a dependência de concentração do efeito do NGF sobre as mudanças de volume celular osmótico em células de Müller e células bipolares da retina;
- Verificar as mudanças de volume celular do soma das células de Müller e células bipolares, em resposta à perfusão com solução hipotônica, na presença de NGF, utilizando-se fatias de retinas pós- isquêmicas;

- Avaliar se o efeito do NGF sobre o volume celular glial é mediado pelos receptores TrkA ou p75^{NTR}, utilizando-se o inibidor de TrkA ou TAT-Pep5, (antagonista de p75^{NTR});
- Determinar se o efeito do NGF é mediado pela transativação de receptores de glutamato usando-se o bloqueador de mGluRs (LY341495);
- Confirmar se o efeito do NGF é dependente da sinalização de receptores purinérgicos, pela perfusão com o antagonista seletivo de P2Y1 (MRS2179) e com o antagonista do receptor de adenosina A1 (DPCPX);
- Examinar se o efeito do NGF é mediado por transativação do receptor de bFGF empregando o bloqueador seletivo, PD173074;
- Determinar se o próprio bFGF pode regular o edema citotóxico em células de Müller e células bipolares isoladas da retina;
- Investigar se o possível efeito inibitório do bFGF sobre o edema citotóxico de células de Müller isoladas ocorre anterior ou posteriormente à ativação de receptores A1 de adenosina;
- Investigar se outros fatores solúveis (EGF, PDGF, GDNF e TGF-β1) são aptos para regular o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retina e células isoladas;
- Averiguar se NGF e bFGF são aptos para regular o volume celular na retina por meio da abertura de canais iônicos, utilizando-se um bloqueador de canal de Cl⁻ (NPPB) e um bloqueador de canal de K⁺ (Clofílio) em células isoladas;
- Aferir se bFGF é apto para regular o volume celular glial por meio da ativação de PKA, utilizando-se o bloqueador H-89;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Ratos Long-Evans (250-350 g, machos e fêmeas) foram mantidos com livre acesso à água e alimentos, em temperatura controlada, ciclo claro-escuro de 12 horas e mortos em câmara de dióxido de carbono. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas alemãs apropriadas para o uso ético e cuidado com animais de laboratório (Conselho Diretivo de Comunidades Européias 86/609/EEC). Os experimentos foram submetidos à aprovação das autoridades locais (*Landesdirektion*) e Faculdade de Medicina da Universidade de Leipzig. Todos os esforços foram feitos para diminuir o número de animais utilizados e minimizar seu sofrimento.

Para a quantificação dos níveis de adenosina, foram utilizados ratos Wistar adultos (240-280g), e os experimentos submetidos ao Comitê de ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE–UFPA).

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

Todos os procedimentos adotados durante as imunomarcações foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Wahl et al. (2013).

Após dissecação, retinas controle foram fixadas em paraformaldeído 4% por 1 h. Depois de várias lavagens em tampão fosfato salino (PBS), os tecidos foram embebidos em agarose 3% e os cortes (70 µm) feitos em um vibrátomo. Estes cortes foram incubados em PBS contendo Triton X-100 0,3 % e DMSO 1%, acrescido de soro de cabra normal 5% por 1h, em temperatura ambiente. Subsequentemente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, *overnight* a 4 °C, e após várias lavagens com BSA 1%, os anticorpos secundários foram aplicados *overnight* a 4 °C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, montados em lâminas de microscopia e visualizados em microscópio confocal de varredura a laser (*Laser Scanning Microscope*, LSM

510 META; Zeiss, Oberkochen, Germany). O controle de marcações inespecíficas foi feito após incubação apenas com o anticorpo secundário. A tabela 3 mostra todos os anticorpos utilizados neste trabalho e suas respectivas concentrações de uso.

4.3 IMUNOCITOQUÍMICA

Para obtenção de células isoladas, os tecidos retinianos foram incubados por 30 min em PBS livre de cálcio e magnésio, contendo papaína 0,4 mg/ml a 37 °C. Após curta incubação em salina suplementada com DNase I (200 U/ml), os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% por 10 min. Após várias lavagens com PBS, o tecido foi então dissociado mecanicamente. A suspensão de células foi aplicada em lâminas de microscopia demarcadas com caneta de tinta impermeável, e usadas após secagem ao ar livre.

As células foram bloqueadas e permeabilizadas por 1 h com soro de cabra normal 5%, Triton X-100 0.03%, e DMSO 1%, em temperatura ambiente. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários *overnight* a 4 °C, e após lavagem em BSA 1%, os anticorpos secundários foram aplicados *overnight* a 4 °C (Tabela 3). Os cortes foram recobertos com lamínulas e fotografados por LSM.

4.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE ADENOSINA

4.4.1 Perfusão dos tecidos retinianos

Utilizou-se um sistema de perfusão de 4 canais contendo câmaras de acrílico com fundo revestido por membrana semipermeável, bomba peristáltica, a qual permite a perfusão do tecido em uma taxa de fluxo constante, e banho-maria para o controle da temperatura (Figura 5). O sistema de perfusão possibilita a rápida troca de meio, permitindo que um mesmo tecido seja banhado em diferentes tipos de solução.

Tabela 3. Lista de anticorpos primários e secundários utilizados nas imunomarcações e suas respectivas concentrações de uso. Ac 1º, anticorpo primário; GS, Glutamina Sintetase; PKC α , Proteína Cinase C- α ; GFAP, proteína fibrilar glial ácida; NGF, fator de crescimento do nervo.

Alvo	Anticorpo Primário	Uso	Fabricante
Células de Müller	mouse-anti-GS	1:200	Merck Milipore
Células bipolares	mouse-anti-PKC α	1:200	Santa Cruz Biotech
Astrócitos	mouse-anti-GFAP	1:200	Sigma-Aldrich
NGF	rabbit-anti-NGF	1:100	Santa Cruz Biotech
Receptor TrkA	rabbit-anti-TrkA	1:100	Santa Cruz Biotech
Receptor P75 ^{NTR}	rabbit-anti-p75 ^{NTR}	1:100	Promega
Alvo	Anticorpo secundário	Uso	Fabricante
Ac 1º Mouse	Goat-anti-mouse-Cy ²	1:100	Jackson Immuno Res
AC 1º Rabbit	Goat-anti-rabbit-Cy ³	1:200	Jackson Immuno Res

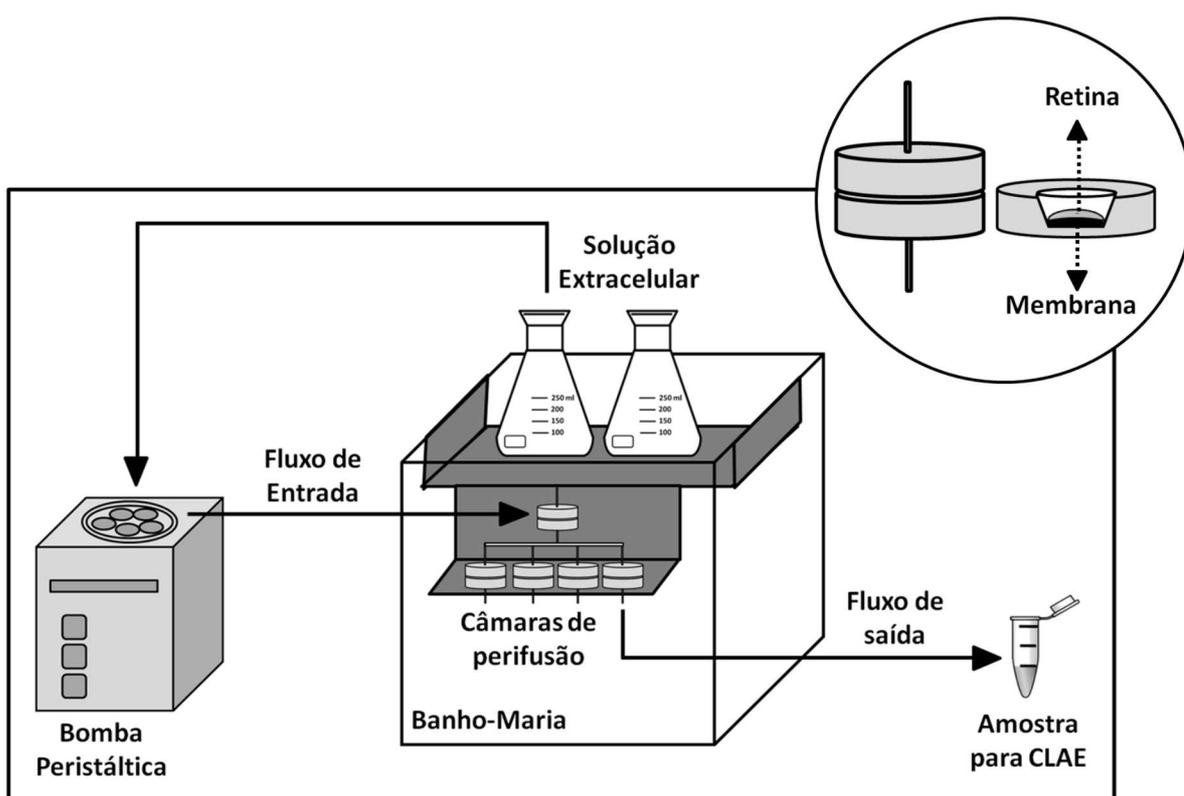


Figura 5. Representação esquemática do sistema de perfusão. A solução extracelular pode ser continuamente bombeada em um fluxo constante, passando através do tecido retiniano aderido ao fundo da câmara de perfusão. Estas câmaras estão inseridas em um banho-maria permitindo assim o controle da temperatura. A solução extracelular que banha o tecido pode então ser colhida no fluxo de saída e utilizada para ensaios de cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE). Inserção: Ampliação da câmara de perfusão com fundo revestido por membrana semipermeável.

Quatro diferentes meios foram utilizados para a perfusão dos tecidos: Solução extracelular iso-osmolar com ou sem cloreto de bário (1 mM) e solução hipo-osmolar com ou sem cloreto de bário.

Após dissecação, cada retina íntegra foi colocada em uma câmara de perfusão individual e condicionada em solução extracelular iso-osmolar (com ou sem bário) por 10 minutos. Em seguida, os tecidos foram perfundidos a 1 ml/min em um total de 330 segundos. Após 60 segundos de perfusão, a solução iso-osmolar com ou sem bário foi substituída pela solução hipo-osmolar com ou sem bário, respectivamente.

As perfusões foram realizadas em temperatura ambiente e as frações obtidas a cada 30 segundos, sendo estocadas a – 20 °C até o momento dos ensaios cromatográficos para detecção de adenosina.

4.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE)

A liberação de adenosina pelos tecidos retinianos foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). A detecção de adenosina foi baseada no protocolo de Xue et al. (2009), com algumas modificações. Os parâmetros utilizados para validar a quantificação de adenosina por CLAE – tempo de retenção, linearidade da curva de calibração, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, especificidade, ensaio de recuperação e estabilidade – foram previamente estabelecidos em nosso laboratório.

Utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba (LC20-AT), detector de ultravioleta (UV), degaseificador (DGU-20A5), módulo comunicador (CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne, com alça de injeção de 20 µL, coluna analítica C18 (Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm), um sistema de aquisição de dados *LC-Solution* e uma microsseringa de 50 µl (Hamilton). Foram adotadas corridas isocráticas com tempo total de 10 min, fase móvel composta por 70% de metanol, fluxo de corrida a 0,8 ml/min e detecção a 257 nm. As amostras contendo ácido tricloroacético 1% foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min e os sobrenadantes retirados e

estocados a - 20 °C para dosagens posteriores. Os níveis de adenosina das amostras foram calculados com base nos valores de altura do pico, por meio da equação da reta obtida pela curva de calibração de adenosina (0,5; 1; 5; 10; 50 e 100 µM).

4.5 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO RETINIANA

A indução de isquemia retiniana transitória foi realizada como descrito por Pannicke et al. (2004), adotando-se um modelo de elevação da pressão intraocular acima da pressão arterial sistêmica, capaz de bloquear a circulação sanguínea retiniana (FLOWER; PATZ, 1971).

O processo isquêmico ocorreu no olho direito de ratos adultos enquanto o esquerdo permaneceu não-tratado, servindo como controle. Os animais foram anestesiados com quetamina intramuscular (50 mg/Kg de peso corporal) e xilazina (3 mg/Kg). A câmara anterior do olho tratado foi canulizada a partir da pars plana com uma agulha de infusão (30 gauge), conectada a uma bolsa contendo salina normal. A pressão intraocular foi aumentada para 160 mmHg por 60 min, pela elevação da bolsa de salina. Três dias após reperfusão os animais foram mortos, seus olhos removidos, e os tecidos retinianos foram dissecados e utilizados para o preparo de fatias de retina.

4.6 PREPARO DAS FATIAS DE RETINA

As fatias de retina foram preparadas a partir do tecido retiniano proveniente tanto de animais isquêmicos como de animais controle.

Logo após a dissecação da retina, pedaços do tecido (5 x 5 mm) foram colocados com o lado dos fotorreceptores voltado para filtros de membrana (ésteres de celulose mistos, tamanho do poro 0.45 µm, 50 mm de diâmetro; Schleicher & Schuell MicroScience, Dassel, Germany). As fatias de retina (espessura 1 mm) foram feitas a partir dos tecidos aderidos à membrana por meio de uma guilhotina, equipada com lâmina de aço (Fig. 6a).

Para os registros das alterações de volume celular, cada fatia de

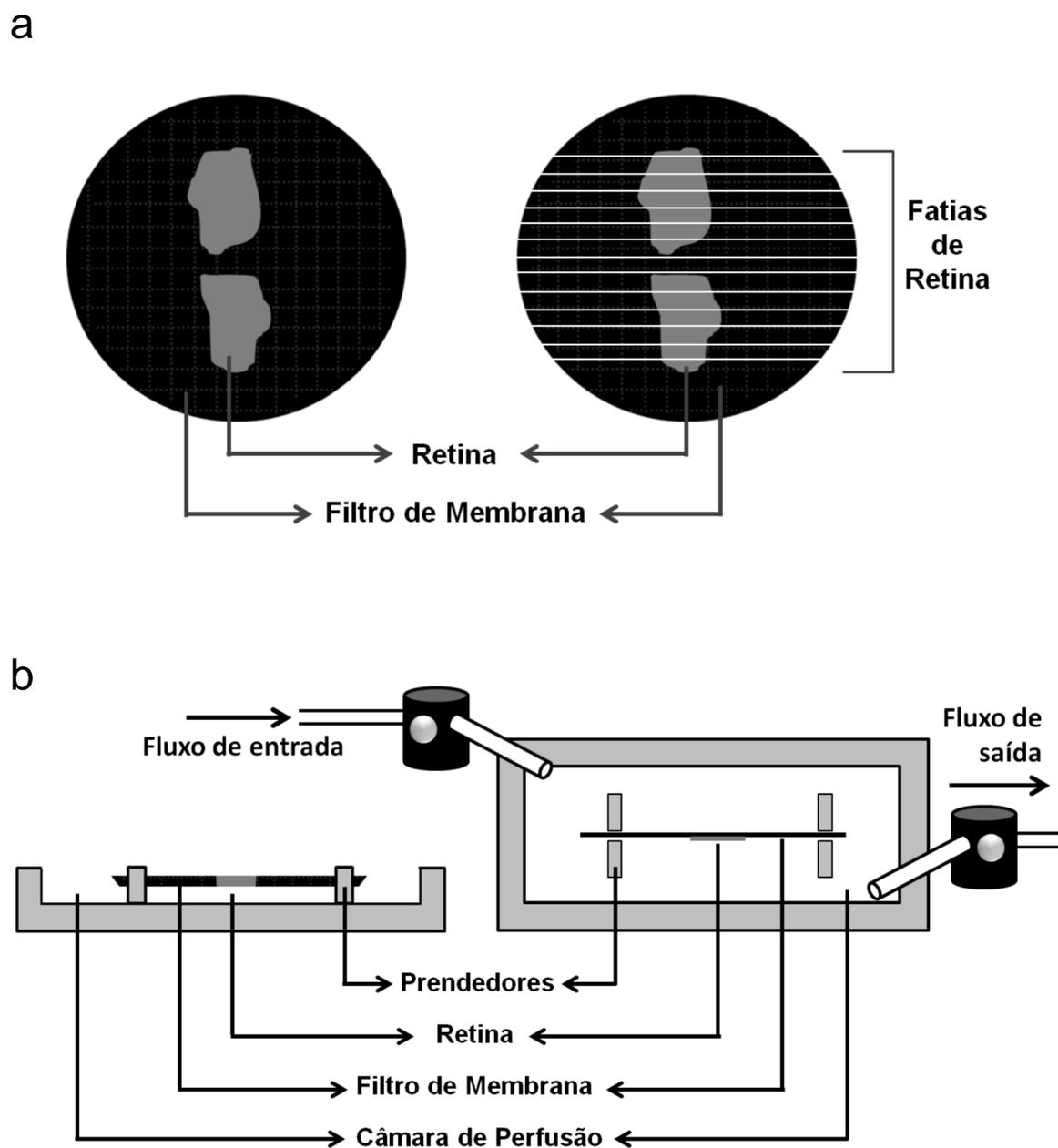


Figura 6. Aparatos utilizados para análise da mudança de volume celular em fatias de retina. (a) Representação esquemática do tecido retiniano aderido a filtros de membrana. À direita, exemplo de fatias de retina (1 mm). (b) Representação esquemática do sistema de superfusão e câmaras utilizados para os experimentos de mensuração do tamanho dos somas de células de Müller e células bipolares da retina de rato. Esquerda, visão lateral. Direita, visão superior da câmara de registro.

membrana foi colocada individualmente em uma câmara de superfusão e mantida submersa em solução extracelular, presa por prendedores de plástico (Fig. 6b).

4.7 PREPARO DE CÉLULAS RETINIANAS ISOLADAS

Imediatamente após a dissecação, as retinas foram incubadas em PBS livre de cálcio e magnésio (pH 7,4), contendo papaína (0,2 mg/ml) por 30 min a 37 °C. Após este período de incubação, o tecido foi lavado várias vezes com PBS e incubado por 2 min em salina suplementada com DNase I (200 U/ml). Em seguida, os tecidos foram dissociados mecanicamente em solução extracelular, utilizando-se ponteira de poro largo, obtendo-se então uma suspensão de células isoladas.

Lâminas de microscopia adaptadas para perfusão foram recobertas com lamínulas e preenchidas com as células dissociadas. Após o intervalo de 10-15 min para aderência das células às lâminas, os procedimentos de análise das alterações de volume celular foram iniciados. Estas suspensões celulares podem ser estocadas a 4 °C em meio mínimo essencial sem soro (Sigma) para o uso em até 2 h.

Para uma suspensão contendo predominantemente células gliais, a dissociação mecânica pode ser feita com uma intensidade maior, o que leva à destruição por trituração da maioria das células neuronais. As células gliais de Müller e células bipolares foram identificadas na suspensão retiniana de acordo com suas características morfológicas. As células de Müller, por exemplo, consistem de dois processos que se ramificam em direções opostas, com origem a partir do soma celular, com um pé-terminal no fim de um dos processos (NEWMAN; REICHENBACH, 1996).

4.8 SOLUÇÕES

Um sistema de perfusão mantido por gravidade com múltiplos reservatórios foi usado para perfundir continuamente a câmara de registro com

solução extracelular. Substâncias testes foram aplicadas pela mudança rápida de meio de perfusão (Tabela 4). A solução de incubação dentro da câmara de registro foi totalmente trocada dentro de 2 min. A solução extracelular consistiu de NaCl 136, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10 e glicose 11 (mM), ajustada com Tris, pH 7,4. A solução hipo-osmolar (60% da osmolaridade do controle) foi feita pela adição de água destilada. BaCl₂ (1 mM) foi adicionado às soluções iso e hipo-osmolar e as fatias de retina foram pré-incubadas em solução iso-osmótica, contendo BaCl₂ por 10 min, antes do início dos registros. Os antagonistas foram pré-incubados por 15-45 min, já os agonistas foram aplicados simultaneamente com a solução hipo-osmótica.

4.9 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE VOLUME CELULAR

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20-23 °C), seguindo o protocolo descrito por Vogler et al. (2013). O tamanho do soma das células de Müller e do soma das células bipolares foi registrado para se determinar as mudanças de volume induzidas por meio hipo-osmótico.

O soma das células de Müller foi localizado na parte central da CNI, enquanto que o soma de células bipolares foi localizado na parte mais externa desta camada. Os processos externos de ambos os tipos celulares exibem diferente morfologia – células bipolares possuem estrutura dendrítica, enquanto que células de Müller possuem processos citoplasmáticos bem finos (WAHL et al., 2013; CUENCA et al., 2014).

Para visualização das células, as fatias de retina e as suspensões celulares foram incubadas por 3 min com o corante vital clorometil-tetrametilrosamina (MitoTracker[®] Orange – MTO, Molecular Probes) a 1 µM, dissolvido em 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e PBS. Em seguida, as fatias ou células isoladas foram continuamente superfundidas com solução extracelular em uma taxa de fluxo de 2 ml/min.

Os cortes foram examinados por LSM, utilizando-se objetiva de imersão em água (Achro-plan 63x/0.9, Zeiss). O diafragma foi ajustado para 151 µm e a espessura da secção ótica para 1 µm. O MTO foi excitado a 543 nm com um laser HeNe, a emissão registrada com um filtro LP (*long-pass*) de 585 nm e as

Tabela 4. Substâncias-Teste aplicadas por um sistema de superfusão mantido por gravidade. mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; P2Y₁R, Receptor metabotrópico de ATP; FGFR, receptor do fator de crescimento de fibroblasto; A1R, receptores de adenosina; PKA, proteína cinase A.

Substância	Descrição	Concentração	Aplicação
NGF	Fator de Crescimento do Nervo	0.1; 0.5 e 1 ng/ml	Simultânea
Tat-pep5	Inibidor de p75 ^{NTR} R	1 µM	Pré
TrkA inibitor	Inibidor de TrkAR	500 nM	Pré
LY341495	Antagonista de mGluR do grupo II	100 µM	Pré
MRS2179	Bloqueador seletivo de P2Y ₁ R	30 µM	Pré
DPCPX	Antagonista de A1R	100 nM	Pré
PD173074	Inibidor de FGFR	500 nM	Pré
bFGF	Fator de crescimento de Fibroblasto Básico	10 ng/ml	Simultânea
Adenosina	Ligante de RP1	10 µM	Simultânea
EGF	Fator de crescimento epidérmico	10 ng/ml	Simultânea
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas	10 ng/ml	Simultânea
GDNF	Fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial	10 ng/ml	Simultânea
TGF-β1	Fator de crescimento transformante - β1	10 ng/ml	Simultânea
NPPB	Bloqueador de canal de Cl ⁻	100 µM	Pré
Clofílio	Bloqueador de canal de K ⁺	10 µM	Pré
H-89	Inibidor de PKA	1 µM	Pré

imagens foram obtidas no eixo X-Y de tamanho 256 x 256 pixels (73.1 x 73.1 μm). Os somas celulares foram registrados em 15-45 μm de profundidade a partir da superfície dos cortes. Para assegurar que a área máxima do soma fosse precisamente registrada, o plano focal foi continuamente ajustado no decurso dos experimentos.

A qualidade das fatias foi verificada pela aparente ausência de alterações na estrutura histológica da retina. Após a escolha do campo de registro dentro da CNI (contendo células de Müller e células bipolares), as células foram superfundidas com solução extracelular iso-osmótica por 1 min, seguido por 4 min de superfusão em meio hipo-osmótico.

A extensão do inchaço do soma de células de Müller e células bipolares foi determinada pela medição da área de secção transversal dos corpos celulares marcados com MTO. As medidas foram feitas ao final dos registros, utilizando-se o programa de análise de imagem do LSM (*Zeiss LSM Image Examiner*, versão 3.2.0.70.) (Fig. 7). Os dados foram exibidos como a média das áreas de secção transversal do soma neuronal ou glial, que foram medidas ao final da superfusão com a solução hipo-osmolar, em porcentagem da área do soma medida antes do tratamento hipotônico (100%).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi feito em pelo menos três fatias de tecido retiniano e montagens planas, e o número de células por fatia foi contado. Os dados foram apresentados em histogramas como a média ($\pm\text{EPM}$) das áreas dos somas para cada grupo, em porcentagem do controle. A análise estatística foi feita por meio do programa Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). A significância foi determinada por análise de variância (ANOVA), uma via, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas e teste U de Mann–Whitney para dois grupos. As comparações dos valores de adenosina entre dois grupos foram feitas pelo teste t de Student. O valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

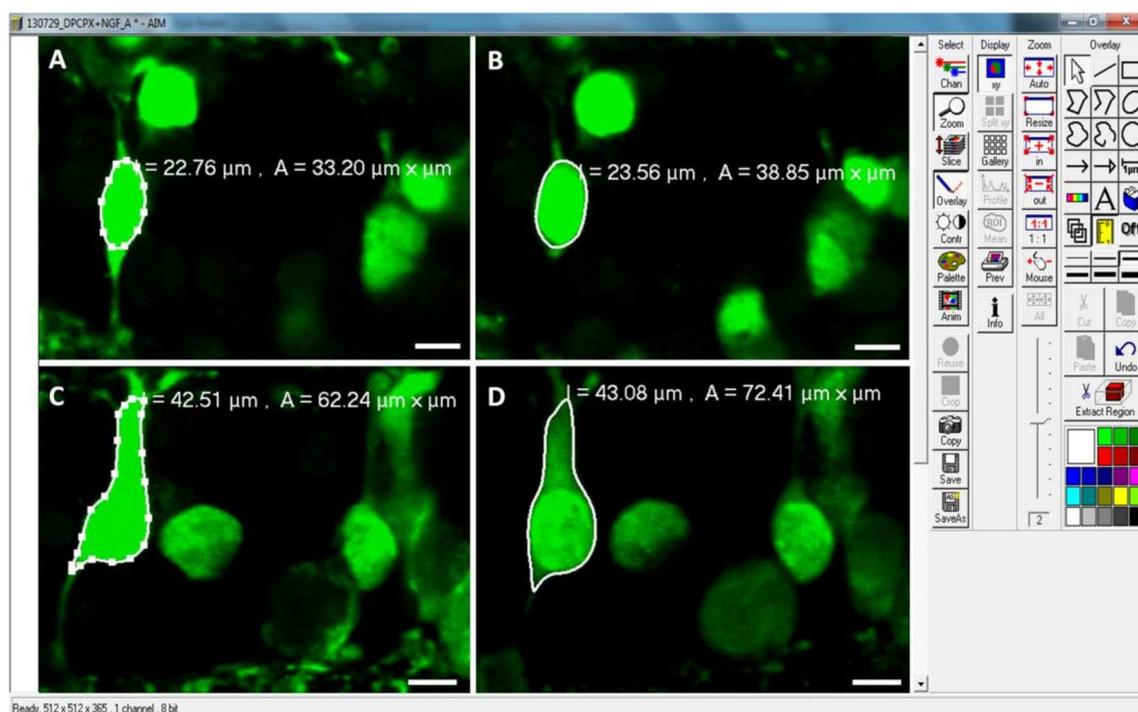


Figura 7. Mensuração do Aumento de Volume Celular. Programa de análise de imagem do Microscópio de Varredura a Laser (LSM 510), utilizado para a mensuração do tamanho dos somas de células de Müller (a, b) e células bipolares (c, d) antes (a, c) e após (b, d) 4 min de superfusão em meio hipotônico, na presença de BaCl₂.

5 RESULTADOS

5.1 LOCALIZAÇÃO DE NGF, TRKA E P75^{NTR} NA RETINA

As células gliais e bipolares da retina foram identificadas por imunomarcção contra glutamina sintetase (*Glutamine Synthetase*, GS), proteína fibrilar glial ácida (*Glial Fibrillary acidic Protein*, GFAP) e PKC α .

A marcação para NGF exibiu distribuição difundida por todo o tecido da retina neural de rato. Entre outras estruturas, as sinapses em fita na CPE, bem como, as sinapses e processos celulares na CPI foram imunopositivas para NGF (Fig. 8a). Além disso, o soma das células ganglionares da retina e outros corpos celulares na CNI foram circundados por imunoreatividade para este fator (Fig. 8a). Os segmentos individuais de fotorreceptores também foram imunomarcados contra NGF (Fig. 8a). Igualmente, as células de Müller exibiram imunoreatividade para a neurotrofina, como indicado por seus processos marcados que atravessam a CNE (Fig. 8a). Já os astrócitos que expressam GFAP, os quais estão localizados na CCG, não foram imunomarcados contra NGF (Fig. 8a).

A imunolocalização do NGF em células de Müller e células bipolares foi determinada pela marcação de células recém-isoladas. Como ilustrado na figura 8b, células de Müller isoladas exibiram imunomarcção pontuada para NGF em todo o corpo celular. Em contraste, células bipolares isoladas foram aparentemente imunonegativas para NGF (Fig. 8c).

A distribuição de TrkA na retina, por sua vez, foi analisada em secções retinianas utilizando-se anticorpos contra TrkA, GS e PKC α . Os corpos de células ganglionares e amácrinas da retina foram imunopositivos para TrkA. Além disso, uma marcação difusa por todo o tecido foi observada (Fig. 9a).

Células de Müller isoladas apresentaram marcação pontuada para TrkA, em particular em seus somas e pés-terminais, e em menor nível em seus processos citoplasmáticos (Fig. 9b). Células bipolares isoladas exibiram imunoreatividade para TrkA em seus somas, bem como, em seus finos processos internos (Fig. 9c). As suspensões de células da retina também

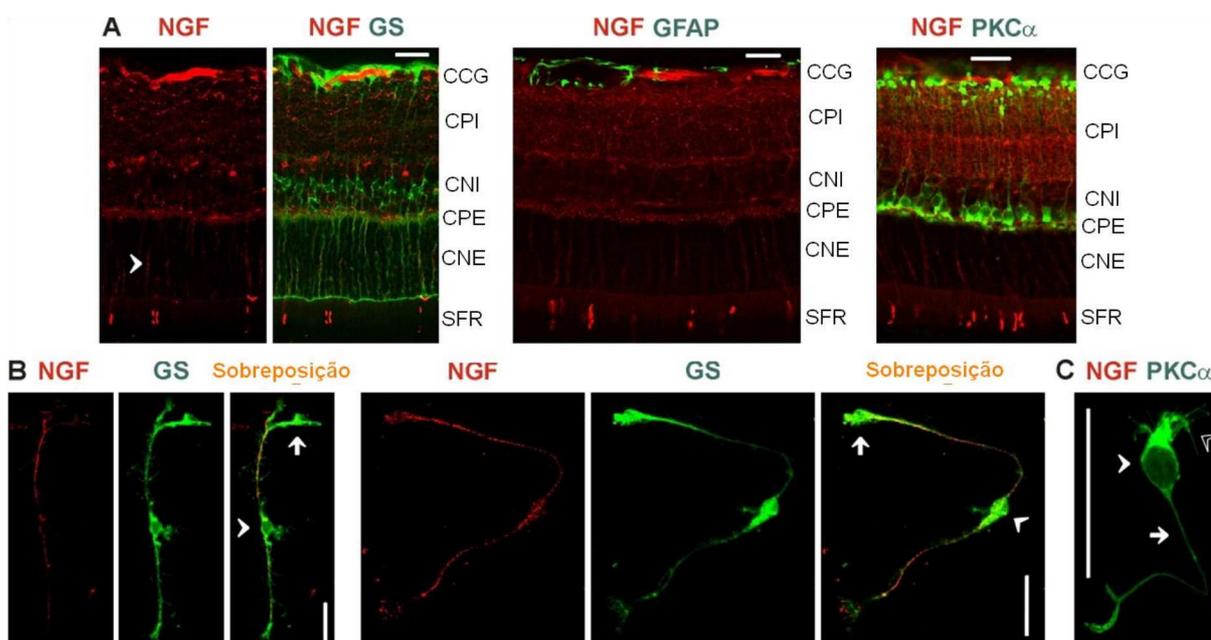


Figura 8. Imunolocalização de NGF na retina de rato. NGF foi imunomarcado em cortes de retina (**a**) e em células de Müller (**b**) e células bipolares (**c**) recém-isoladas da retina de rato. As células de Müller foram co-marcadas com anticorpo contra glutamina sintetase (GS). Astrócitos da retina foram co-marcados com anticorpo contra GFAP. As células bipolares foram co-marcadas com anticorpo contra PKC α . (**a**). *Cabeça de seta*, extensões de células de Müller que atravessam a camada nuclear externa (CNE). (**b**). *Setas*, pés-terminais das células de Müller. *Cabeças de seta*, somas das células de Müller. (**c**). *Seta*, processo interno da célula bipolar. *Cabeça de seta preenchida*, soma da célula bipolar. *Cabeça de seta vazada*, processo externo da célula bipolar. CCG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CPE, camada plexiforme externa; SFR, segmentos de fotorreceptores. Barras, 20 μ m.

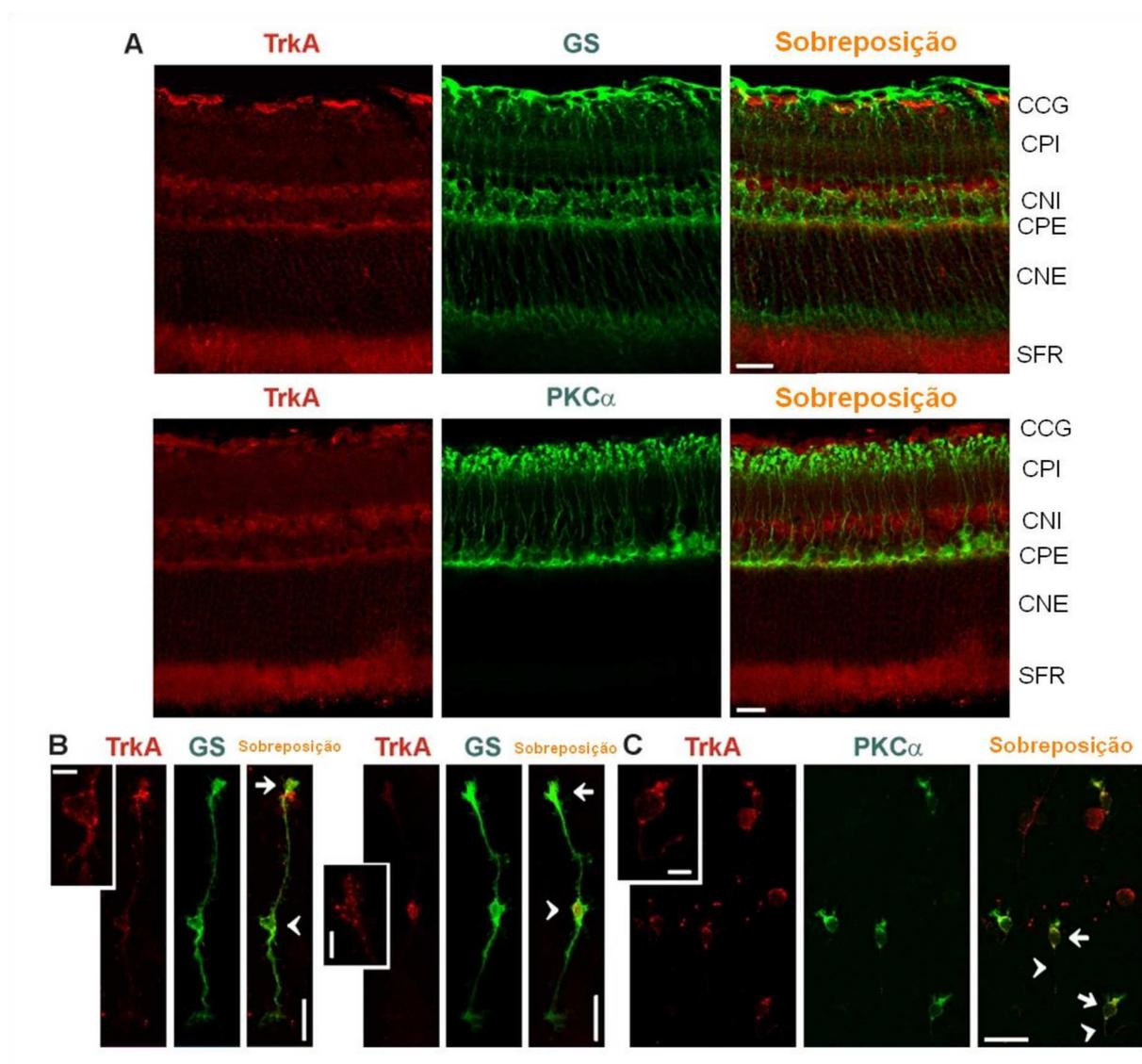


Figura 9. Imunolocalização de TrkA na retina de rato. O receptor TrkA foi imunomarcado em cortes de retina (**a**) e em células de Müller (**b**) e células bipolares (**c**) recém-isoladas da retina de rato. As células de Müller foram co-marcadas com anticorpo contra glutamina sintetase (GS). As células bipolares foram co-marcadas com anticorpo contra PKC α . (**b**) *Inserções*: ampliação do soma (esquerda) e pés-terminais (direita) das células de Müller. *Setas*, terminações (endfeet) da célula de Müller. *Cabeça de seta*, soma da célula de Müller. (**c**) *Inserção*: ampliação de célula bipolar isolada (em maior aumento). *Setas*, somas das células bipolares. *Cabeças de setas*, processos internos de células bipolares. CCG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; SFR, segmentos de fotorreceptores. Barras, 20 μ m e 5 μ m (*insetos*), respectivamente.

contiveram corpos celulares negativos para GS e PKC α (Fig. 9c), sugerindo que tipos adicionais de neurônios retinianos como células amácrinas, por exemplo, expressam TrkA.

A distribuição de p75^{NTR} na retina foi verificada em secções retinianas empregando-se anticorpos contra p75^{NTR}, GS e PKC α . Observou-se uma forte marcação dos cortes para p75^{NTR} através de todas as camadas da retina (Fig. 10a). As células gliais de Müller foram positivas para o receptor, como indicado pela dupla marcação com GS em ambas as camadas plexiformes e membrana limitante externa (Fig. 10a). Por outro lado, o interior do soma de células de Müller e pés-terminais não mostraram sobreposição de p75^{NTR} e GS (Fig. 10a).

Por fim, células de Müller isoladas exibiram imunoreatividade para p75^{NTR} por toda a extensão do corpo celular, incluindo soma, pés-terminais e ambos os processos citoplasmáticos (Fig. 10b). Já as células bipolares isoladas foram imunonegativas para o receptor (Fig. 10c).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES EM FATIAS DE RETINA

As diferenças morfológicas entre células de Müller e células bipolares da retina, bem como, a diferente localização do soma destes dois tipos celulares no interior da CNI foram confirmadas pela dupla marcação imunohistoquímica, utilizando-se anti-GS (células de Müller) e anti-PKC α (células bipolares dos bastonetes) (Fig. 11a).

Em fatias de retinas e suspensões celulares coradas com MTO, as células de Müller e as células bipolares da retina de rato foram identificadas de acordo com suas características morfológicas. O soma da célula de Müller foi localizado na parte central da CNI, enquanto que o soma da célula bipolar foi localizado na margem mais externa desta camada (Fig. 11b), semelhante as suas respectivas localizações imunohistoquímicas (Fig. 11a).

As células de Müller exibem dois finos processos, os quais se estendem em direções opostas a partir do corpo da célula de Müller. Já as células bipolares têm um processo fino, o qual se alonga em direção à CPI e dendritos curtos e grossos, os quais formam sinapses em fitas na CPE.

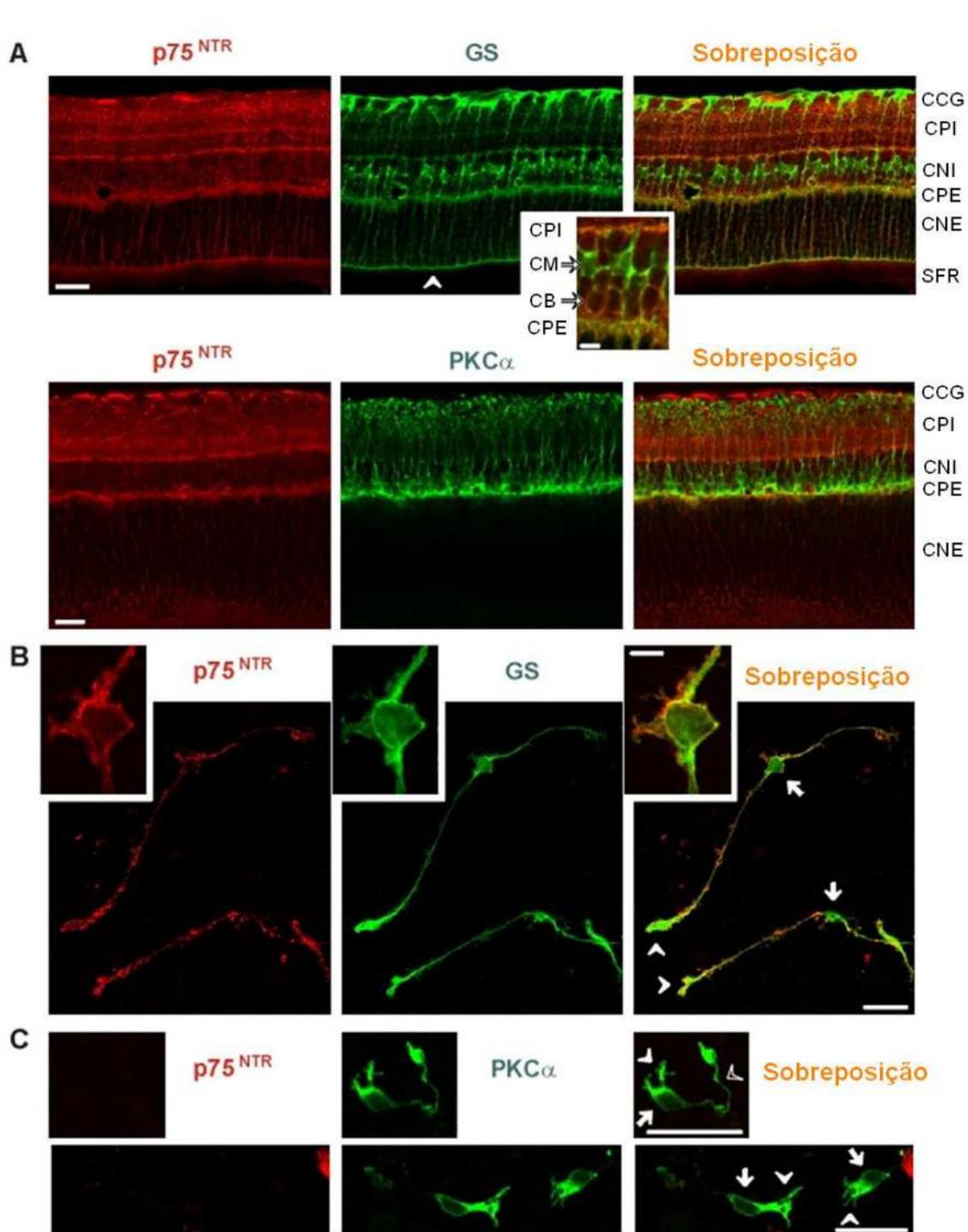


Figura 10. Imunolocalização de p75^{NTR} na retina de rato. O receptor p75^{NTR} foi imunomarcado em cortes (a) e células de Müller (b) e células bipolares (c) recém-isoladas da retina de rato. As células de Müller foram co-marcadas com anticorpo contra glutamina sintetase (GS). As células bipolares foram co-marcadas com anticorpo contra PKC α . A co-localização de duas proteínas produziu um sinal de sobreposição amarelo-laranja. (a) *Cabeças de seta*, membrana limitante externa. *Inserção*: ampliação da camada nuclear interna (CNI) (em maior aumento). Note que o interior do soma da célula de Müller (CM) é desprovido de imunoreatividade para p75^{NTR}, e que o soma das células bipolares é circundado por imunoreatividade para p75^{NTR}. (b) *Setas*, soma da

célula de Müller. *Cabeça de setas*, pés-terminais das células de Müller. *Inserção*: Ampliação do soma da célula de Müller (em maior aumento). (c) *Setas*, somas das células bipolares. *Cabeças de seta preenchidas*, processos externos das células bipolares. *Cabeça de seta não preenchida*, processos internos das células bipolares. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; SFR, segmentos de fotorreceptores. Barras, 20 μm e 5 μm (*inserções*).

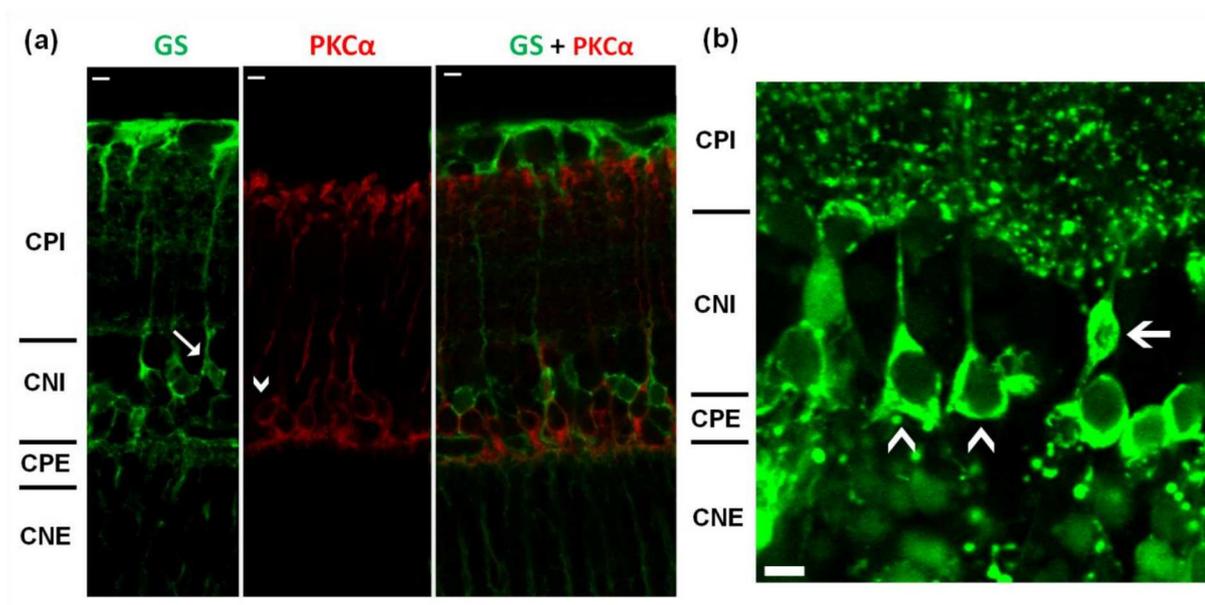


Figura 11. Identificação de células de Müller e células bipolares da retina de rato. As imagens mostram a comparação entre fatias de retina marcadas com anticorpos específicos para células de Müller e células bipolares (a) e fatias de retina coradas com *Mitotracker Orange* (b). (a) Marcação imunohistoquímica de fatias de retinas controle com anticorpos contra o marcador glial, glutamina sintetase (GS), e o marcador de células bipolares dos bastonetes, proteína cinase Cα (PKCα). (b) Exemplo de uma fatia de retina recém-isolada, corada com *Mitotracker Orange*. O foco está na camada nuclear interna (CNI). Note que o soma da célula de Müller está localizado na parte central da CNI, enquanto que os somas das células bipolares estão localizados na margem mais externa da CNI. Dois finos processos estendem-se em direções opostas a partir do corpo da célula de Müller. As células bipolares têm um processo fino, o qual se alonga em direção à camada plexiforme interna (CPI) e dendritos curtos e grossos, os quais formam sinapses em fitas (*ribbon synapses*) na camada plexiforme externa (CPE). CNE, camada nuclear externa; *Setas*, somas de células de Müller; *Cabeças de seta*, somas de células bipolares. Barras de escala, 5 μm .

5.3 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE ADENOSINA ENDÓGENA EM CONDIÇÕES HIPO-OSMÓTICAS

O tecido retiniano altera seu perfil de liberação de adenosina quando submetido à mudança de osmolaridade da solução extracelular, bem como, na presença de cloreto de bário em condições de hipo-osmolaridade, sugerindo a presença de um componente purinérgico endógeno de regulação de volume osmótico no tecido retiniano.

A troca da solução extracelular iso-osmolar pela solução hipo-osmolar (60% da osmolaridade do controle) no sistema de perfusão induz um rápido e significativo aumento na liberação de adenosina endógena (aproximadamente 38%). Por outro lado o mesmo perfil de liberação não é observado quando o tecido retiniano é pré-tratado e perfundido com solução extracelular contendo cloreto de bário. Ao contrário, os tecidos submetidos ao meio contendo íons bário demonstram uma tendência à redução temporal dos níveis de adenosina, embora não significativa (Fig. 12).

A partir de 30 seg até 3 min de perfusão em condições hipo-osmóticas, os níveis de adenosina liberada por retinas controle se mantêm significativamente maior do que aqueles provenientes de retinas pré-tratadas e perfundidas com cloreto de bário (Fig. 12).

5.4 INCHAÇO HIPO-OSMÓTICO DO SOMA DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES

O inchaço dos somas de células de Müller e células bipolares foi investigado pela superfusão de fatias de retina e células isoladas em solução extracelular hipo-osmótica (60% da osmolaridade do controle). A superfusão de fatias de retina por 4 min não provocou alteração significativa do tamanho dos somas de células de Müller (Fig. 13a), enquanto que células bipolares exibiram inchaço de seus somas sob esta mesma condição (Fig. 13b). Igualmente, os somas de células de Müller isoladas não alteraram os seus tamanhos quando submetidos a condições hipo-osmóticas (Fig. 14a), enquanto que os somas de células bipolares isoladas incharam significativamente sob estresse hipo-

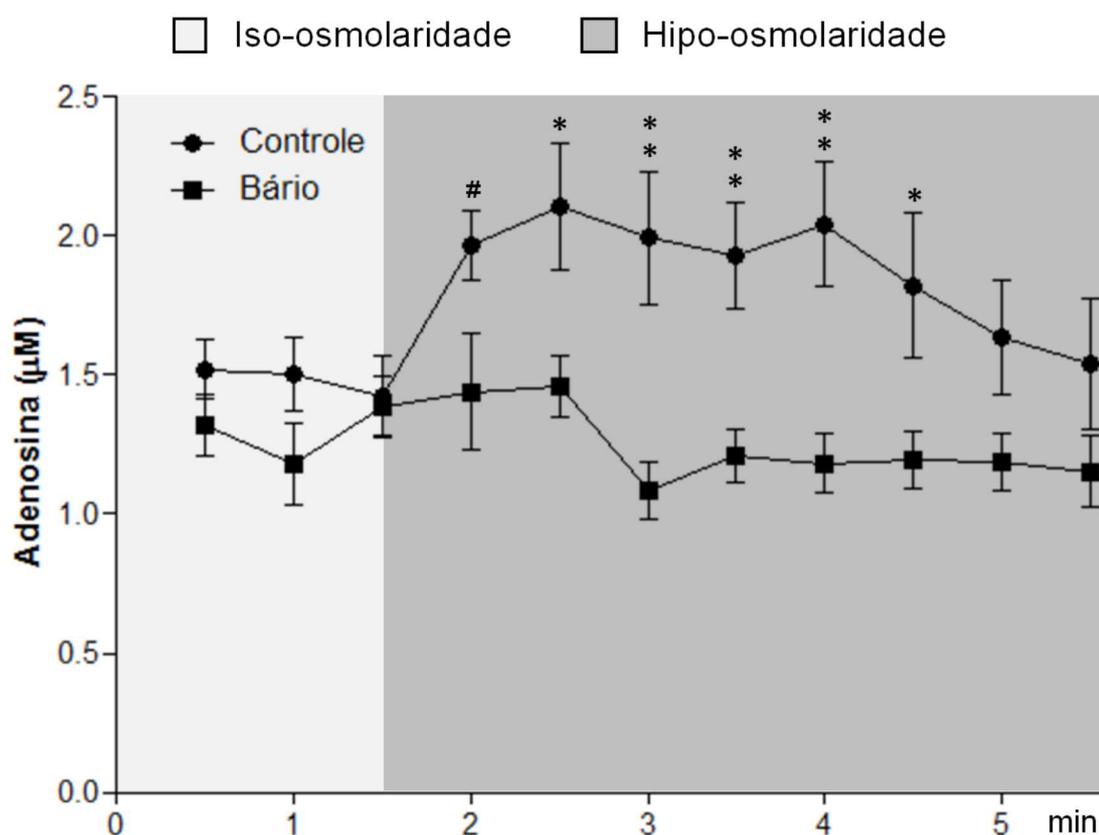


Figura 12. Perfil da liberação temporal de adenosina endógena em condições de hipo-osmolaridade. Os níveis de adenosina foram medidos a cada 30 segundos de perfusão dos tecidos retinianos íntegros de rato por cromatografia líquida de alta eficácia (detector UV). As retinas foram perfundidas com solução extracelular iso- e hipo-osmótica na ausência (círculo) ou presença (quadrado) de BaCl_2 (1 mM) por um tempo total de 330 seg. Após 1 min de perfusão, a solução iso-osmolar foi substituída pela solução hipo-osmolar. Os valores de adenosina (μM) foram expressos como a média ($\pm\text{EPM}$) do grupo (Controle, $n = 3$ retinas ou Bário, $n = 4$ retinas) para cada tempo de liberação. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ comparado ao seu respectivo tempo de liberação no grupo Bário em condições hipo-osmóticas; # $P < 0.05$ comparado ao controle iso-osmolar em 30 seg de perfusão.

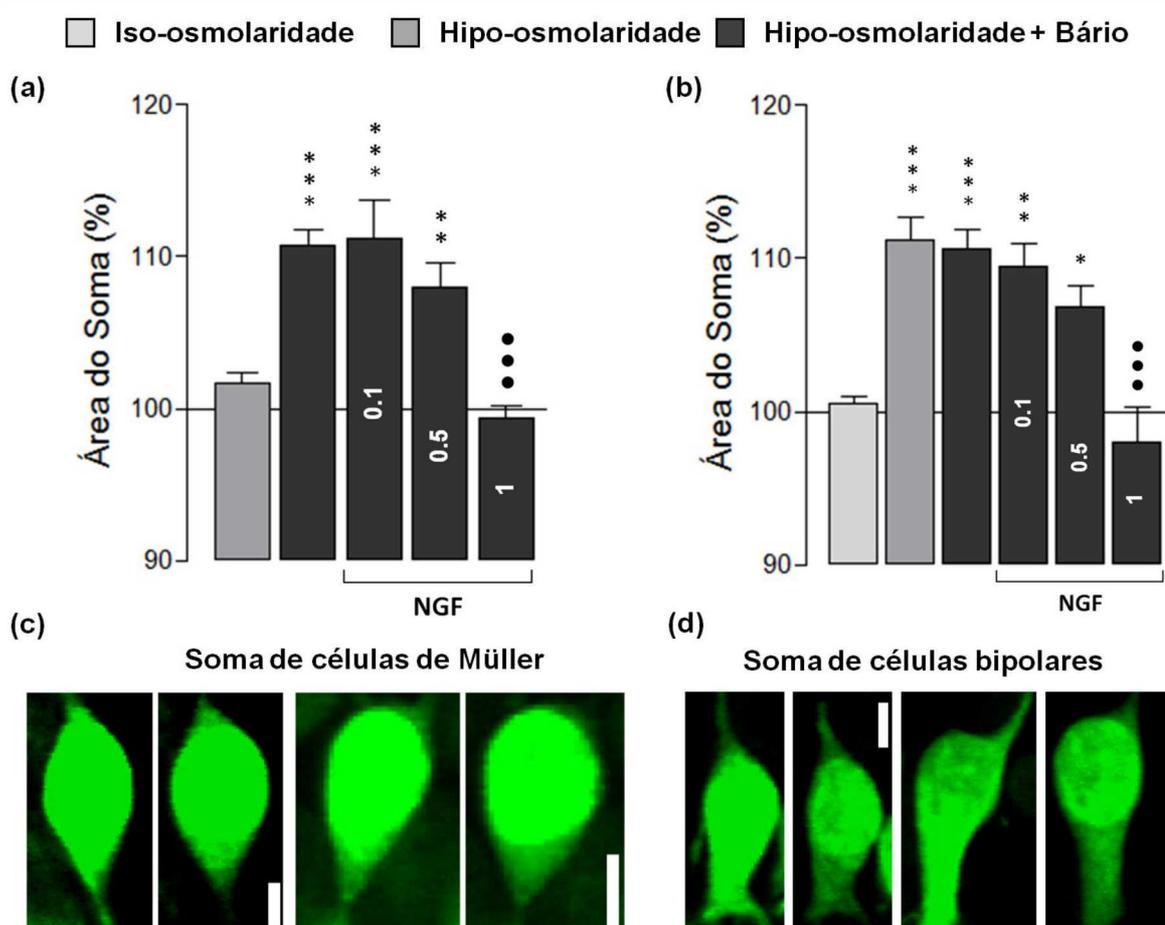


Figura 13. Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico dos somas de células de Müller (a) e células bipolares (b) em fatias da retina de rato. Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina com solução iso- ou hipó-osmótica, e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). Os efeitos da solução hipó-osmótica foram registrados na ausência e presença de BaCl₂ (1 mM). A concentração de NGF (ng/ml) é exibida nas barras. (c) e (d) Registros originais dos somas, obtidos antes (esquerda) e durante (direita) a superfusão das fatias com solução hipó-osmótica na presença de BaCl₂. Cada barra representa valores obtidos com 9-34 células. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ comparado a dados obtidos antes da adição de íons Ba²⁺ (a) ou antes da superfusão em meio hipotônico (b). ●●● $P < 0.001$ comparado a dados obtidos a partir de células inchadas. Barras de escala, 5 μm.

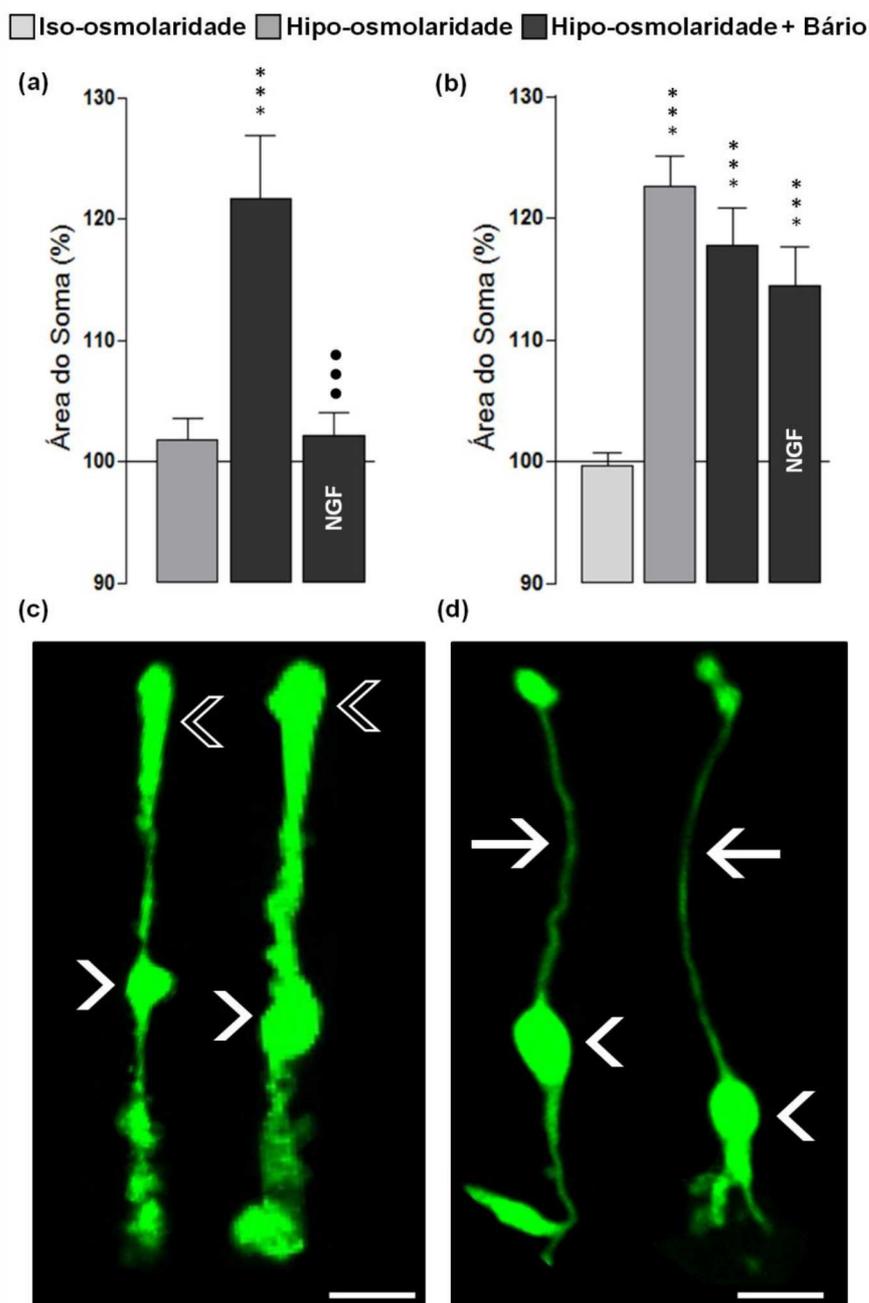


Figura 14. Efeito do NGF (1 ng/ml) sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller (a) e células bipolares (b) recém-isoladas da retina de rato. Os dados foram medidos após 4 min de superfusão das células com solução iso- ou hipo-osmótica, e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrados antes da superfusão (100%). Os efeitos da solução hipo-osmótica foram registrados na ausência e presença de BaCl₂ (1 mM). (c), (d) Registros originais de células de Müller (c) e células bipolares (d) recém-isoladas e coradas com *Mitotracker Orange*. Cabeças de seta preenchidas: soma celular; Cabeças de seta vazadas: pés-terminais das células de Müller; Setas: Processos mais internos das células bipolares. Cada barra representa os valores obtidos com 10-20 células. *** $P < 0.001$ comparado a dados obtidos antes da adição de íons Ba²⁺ (A) ou antes da superfusão em meio hipotônico (b). ●●● $P < 0.001$ comparado a dados obtidos a partir de células inchadas. Barras de escala, 10 μ m.

osmótico (Fig. 14b). Por outro lado, na presença de íons Ba^{2+} (bloqueadores de canais de potássio) a hipo-osmolaridade induziu inchaço significativo dos corpos de células de Müller (Fig. 13a e 14a). Já em fatias de retinas pós-isquêmicas, as células de Müller exibiram inchaço hipo-osmótico de seus somas mesmo na ausência de $BaCl_2$ (Fig. 15a, b).

5.5 INIBIÇÃO DE INCHAÇO OSMÓTICO POR NGF

O efeito do NGF sobre a regulação de volume de células de Müller e células bipolares foi analisado em fatias de retina e células isoladas superfundidas com solução extracelular, contendo cloreto de bário (1 mM). O tamanho dos somas celulares foi medido após 4 min de exposição ao meio hipo-osmótico, sendo o NGF simultaneamente administrado com a solução hipo-osmolar.

O inchaço hipo-osmótico dos somas de células de Müller e células bipolares em fatias retinianas foi inibido por NGF de maneira dependente de concentração, com total eliminação do inchaço a 1 ng/ml. (Fig. 13a e Fig. 13b). Por outro lado, enquanto o NGF impediu completamente o inchaço hipo-osmótico do soma de células de Müller isoladas (Fig. 14a), o mesmo não inibiu o inchaço do soma de células bipolares isoladas (Fig. 14b).

O NGF também reduziu significativamente o inchaço hipo-osmótico de células de Müller (Fig. 15a, 15b) e células bipolares (Fig. 15b) em fatias de retinas pós-isquêmicas. Contudo, o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células bipolares, em fatias de retinas pós-isquêmicas (Fig. 15b), foi significativamente menor do que aquele observado em fatias de retina controle.

Ao analisar que tipo de receptor poderia mediar o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico das células de Müller, observou-se que o inibidor do receptor TrkA (Calbiochem 648450) anulou o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller, enquanto que o inibidor de $p75^{NTR}$ (TAT-pep5) não teve efeito (Fig. 16).

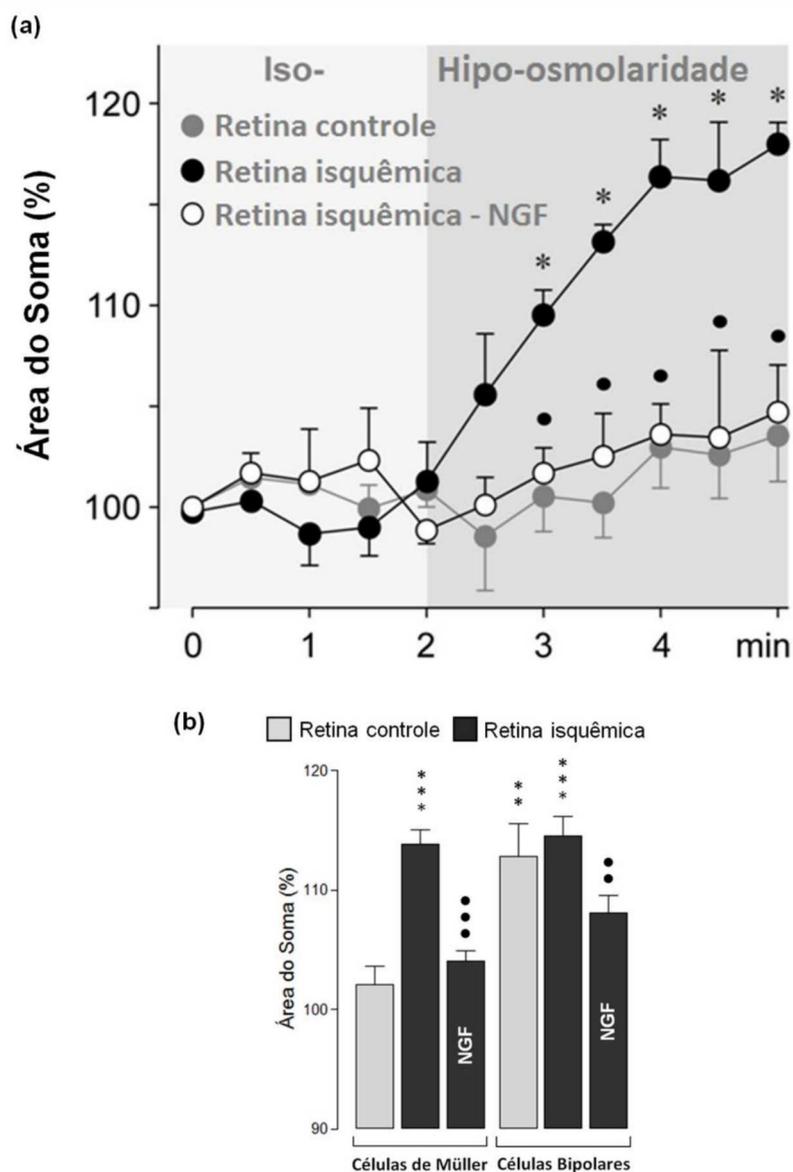


Figura 15. Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico dos somas de células de Müller e células bipolares da retina pós-isquêmica de rato. **(a)** Alterações da área de secção transversal do soma de células de Müller ($n=3$), dependentes do tempo, durante a mudança da solução extracelular iso-osmótica para hipo-osmótica. Os dados foram registrados em fatias de retinas controle e retinas pós-isquêmicas (3 dias), na ausência e presença de NGF (1 ng/ml), e foram expressos como porcentagem do tamanho do soma registrado antes da superfusão (100%). **(b)** Efeito do NGF sobre o inchaço osmótico dos somas de células de Müller (Esquerda) e células bipolares (Direita) da retina pós-isquêmica de rato. Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina com solução hipo-osmótica, e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). Os efeitos da solução hipo-osmótica foram registrados na ausência de BaCl_2 . Os animais foram submetidos à isquemia por 1 h e mortos 3 dias após o processo. Cada barra representa valores obtidos com 5-11 células. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ comparado a dados obtidos a partir da retina controle **(a, b)** ou antes da superfusão em meio hipotônico **(b, células bipolares)**. ● $P<0.05$; ●● $P<0.01$; ●●● $P<0.001$ comparado a dados obtidos a partir de células inchadas.

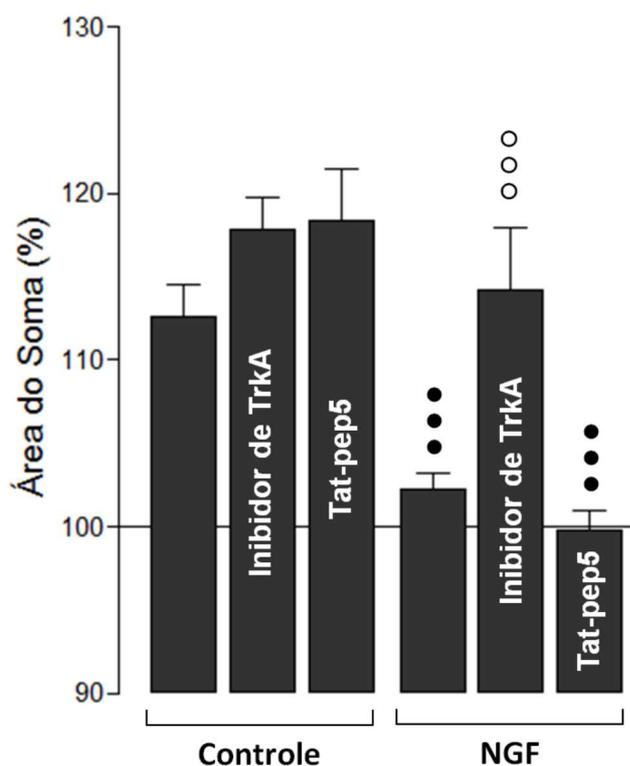


Figura 16. Efeito do bloqueio dos receptores de NGF, TrkA e p75^{NTR} sobre a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller mediada por NGF (1 ng/ml). Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina com solução iso- ou hipo-osmótica, contendo BaCl₂ (1 mM), e estão expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). O inibidor de TrkA (Calbiochem 648450; 500 nM), o inibidor de p75^{NTR}, (TAT-Pep5; 1 μM) e ZnCl₂ (100 μM) foram pré-incubados por 15-45 min. Cada barra representa os valores obtidos com 7-22 células. Inibição significativa de inchaço: ●●●*P*<0.001. Inibição significativa do efeito do NGF: ○○○*P*<0.001.

5.6 DEPENDÊNCIA DO EFEITO DO NGF SOBRE A TRANSATIVAÇÃO DE RECEPTOR

A possível participação de uma cascata de sinalização glutamatérgica-purinérgica mediando o efeito inibidor de inchaço do NGF foi investigada pela superfusão de fatias de retina com diferentes antagonistas de receptores.

O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço do soma de células de Müller foi completamente anulado na presença do antagonista seletivo de receptores metabotrópicos de glutamato do grupo II, LY341495 (Fig. 17a). Por outro lado, observou-se que LY341495 sozinho inibe o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retina, e não abole o efeito inibidor de inchaço do NGF (Fig. 17b).

O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço do soma de células de Müller e células bipolares foi completamente anulado na presença do antagonista seletivo do receptor purinérgico P2Y₁, MRS2179, e na presença do antagonista do receptor de adenosina A1, DPCPX (Fig. 17c, d). Estes dados sugerem que os efeitos do NGF sobre o inchaço do soma de células de Müller e células bipolares são mediados pela transativação dos receptores P2Y₁ e A1.

5.7 DEPENDÊNCIA DO EFEITO DO NGF SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCINA

O efeito inibitório exibido pelo NGF sobre o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retina poderia ser um efeito indireto mediado por outros fatores liberados por células de Müller. Assim, o inibidor do receptor tirosinocinase de FGF, PD173074, foi inicialmente testado.

Observou-se que o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares, em fatias de retina, é completamente anulado pelo bloqueador PD173074 (Fig. 18a, b), sugerindo que o efeito inibitório do NGF é mediado pela transativação de receptores de FGF. Logo, para determinar se o próprio bFGF teria efeito inibitório sobre o inchaço osmótico celular, o mesmo foi testado em células de Müller e células bipolares isoladas. Como mostrado na figura 19a, bFGF exógeno bloqueou

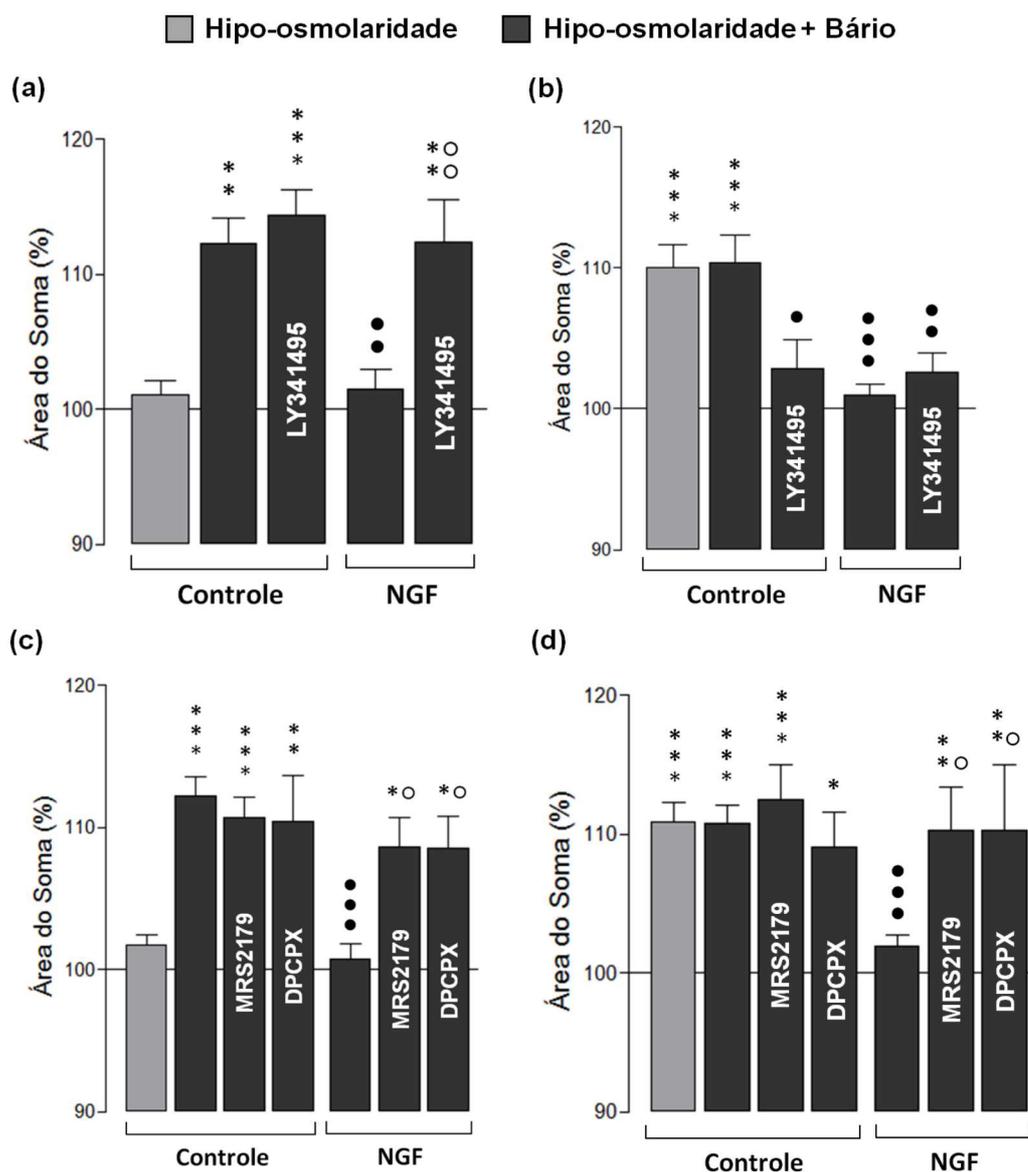


Figura 17. Avaliação da transativação de receptor sobre a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares induzida por NGF (1 ng/ml). Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina com solução iso- ou hipo-osmótica, e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). Os efeitos da solução hipo-osmótica foram registrados na ausência e presença de BaCl_2 (1 mM). **(a), (b)** Análise do bloqueio dos receptores metabotrópicos de glutamato do grupo II, pelo antagonista LY341495 (100 μM) sobre a inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller **(a)** e células bipolares **(b)** induzida por NGF. **(c), (d)** Avaliação do bloqueio dos receptores purinérgicos P2Y1 e receptores A_1 de adenosina, pelos antagonistas MRS2179 (30 μM) e DPCPX (100 nM), respectivamente sobre a inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller **(c)** e células bipolares **(d)** induzida por NGF. Cada barra representa valores obtidos com 7-17 células. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ comparado a dados obtidos antes da adição de íons Ba^{2+} **(a, c)** ou antes da superfusão em meio hipotônico **(b, d)**. ● $P < 0.05$; ●● $P < 0.01$; ●●● $P < 0.001$ comparado a dados obtidos a partir de células inchadas. Inibição significativa do efeito do NGF: ○ $P < 0.05$; ○○ $P < 0.01$.

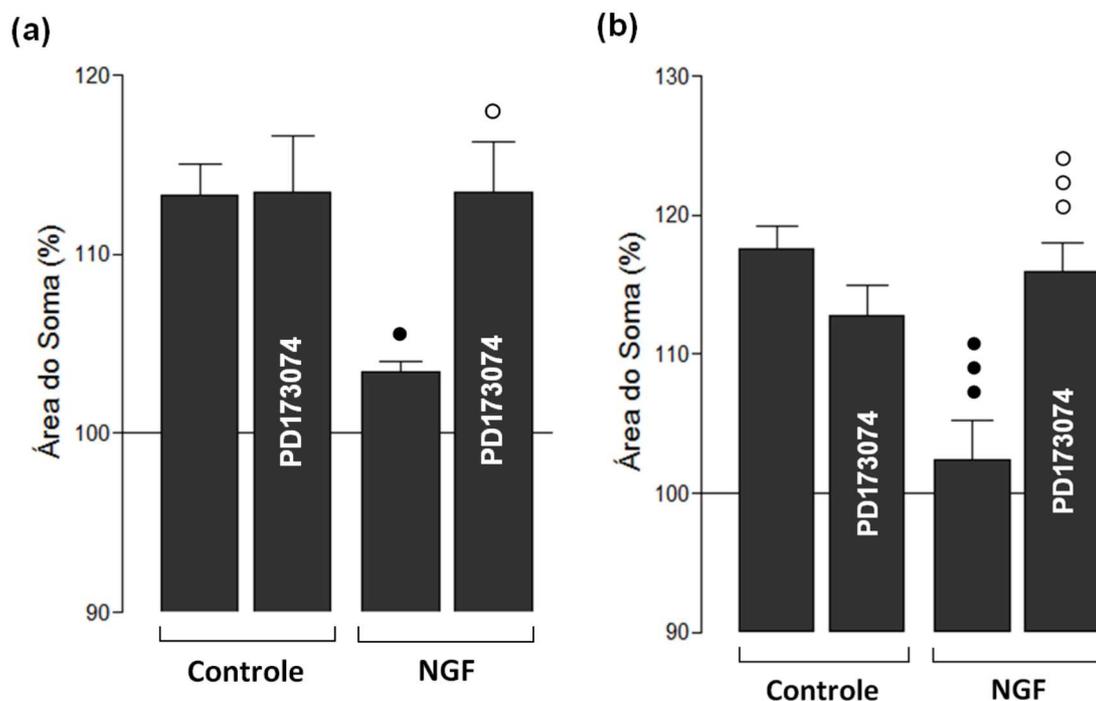


Figura 18. Análise da ativação da sinalização de bFGF sobre o efeito de inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller, mediado por NGF (1 ng/ml). Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina em solução hipo-osmótica contendo BaCl₂ (1 mM), e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). (a), (b) Avaliação do bloqueio dos receptores de FGF pelo inibidor PD173074 (500 nM) sobre o a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller (a) e células bipolares (b), induzida por NGF. Cada barra representa valores obtidos com 7-23 células. Inibição significativa de inchaço: ● P <0.05; ●●● P <0.001. Inibição significativa do efeito do NGF: ○ P <0.05; ○○○ P <0.001.

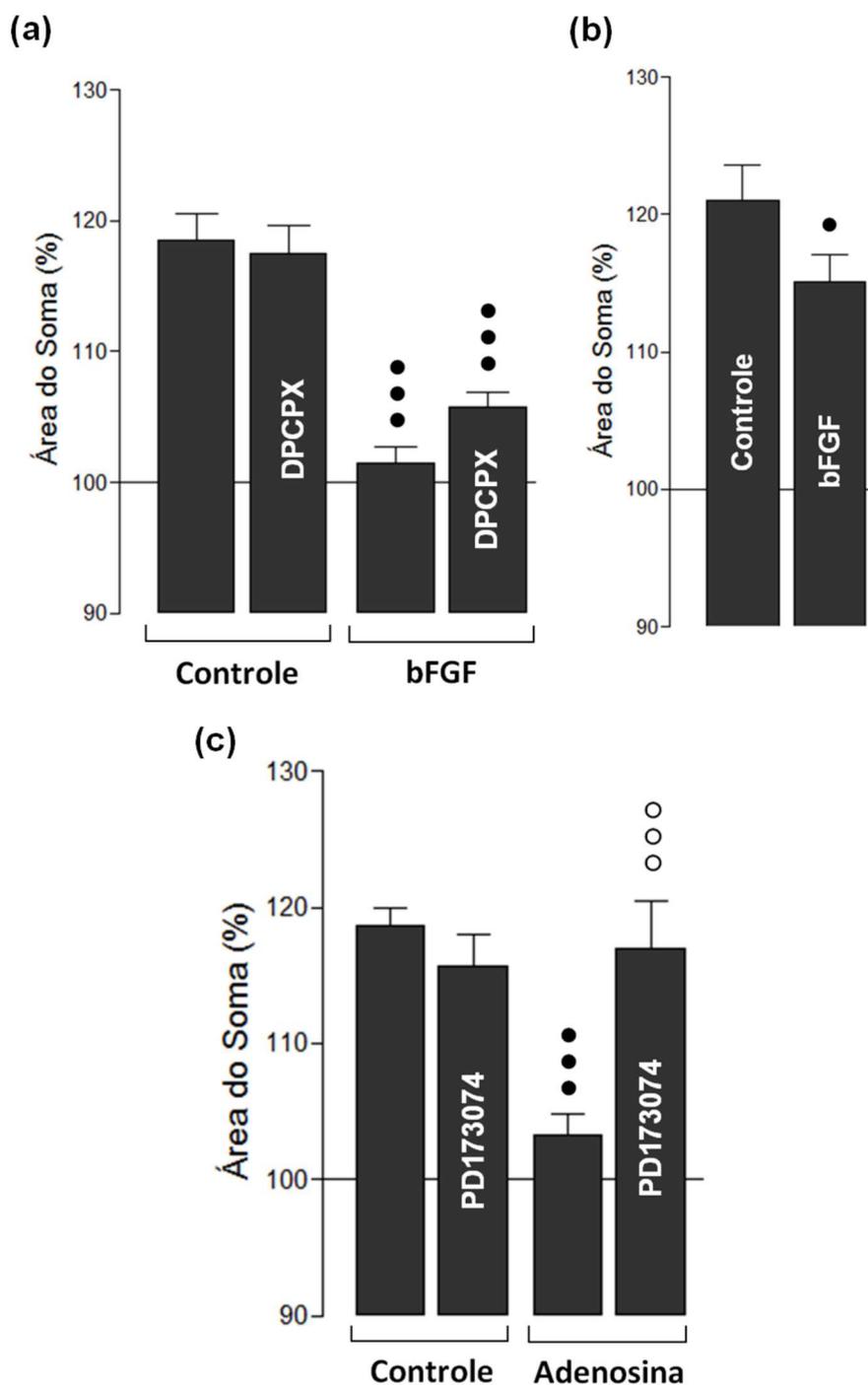


Figura 19. Análise da relação entre as vias de sinalização de bFGF e Adenosina sobre a inibição de inchaço osmótico dos somas de células de Müller. Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de células isoladas em solução hipo-osmótica contendo BaCl_2 (1 mM), e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). **(a)**, **(b)** Efeito do bFGF (10 ng/ml) sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller **(a)** e células bipolares **(b)**, **(c)** Efeito do inibidor PD173074 (500 nM) sobre a inibição de inchaço osmótico do soma de células de Müller induzida por adenosina (10 μM). Cada barra representa valores obtidos com 7-23 células. Inibição significativa de inchaço: ● P <0.05; ●●● P <0.001. Inibição significativa do efeito do Agonista: ○○○ P <0.001.

completamente o inchaço osmótico de células de Müller isoladas. Por outro lado, inibiu somente cerca de 30% o inchaço osmótico do soma de células bipolares isoladas (Fig. 19b), sugerindo que além do bFGF, fatores solúveis adicionais, derivados de células de Müller, podem exercer um papel na mediação do efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares.

Desta forma, várias citocinas foram testadas e como observado na figura 20a, GDNF e TGF- β 1 reduziram significativamente o grau de inchaço osmótico do soma de células bipolares em fatias de retina, enquanto que EGF e PDGF não tiveram efeito. Para distinguir se GDNF e TGF- β 1 inibem diretamente o inchaço osmótico do soma de células bipolares ou indiretamente via seus efeitos em células de Müller, as citocinas foram testadas em células bipolares recém-isoladas. Observou-se que ambas citocinas reduziram significativamente o inchaço osmótico do soma de células bipolares isoladas (Fig. 20b), embora em um grau menor do que aquele observado em fatias de retina (Fig. 20a). A coadministração de GDNF e TGF- β 1 reduziu o inchaço osmótico do soma de células bipolares isoladas (Fig. 20b) a um grau similar àquele observado em fatias de retina (Fig. 20a). Já a coadministração de bFGF, GDNF e TGF- β 1 não levou a uma redução maior da extensão do inchaço osmótico do soma das células bipolares isoladas (Fig. 20b).

5.8 DEPENDÊNCIA DA LIBERAÇÃO GLIAL DE bFGF SOBRE A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DE ADENOSINA

Os dados anteriores (Fig. 17c e Fig. 19a) sugerem que a liberação de bFGF induzida por NGF em células de Müller ocorre posterior à ativação autócrina de receptores A1. Para provar esta suposição, o efeito inibitório da adenosina sobre o inchaço osmótico de células de Müller foi testado durante o bloqueio da ativação do receptor de FGF. Verificou-se então, que o inibidor do receptor de FGF (PD173074) anulou completamente o efeito inibitório da adenosina sobre o inchaço osmótico de células de Müller isoladas (Fig. 19c).

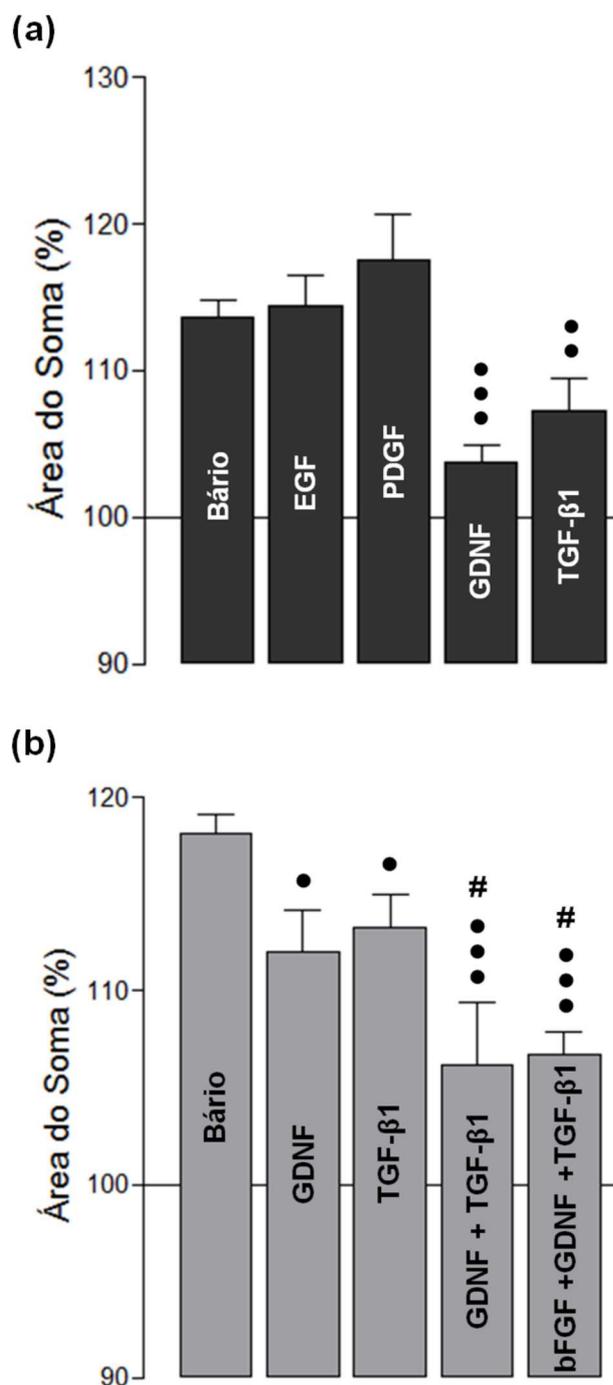


Figura 20. Efeito de diferentes citocinas (10 ng/ml) sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares em fatias de retina (a) e recém-isoladas (b). Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de fatias de retina ou células isoladas em solução hipo-osmótica contendo BaCl_2 (1 mM), e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). (a) Efeitos de EGF, PDGF, GDNF e TGF-β1 sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares. (b) Efeitos de GDNF e TGF-β1, e coadministração de GDNF e TGF-β1 sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares. Cada barra representa valores obtidos com 9-28 células. Diferença significativa vs. Inchaço induzido por BaCl_2 (1 mM): ●● P <0.01; ●●● P <0.001. Diferença significativa vs. TGF-β1: # P <0.05.

5.9 DEPENDÊNCIA DA INIBIÇÃO DE INCHAÇO SOBRE A ABERTURA DE CANAIS IÔNICOS

O bloqueador de canais de potássio, clofílio e o bloqueador de canais de cloreto, NPPB foram empregados para se verificar se os efeitos inibitórios de inchaço osmótico exibidos por NGF e bFGF eram dependentes da abertura de canais iônicos.

Observou-se que ambos agentes bloquearam completamente o efeito inibitório do bFGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller (Fig. 21a). Adicionalmente, o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller isoladas (Fig. 5a do Apêndice 1), bem como, o efeito inibitório da coadministração GDNF+TGF- β 1 sobre o inchaço osmótico de células bipolares isoladas (Fig. 5b do Apêndice 1) foram ambos bloqueados por clofílio e NPPB.

Por fim, o antagonista de PKA (H-89) anulou o efeito inibidor de inchaço osmótico exercido pelo bFGF (Fig. 21b), sugerindo um provável envolvimento da via de sinalização PKA na ativação de canais iônicos em células de Müller.

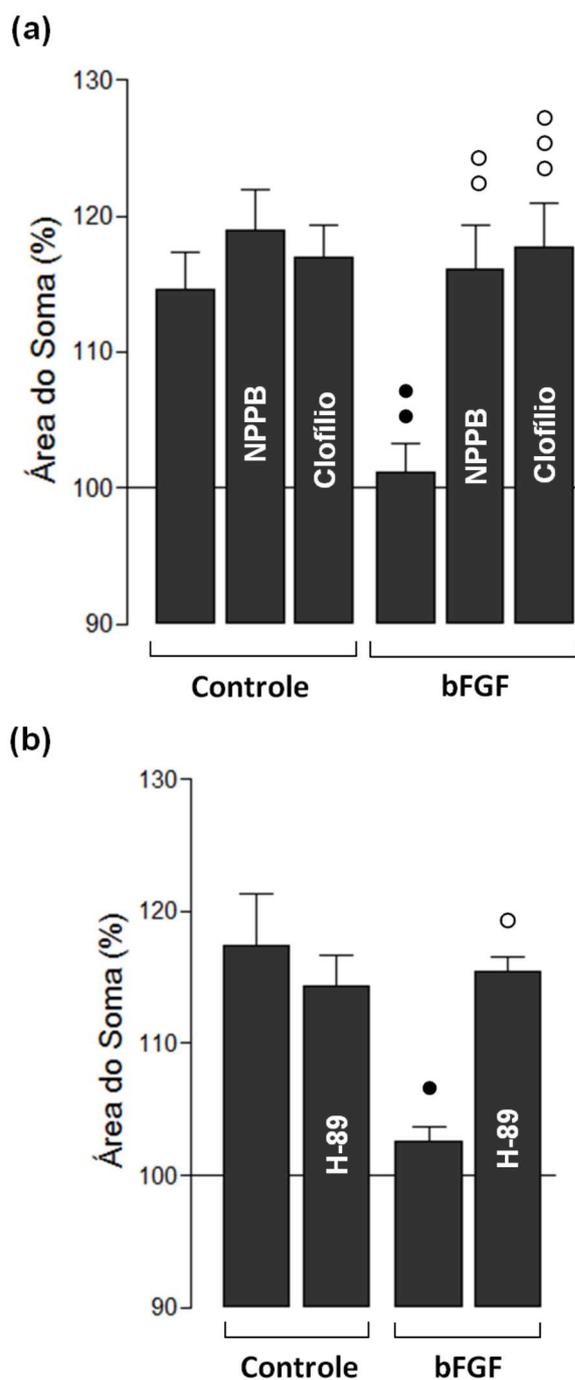


Figura 21. Dependência da inibição de inchaço sobre a abertura de canais iônicos. Análise da dependência do efeito de inibição de inchaço do bFGF sobre a ativação de canais iônicos (a) e ativação da via PKA (b). Os dados foram medidos após 4 min de superfusão de células de Müller isoladas da retina de rato, em solução hipo-osmótica contendo BaCl₂ (1 mM), e expressos em porcentagem do tamanho do soma registrado antes do início da superfusão (100%). O efeito do bFGF (10 ng/ml) foi anulado na presença do bloqueador de canal de cloreto, NPPB (100 μM) e do bloqueador de canal de potássio, clofilio (10 μM), bem como, na presença do inibidor de PKA, H-89 (1 μM). Cada barra representa valores obtidos com 7-8 células. Inibição significativa de inchaço: ●*P*<0.05; ●●*P*<0.01. Inibição significativa do efeito do bFGF: ○*P*<0.05; ○○*P*<0.01; ○○○*P*<0.001.

6 DISCUSSÃO

6.1 IMUNOREATIVIDADE PARA NGF, TRKA E P75^{NTR}

Para determinar se as células de Müller e/ou células bipolares da retina de rato contém NGF, fatias de retina foram duplamente imunomarcadas contra GS, GFAP, PKC α e NGF. Na retina, GS é predominantemente expressa por células de Müller (GABRIEL et al., 2001) enquanto que astrócitos são fortemente marcados com anticorpos contra GFAP (SCHNITZER, 1988). Já as células bipolares dos bastonetes são seletivamente marcadas com anticorpos contra PKC α (NEGISHI; KATO; TERANISHI, 1988).

A imunoreatividade para NGF exibiu uma distribuição bem difundida por toda retina neural. Estes dados estão de acordo com estudos prévios os quais descrevem que o NGF é expresso por células ganglionares da retina e células de Müller na retina neural de rato (CHAKRABARTI et al., 1990). As células de Müller podem representar uma principal fonte de NGF na retina, como indicado por marcação pontilhada para NGF em células isoladas (Fig. 8b). Se a marcação pontilhada indica a presença de vesículas contendo NGF em células de Müller (SANDOW et al., 2000) permanece a ser determinado em experimentos futuros.

Além das células ganglionares e amácrinas da retina (Fig. 9a), células de Müller e células bipolares exibiram imunoreatividade para TrkA (Fig. 9b, c), enquanto que células de Müller, mas não células bipolares, também exibem imunoreatividade para p75^{NTR} (Fig. 10b, c). A presença de células de Müller imunopositivas para TrkA (Fig. 9b) está em discordância com um estudo recente que mostrou que as células de Müller de rato são imunonegativas para TrkA (KOKONA et al., 2012). As razões para estes diferentes dados imunohistoquímicos não são claras e podem incluir, por exemplo, o uso de diferentes linhagens de rato e diferenças no reconhecimento de membrana plasmática entre cortes de retina e células isoladas.

Observou-se a ocorrência de imunoreatividade para p75^{NTR} por todas as camadas da retina. A marcação para p75^{NTR} foi verificada em células de Müller

tanto em fatias de retina quanto em suspensões celulares (Fig. 10a, b), mas não em células bipolares. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios os quais mostraram que p75^{NTR} está localizado em células de Müller, mas não em células bipolares da retina de rato (HU et al., 1998; WEXLER et al., 1998; LEBRUN-JULIEN et al., 2009).

6.2 LIBERAÇÃO DE ADENOSINA

O tecido retiniano aumentou a liberação de adenosina quando submetido à hipo-osmolaridade na ausência, mas não na presença de íons bário (Fig. 12), ratificando a hipótese de que existe um componente purinérgico endógeno na retina, presente em células de Müller, que impede o inchaço hipo-osmótico destas células (WURM et al., 2010, 2011). Em condições nas quais as células de Müller perdem esta capacidade de regular seu volume osmótico (Isquemia retiniana, retinopatia diabética, estresse oxidativo, bloqueio de canais de K⁺ por íons bário, etc.), este componente purinérgico pode ainda ser restabelecido por diferentes ligantes de receptores (UCKERMANN *et al.* 2006; KALISCH et al., 2006; WEUSTE et al., 2006; WURM *et al.* 2008; KRÜGEL *et al.* 2010; NEUMANN et al., 2010; LINNERTZ *et al.* 2011; WAHL *et al.* 2013).

Estudos prévios sugerem que o estiramento da membrana induzida por perturbações osmóticas e mecânicas como as que ocorrem durante intensa atividade neuronal (DMITRIEV et al., 1999; NEWMAN, 2001) engatilham a liberação de ATP por células de Müller o qual via ativação autócrina de P2Y₁ impede o inchaço osmótico destas células (WURM et al., 2010; KRÜGEL et al., 2010). A suposição de que as células de Müller liberam ATP e adenosina sob estresse osmótico/mecânico é apoiada pelos seguintes fatos: embora o estímulo osmótico não induza usualmente o inchaço de células de Müller, o mesmo induz inchaço quando antagonistas de P2Y₁ e receptores A1 de adenosina (ou inibidores de canais de cloreto e potássio) estão presentes na solução extracelular (WURM et al., 2009; 2010; KRÜGEL et al., 2010). O estresse hipo-osmótico não induz inchaço de células de Müller na retina de camundongos tipo-selvagem, enquanto que ele induz um inchaço instantâneo

de células de Müller em tecidos retinianos de camundongos deficientes para os receptores P2Y₁ e A1 (WURM et al., 2010).

Então, dois diferentes mecanismos podem induzir a liberação de ATP e adenosina por células de Müller: liberação dependente de receptor de glutamato e liberação independente de receptor induzida por estiramento de membrana osmótico.

Quase todas as células do corpo liberam ATP quando mecanicamente ou osmoticamente estressadas (DARBY et al., 2003; GOLDSTEIN et al., 2003; OLLIVIER et al., 2006). É possível que a regulação de volume autócrina seja uma função primordial desta liberação de ATP e que em condições patológicas a liberação osmótica/mecânica de purinas seja reduzida ou não funcional. No modelo adotado no presente estudo, verificou-se que o bloqueio de canais de K⁺ por íons bário leva a uma rápida inibição na liberação de adenosina (Fig. 12). Essa anulação também poderia interromper o processamento de informação neuronal regular, uma vez que, a adenosina age como um neuro e gliotransmissor na retina sensorial, estando envolvida na sinalização bidirecional neurônio-glia (WURM et al., 2011).

6.3 INCHAÇO OSMÓTICO DE CÉLULAS DE MÜLLER E CÉLULAS BIPOLARES DA RETINA

A substituição de uma solução iso-osmolar por uma solução hipo-osmolar induziu um aumento significativo no tamanho do soma de células bipolares (Fig. 13b e 14b), enquanto que as células de Müller não alteraram seu volume osmótico com a redução da osmolaridade (Fig. 13a e 14a). De fato, as células de Müller, mas aparentemente não as células bipolares possuem mecanismos de regulação endógenos, os quais impedem o inchaço celular em condições hipo-osmóticas na retina normal (UCKERMANN et al., 2006; VOGLER et al., 2013).

Porém, em condições patológicas como isquemia retiniana e retinopatia diabética, a reduzida expressão de Kir4.1 e a alteração no padrão de distribuição deste canal, respectivamente (PANNICKE et al., 2004, 2006),

levam à diminuição da liberação de íons K^+ e à entrada de água na célula, resultando no inchaço das células de Müller em meio hipotônico.

Semelhantes alterações na homeostase do volume osmótico em condições hipotônicas podem ser alcançadas bloqueando-se a condutância de K^+ por íons bário (NEWMAN, 1989). Pannicke et al. (2004) mostrou uma significativa correlação entre o decréscimo das correntes de saída de K^+ e o grau de inchaço osmótico do soma de células gliais, quando estas são submetidas a um meio hipotônico contendo íons Ba^{2+} .

Como observado previamente (PANNICKE et al., 2004; WEUSTE et al., 2006; WURM et al., 2008), no presente estudo verificou-se que o inchaço osmótico de células de Müller em meio hipotônico pode ser igualmente gerado pela indução de isquemia-reperfusão retiniana (Fig. 15) ou pela pré-incubação/superfusão da retina em solução hipo-osmolar, contendo cloreto de bário (Fig. 13a). Assim, a incubação com cloreto de bário foi utilizada na maior parte das investigações deste trabalho e o número e animais operados pôde então ser reduzido ao mínimo.

6.4 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO INCHAÇO OSMÓTICO POR NGF

O acúmulo de água em neurônios e células gliais da retina resultante em inchaço celular contribui para o desenvolvimento de edema retiniano e degeneração neuronal (BRINGMANN *et al.*, 2005). No presente trabalho, mostramos que o NGF impede o inchaço osmótico de células de Müller e células bipolares em fatias de retina de rato em condições hipo-osmóticas (Fig. 13a, b). Por outro lado, o NGF foi apto para impedir o inchaço de células de Müller recém-isoladas, mas não de células bipolares isoladas (Fig. 14a, b). O NGF também reduziu o inchaço osmótico de células de Müller e células bipolares na retina pós-isquêmica (Fig. 15a, b). No entanto, o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retinas pós-isquêmicas (Fig. 15b) foi menor do que o efeito observado em fatias de retinas controle (Figs. 13b, 18b).

Estes dados podem sugerir que (1) as células de Müller, mas não células bipolares, expressam os receptores de NGF, os quais estão acoplados a

mecanismos de sinalização intracelular reguladores de volume celular; (2) O NGF induz a liberação de fatores solúveis por células de Müller que, por sua vez, inibem o inchaço de células bipolares em fatias de retina; (3) Há uma diminuição da eficiência do controle do volume de células bipolares induzido por NGF na retina isquêmica. As razões para tal decréscimo não são claras e podem incluir a perda de resposta das células bipolares para as citocinas derivadas da glia. Embora os níveis de bFGF das células de Müller aumentem na retina pós-isquêmica (YAFAI et al., 2013), as alterações na liberação de citocinas induzida por NGF pelas células de Müller, também devem ser levadas em consideração.

O efeito inibitório do NGF sob o inchaço osmótico da célula de Müller foi mediado pela ativação de TrkA, mas não por p75^{NTR} (Fig. 16). Uma vez que, células bipolares isoladas exibiram imunoreatividade para TrkA (Fig. 9c) e o NGF não inibiu o inchaço osmótico do soma destas células (Fig. 14b), é possível que TrkA esteja acoplado a mecanismos de sinalização intracelular reguladores de volume em células de Müller, mas não em células bipolares. Pelo menos cinco isoformas do receptor TrkA já foram identificadas, a saber, TrkA I, TrkA II, TrkA III, TrkA L0 e TrkA L1 (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008). Contudo, diferentemente das pesquisas relacionadas às isoformas alternativas de TrkB e TrkC (POLLOCK et al., 2003; BAI et al., 2010b), pouco se conhece sobre a expressão das isoformas variantes de TrkA na retina. Um estudo mais aprofundado poderia esclarecer se a diferença de efeito do NGF entre células de Müller e células bipolares da retina estaria relacionada com a expressão diferencial das isoformas alternativas do receptor TrkA nos dois tipos celulares.

As células de Müller da retina de rato possuem uma cascata de sinalização endógena que medeia a homeostase do volume celular induzida por agonistas em condições hipo-osmóticas. Esta cascata de sinalização envolve a ativação autócrina/parácrina de receptores glutamatérgicos e purinérgicos (UCKERMANN et al., 2006, WURM et al., 2008). Os resultados deste estudo mostraram que o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células de Müller é mediado pela transativação de receptores metabotrópicos de glutamato, P2Y₁ e A₁ de adenosina (Fig. 17a, c). Esses efeitos são provavelmente mediados pela liberação de glutamato, ATP, e

adenosina endógenos por células de Müller, como previamente descrito para os efeitos inibitórios de outros ligantes de receptores sobre o inchaço osmótico (UCKERMANN *et al.* 2006; KALISCH *et al.*, 2006; WEUSTE *et al.*, 2006; WURM *et al.* 2008; KRÜGEL *et al.* 2010; NEUMANN *et al.*, 2010; LINNERTZ *et al.* 2011; WAHL *et al.* 2013).

O bloqueador LY341495 sozinho inibiu o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retina, bem como, não alterou o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço hipo-osmótico de células bipolares em fatias de retina (Fig. 17b). Estes resultados estão de acordo com um estudo recente, o qual mostrou que o inchaço hipo-osmótico do soma de células bipolares pode ser mediado pela indução da liberação de glutamato endógeno e subsequente ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (VOGLER *et al.*, 2013).

Além das células de Müller, os bloqueadores dos receptores P2Y₁ e A₁ anularam o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células bipolares em fatias retinianas (Fig. 17c, d). No entanto, como descrito recentemente, os agonistas dos receptores P2Y₁ e A₁ (ATP e adenosina, respectivamente) não bloqueiam o inchaço hipo-osmótico de células bipolares (VOGLER *et al.*, 2013), o que torna improvável que os agonistas de receptores purinérgicos derivados de células de Müller mediem o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células bipolares em fatias de retina. Estes dados reforçam a ideia de que o efeito inibidor do NGF em células bipolares é um efeito indireto mediado por fatores adicionais liberados pela célula de Müller.

O fator trófico bFGF pode representar um destes fatores, uma vez que, o bloqueador do receptor de bFGF, PD173074 impediu o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células de Müller e células bipolares em fatias de retina (Fig. 18a, b). O inibidor PD173074 também foi descrito como um bloqueador da atividade de receptores tirosino-cinases de VEGF (MOHAMMADI *et al.*, 1998). Entretanto, VEGF não bloqueia o inchaço hipo-osmótico de células bipolares (VOGLER *et al.*, 2013); então é pouco provável que VEGF derivado de células de Müller participe da inibição de inchaço de células bipolares induzida por NGF.

bFGF é um dos principais fatores neuroprotetores na retina (SIEVERS *et al.*, 1987; FAKTOROVICH *et al.*, 1992), e as células de Müller são conhecidas por produzir este fator (HARADA *et al.*, 2000, 2002; HAUCK *et al.*, 2006). Desta

forma, o bFGF exógeno também foi diretamente testado em células de Müller e células bipolares isoladas. Apesar de impedir completamente o inchaço osmótico de células de Müller (Fig. 19a), o bFGF inibiu somente cerca de 30% o inchaço osmótico de células bipolares isoladas (Fig. 19b), sugerindo que além de bFGF, outros fatores derivados de células de Müller podem mediar o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares em fatias de retina.

Em condições patológicas, para impedir a morte de fotorreceptores e neurônios retinianos, as células de Müller secretam vários fatores neurotróficos, fatores de crescimento e citocinas, os quais podem atuar sozinhos ou em combinação, promovendo a sobrevivência celular (GARCIA; VECINO, 2003; BRINGMANN *et al.*, 2009b). Para revelar quais fatores poderiam também inibir o inchaço osmótico do soma de células bipolares, várias citocinas foram testadas em fatias de retina. Observou-se que GDNF e TGF- β 1, quando simultaneamente administrados, reduziram a extensão do inchaço osmótico de células bipolares isoladas em dois terços (Fig. 20a). No entanto, devido ao fato de que ambas citocinas separadamente reduziram o inchaço osmótico do soma de células bipolares isoladas (Fig. 20b) a um grau menor do que aquele observado em fatias de retina (Fig. 20a), sugere-se que GDNF e TGF- β 1 inibem o inchaço de células bipolares por dois mecanismos, via efeitos diretos em células bipolares e via efeitos indiretos que podem envolver células de Müller. O efeito sinérgico de GDNF e TGF- β já foi demonstrado em outro tipo celular neuronal, onde o efeito neuroprotetor de GDNF requer a presença de TGF- β . Os dois fatores em combinação promovem a sobrevivência neuronal, enquanto que a administração dos mesmos separadamente não têm efeitos (PETERZIEL; UNSICKER; KRIEGLSTEIN, 2002).

Pesquisas anteriores mostraram que células de Müller são uma fonte de TGF- β 1 e que GDNF induz a expressão de bFGF nestas células (IKEDA *et al.*, 1998; HARADA *et al.*, 2003). No entanto, a coadministração de bFGF, GDNF e TGF- β 1 não inibe completamente o inchaço osmótico de células bipolares isoladas (Fig. 20b), sugerindo a probabilidade de que fatores adicionais derivados de células de Müller, não investigados no presente estudo, estão envolvidos na mediação do efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de célula bipolares. Logo, outros fatores liberados por células de Müller após

estimulação com NGF, aptos para inibir o inchaço osmótico de células bipolares, permanecem a ser determinados em experimentos futuros.

Além dos receptores de glutamato (EULER et al., 2014), outras proteínas podem ser diferencialmente expressas em células bipolares do cone e células bipolares dos bastonetes (FEIGENSPAN et al., 2004; CERVIA et al., 2012). Então, a possibilidade de que vários subtipos de células bipolares expressem diferentes tipos de receptores de citocinas também não pode ser descartada. Neste caso, a liberação de uma variedade de citocinas induzida por NGF em células de Müller poderia aumentar a eficiência do controle glial do volume da célula bipolar.

O inibidor do receptor A1 de adenosina (DPCPX) bloqueou completamente o efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico de células de Müller em fatias de retina (Fig. 17c). Por outro lado, DPCPX bloqueou somente em parte o efeito inibitório do bFGF sobre o inchaço osmótico de células de Müller isoladas (Fig. 19a). Isto sugere que a liberação de bFGF induzida por NGF em células de Müller ocorre corrente-abaxio à ativação autócrina/parácrina de receptores A1. Para provar esta suposição, testou-se se o efeito inibitório da adenosina sobre o inchaço osmótico de células de Müller seria bloqueado pela inibição do receptor de FGF. De fato, PD173074, impediu completamente o efeito inibitório da adenosina em células de Müller isoladas (Fig. 19c). Estes dados corroboram a hipótese de que o NGF induz em células de Müller a ativação da cascata de sinalização glutamatérgica-purinérgica de inibição de inchaço osmótico descrita previamente (UCKERMANN et al. 2006; WURM et al. 2008).

Pesquisas anteriores mostraram que a inibição do inchaço osmótico de células de Müller por agonistas é mediada pela abertura de canais de potássio e cloreto. O influxo de íon compensa o gradiente osmótico através da membrana da célula de Müller e então impede o inchaço celular em condições hipo-osmóticas (UCKERMANN et al., 2006). Os resultados deste estudo mostram que o efeito inibidor de inchaço osmótico do NGF e bFGF também foram dependentes da ativação de canais iônicos. Tanto clofílio quanto NPPB bloquearam o efeito de ambos os fatores sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller isoladas (Fig. 5a Apêndice 1; Fig. 21a). Logo, a abertura destes canais iônicos de maneira dependente de PKA, após a liberação de

bFGF induzida por adenosina e a subsequente ativação de receptores de FGF podem representar os passos finais da cascata de sinalização glutamatérgica-purinérgica em células de Müller. Porém, experimentos adicionais são necessários para determinar mais precisamente os mecanismos de sinalização agudos induzidos por NGF em célula de Müller.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dependendo de condições específicas, o NGF pode promover a sobrevivência neuronal na retina pela ativação de TrkA ou ser neurotóxico via ativação de p75^{NTR} (ALI *et al.* 2008; COASSIN *et al.* 2008; LEBRUN-JULIEN *et al.* 2009; BAI *et al.* 2010a). Algumas pesquisas sugerem que as propriedades neuroprotetoras do NGF fazem dele um candidato promissor para o tratamento de doenças retinianas degenerativas, tais como glaucoma e DMRI, e ainda via administração de colírios contendo NGF, para o tratamento de distúrbios cerebrais neurodegenerativos como doença de Alzheimer (LAMBIASE *et al.* 2011; BAGNIS *et al.* 2011). Entretanto, o NGF pode também ter efeitos danosos dependentes de TrkA na retina, como a promoção de neovascularização retiniana e coroidal, e proliferação de células de Müller (IKEDA; PURO, 1994; STEINLE; GRANGER, 2003; LIU *et al.* 2010).

Os presentes dados sugerem que o efeito neuroprotetor do NGF na retina é em parte mediado pela prevenção do inchaço citotóxico das células gliais e bipolares que contribui para degeneração neuronal em doenças isquêmicas e inflamatórias da retina (BRINGMANN *et al.* 2005). Permanece a ser determinado se o NGF pode ser útil para o tratamento de edema retiniano, a principal causa de deterioração visual.

A figura 22 reúne as vias de sinalização investigadas no presente estudo. Estas vias estão possivelmente envolvidas no efeito inibidor de inchaço osmótico do NGF – mediado pela liberação de citocinas – em células de Müller e células bipolares da retina, submetidas a meio hipotônico na presença de íons Ba²⁺ ou em retinas isquêmicas (na ausência de Ba²⁺).

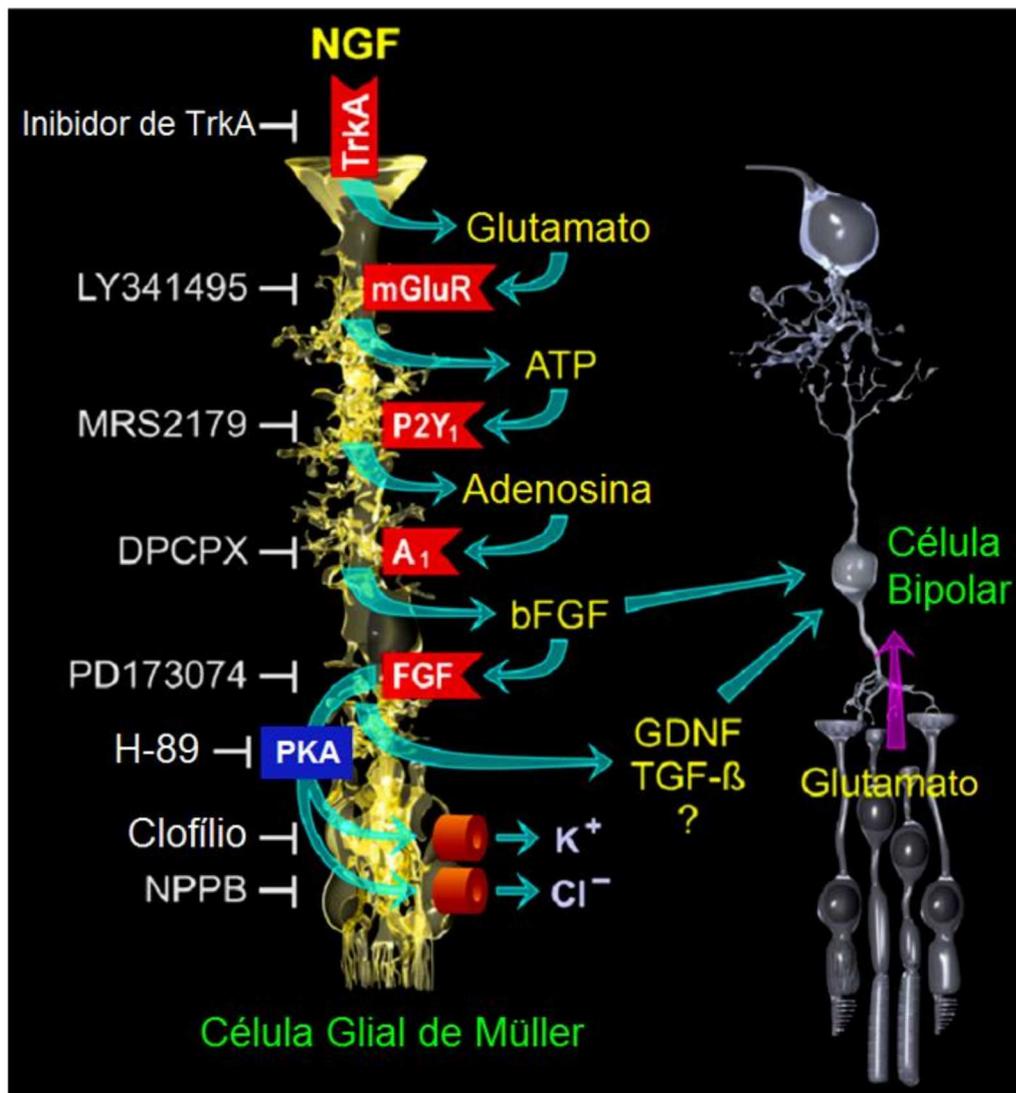


Figura 22. Esquema hipotético da via de sinalização induzida por NGF, envolvida na regulação de volume de células de Müller e células bipolares da retina de rato. O NGF após ligação à TrkA ativa uma cascata de sinalização glutamatérgica-purinérgica. Esta cascata consiste da liberação consecutiva de glutamato, ATP e adenosina, e a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), P2Y₁ e receptores de adenosina A₁, respectivamente. A ativação de receptores A₁ induz a liberação de bFGF por células de Müller, o qual ativa receptores de FGF, resultando na abertura de canais de potássio e cloreto na membrana de células de Müller. A saída de íons compensa o gradiente osmótico transmembrana e então impede o inchaço celular sob condições hipo-osmóticas. Citocinas como bFGF, GDNF e TGF-β, e possivelmente citocinas adicionais inibem o inchaço hipo-osmótico de células bipolares. Enquanto que em células de Müller, o glutamato inibe o inchaço osmótico, em células bipolares o mesmo pode induzir inchaço osmótico. O inchaço osmótico induzido por glutamato em células bipolares é impedido por citocinas derivadas de células de Müller. Diferentes passos da cascata de sinalização podem ser bloqueados por antagonistas (lado esquerdo), resultando em inchaço celular quando a osmolaridade extracelular diminui. Imagem elaborada pelo Prof. Dr. Andreas Bringmann do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Leipzig, Alemanha.

7 CONCLUSÃO

- O NGF é expresso na retina por células de Müller isoladas, mas não por células bipolares isoladas;
- Ambas as células de Müller e as células bipolares da retina expressam TrkA, mas somente o receptor glial está acoplado a mecanismos de sinalização intracelular reguladores de volume celular;
- O receptor $p75^{\text{NTR}}$ é expresso na retina por células de Müller isoladas, mas não por células bipolares isoladas;
- A retina de rato aumenta a liberação de adenosina quando exposta à hipo-osmolaridade, mas suprime esta liberação quando os canais de K^+ são bloqueados por íons bário.
- O NGF inibe o inchaço osmótico do soma de células de Müller e do soma de células bipolares em fatias de retina, de maneira dependente de concentração, em condições hipo-osmóticas quando canais de K^+ são bloqueados por íons bário;
- O NGF inibe o inchaço osmótico do soma de células de Müller isoladas, mas não de células bipolares isoladas, em condições hipo-osmóticas quando canais de K^+ são bloqueados por íons bário;
- O NGF inibe o inchaço osmótico do soma de células de Müller e, em menor extensão, o inchaço do soma de células bipolares em fatias de retina pós-isquêmica, em condições hipo-osmóticas.

- O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller ocorre por meio da ativação de receptores TrkA;
- O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares da retina ocorre por meio da ativação de uma cascata de sinalização glutamatérgica-purinérgica;
- O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller e células bipolares da retina ocorre por meio da liberação de bFGF e ativação de receptores FGF;
- A ativação de receptores A1 induz a liberação de bFGF na retina, o qual inibe completamente o inchaço osmótico do soma de células de Müller isoladas e parcialmente o inchaço de célula bipolares isoladas;
- O efeito inibitório do NGF sobre o inchaço osmótico do soma de células bipolares é um efeito indireto, mediado pela indução da liberação de citocinas, possivelmente bFGF, GDNF e TGF- β 1 por células de Müller;
- O efeito inibitório bFGF sobre o inchaço osmótico do soma de células de Müller isoladas da retina é dependente da abertura de canais de Cl^- e canais de K^+ , possivelmente mediada por PKA;
- O efeito protetor do NGF na retina é em parte mediado pela prevenção de inchaço citotóxico de células gliais e bipolares.

8 REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H.; TOMI, M.; KIYOKAWA, J.; HORI, S.; KONDO, T.; TERASAKI, T.; HOSOYA, K. Modulation of retinal capillary endothelial cells by Müller glial cell-derived factors. **Mol Vis.** **15**:451-457.2009.

AGARWAL, N.; AGARWAL, R.; KUMAR, D.M.; ONDRICEK, A.; CLARK, A.F.; WORDINGER, R.J.; PANG, I. Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells. **Mol Vision.** **13**: 1311-8. 2007.

AHMAD, I.; DOOLEY, C.M.; AFIAT, S. Involvement of Mash1 in EGF-Mediated Regulation of Differentiation in the Vertebrate Retina. **Dev Biol.** **194**:86-98.1998.

AIRAKSINEN, M.S.; SAARMA, M. THE GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci.** **3**:383-394.2002

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula.** 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALI, T.K.; MATRAGOON, S.; PILLAI, B.A.; LIOU, G.I.; EL-REMESSY, A.B. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. **Diabetes.** **57**:889-898. 2008.

ALLEN, S.J.; WATSON, J.J.; SHOEMARK, D.K.; BARUA, N.U.; PATEL, N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. **Pharmacol Therapeutics** **138**:155-175.2013.

ALLINGTON, C.; SHAMOVSKY, I.L.; ROSS, G.M.; RIOPELLE, R.J. Zinc inhibits p75^{NTR}-mediated apoptosis in chick neural retina. **Cell Death Differ.** **8**:451-456. 2001.

ANCHAN, R.M.; REH, T.A.; ANGELLO, J.; BALLIET, A.; WALKER, M. EGF and TGF α stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. **Neuron** **6**:923-936.1991.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes Dev.** **22**:1276-1312.2008.

BAGNIS, A.; PAPADIA, M.; SCOTTO, R.; TRAVERSO, C.E. Current and emerging medical therapies in the treatment of glaucoma. **Expert Opin Emerg Drugs** **16**:293-307.2011.

BAI, Y.; DERGHAM, P.; NEDEV, H.; XU, J.; GALAN, A.; RIVERA, J.C.; ZHIHUA, S.; MEHTA, H.M.; WOO, S.B.; SARUNIC, M.V.; NEET, K.E.; SARAGOVI, H.U. Chronic and acute models of retinal neurodegeneration TrkA activity are neuroprotective whereas p75^{NTR} activity is neurotoxic through a paracrine mechanism. **J Biol Chem.** **285**:39392-39400. 2010a.

BAI, Y.; SHI, Z.; ZHUO, Y.; et al. In Glaucoma the Upregulated Truncated TrkC.T1 Receptor Isoform in Glia Causes Increased TNF- α Production, Leading to Retinal Ganglion Cell Death. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **51**:6639-51.2010b.

BELECKY-ADAMS, T.L.; CHERNOFF, E.C.; WILSON, J.M.; DHARMARAJAN, S. **Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors.** 2013.

BOECK, M DIJKE, P.T. Key role for ubiquitin protein modification in TGF β signal transduction. **Upsala Journal of Medical Sciences.** **117**:153-165.2012.

BRAUNGER, B.M.; PIELMEIER, S.; DEMMER, C.; et al. TGF-Signaling Protects Retinal Neurons from Programmed Cell Death during the Development of the Mammalian Eye. **J Neurosci.** **33**:14246-58.2013.

BRESNICK, G.H. Diabetic maculopathy. A critical review highlighting diffuse macular edema. **Ophthalmology** **90**:1301-17.1983.

BRINGMANN, A.; GROSCHE, A.; PANNICKE, T.; REICHENBACH, A. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. **FENDO.** **4**:1-14.2013.

BRINGMANN, A.; IANDIEV, I.; PANNICKE, T.; WURM, A.; HOLLBORN, M.; WIEDEMANN, P.; OSBORNE, N.O.; REICHENBACH, A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. **Prog Retin Eye Res.** **28**:423-451.2009b.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M, IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J; REICHENBACH, A. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. **Neurochem Int.** **54**:143-160. 2009a.

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

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

BRINGMANN, A; UCKERMANN, O; PANNICKE, T; IANDIEV, I; REICHENBACH, A; WIEDEMANN, P. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand.* **83**:528-538. 2005.

BRÜCKNER, E.; GROSCHE, A.; PANNICKE, T.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Mechanisms of VEGF- and glutamate-induced inhibition of osmotic swelling of murine retinal glial (Müller) cells: indications for the involvement of vesicular glutamate release and connexin-mediated ATP release. *Neurochem Res.* **37**:268-78. 2012.

CAO, G.F.; LIU, Y.; YANG, W.; WAN, J.; YAO, J.; WAN, Y.; JIANG, Q. Rapamycin sensitive mTOR activation mediates nerve growth factor (NGF) induced cell migration and pro-survival effects against hydrogen peroxide in retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Co.* **414**:499-505. 2011.

CARMIGNOTO, G.; MAFFEI, L.; CANDEO, P.; CANELLA, R.; COMELLI, C. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci.* **9**:1263-1272. 1989.

CERVIA, D.; CATALANI, E.; MONTE, M.D.; CASINI, G. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin. *J Neurochem.* **120**: 818–829.2012.

CHAKRABARTI, S.; SIMA, A.A.; LEE, J.; BRACHET, P.; DICOU, E. Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.* **523**:11–15.1990.

CHANG, Z-Y.; YEH, M-K.; CHIANG, C-H.; CHEN, Y-H.; LU, D-W. Erythropoietin Protects Adult Retinal Ganglion Cells against NMDA-, Trophic Factor Withdrawal-, and TNF-a-Induced Damage. *PLoS One.* **8**:e55291. 2013.

CHAUM, E. Retinal Neuroprotection by Growth Factors: A Mechanistic Perspective. *J Cell Biochem.* **88**:57-75.2003.

CHONG, N.H.; ALEXANDER, R.A.; WATERS, L.; BARNETT, K.C.; BIRD, A.C.; LUTHERT, P.J. Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **40**:1298–1305. 1999.

CLOSE, J.L.; GUMUSCU, B.; REH, T.A. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Muller glia in the rat retina via TGF beta signaling. **Development.** **132**:3015-26.2005.

COASSIN, M.; LAMBIASE, A.; SPOSATO, V.; MICERA, A.; BONINI, S.; ALOE, L. Retinal p75 and bax overexpression is associated with retinal ganglion cells apoptosis in a rat model of glaucoma. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** **246**:1743-1749. 2008.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A nerve growth stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. **Proc Natl Acad Sci USA.** **40**:1014-18. 1954.

COLAFRANCESCO, V.; COASSIN, M.; ROSSI, S.; ALOE, L. Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration. **Ann Ist Super Sanità.** **47**:284-289.2011b.

COLAFRANCESCO, V.; PARISI, V.; SPOSATO, V.; ROSSI, S.; RUSSO, M.A.; COASSIN, M.; LAMBIASE, A.; ALOE, L. Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. **J Glaucoma.** **20**:100-108. 2011a.

COSCAS, G.; CUNHA-VAZ, J.; SOUBRANE, G. Macular Edema: Definition and Basic Concepts. **Dev Ophthalmol.** **47**:1-9. 2010.

CUENCA, N.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L.; CAMPELLO, L.; MANEU, V.; DE LA VILLA, P.; LAX, P.; PINILLA, I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. **Progress in Retinal and Eye Research** **43**:17-75.2014.

CUI, Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. **Mol Neurobiol.** **33**:155–179. 2006.

DAI, M.; XIA, X-B.; XIONG, S-Q. BDNF Regulates GLAST and Glutamine Synthetase in Mouse Retinal Müller Cells. **J Cell Physiol.** **227**:596–603. 2012.

DARBY, M.; KUZMISKI, J.B.; PANENKA, W.; FEIGNA, D.; MACVICAR, B.A. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. **J Neurophysiol.** **89**:1870-77.2003.

DEFOE, D.M.; GRINDSTAFF, R.D. Epidermal growth factor stimulation of RPE cell survival: contribution of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen activated protein kinase pathways. **Exp Eye Res.** **79**:51-9.2004.

DELYFER, M.; SIMONUTTI, M.; NEVEUX, N.; LÉVEILLARD, T.; SAHEL, J. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? **Mol Vision.** **11**:677–87. 2005.

DI POLO, A.; AIGNER, L.J.; DUNN, R.J.; BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adeno-virus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** **95**: 3978–3983. 1998.

DMITRIEV, A.V.; GOVARDOVSKII, V.I.; SCHWAHN, H.N.; STEINBERG R.H. Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. **Vis. Neurosci.** **16**:1157-67.1999.

DONOVAN, S.L.; DYER, M.A. Regulation of proliferation during central nervous system development. **Sem Cell DevBiol.** **16**:407-421. 2005.

DOWLING, J.E. Organization of vertebrate retinas. **Invest Ophthalmol.** **9**:655–680. 1970

EGGERS, E.D.; LUKASIEWICZ, P.D. Multiple pathways of inhibition shape bipolar cell responses in the retina. **Vis Neurosci.** **28**:95–108. 2011.

ERSKINE, L; HERRERA, E. Connecting the Retina to the Brain. **ASN Neuro.** *In Press.* 2014.

EULER, T.; HAVERKAMP, S.; SCHUBERT, T.; BADEN, T. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. **Nat. Rev. Neurosci.** **15**:507-519.2014.

FAKTOROVICH, E.G.; STEINBERG, R.H.; YASUMURA, D.; MATTHES, M.T.; LaVAIL, MM. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. **J Neurosci.** **12**:3554-3567. 1992.

FAKTOROVICH, E.G.; STEINBERG, R.H.; YASUMURA, D.; MATTHES, M.T.; LaVAIL, M.M. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. **Nature**. **347**:83–86. 1990.

FEIGENSPAN, A.; JANSSEN-BIENHOLD, U.; HORMUZDI, S.; et al. Expression of Connexin36 in Cone Pedicles and OFF-Cone Bipolar Cells of the Mouse Retina. **J Neurosci**. **24**:3325-34.2004.

FLOWER, R.W.; PATZ, A. The effect of hyperbaric oxygenation on retinal ischemia. **Invest Ophthalmol**. **10**:605-616.1971.

FOXTON, R.H.; FINKELSTEIN, A.; VIJAY, S.; DAHLMANN-NOOR, A.; KHAW, P.T.; MORGAN, J.E.; SHIMA, D.T.; NG, Y-S. VEGF-A Is Necessary and Sufficient for Retinal Neuroprotection in Models of Experimental Glaucoma. **Am J Pathol**. **182**:1379-90.2013.

FRASSON, M.; PICAUD, S.; LEVEILLARD, T. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. **40**:2724-2734.1999.

FRASSON, M.; PICAUD, S.; LEVEILLARD, T.; SIMONUTTI, M.; MOHAND-SAID, S.; DREYFUS, H.; HICKS, D.; SAHEL, J. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. **40**:2724–2734. 1999.

FREUND-MICHEL, V.; FROSSARD, N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. **Pharmacol Therapeut**. **117**:52–76. 2008.

FRIES, J. Growth Factors and Cytokines Review. **BioFiles**.2009.

FRUTTIGER, M.; CALVER, A.R.; KRÜGER, W.H.; et al. PDGF Mediates a Neuron–Astrocyte Interaction in the Developing Retina. **Neuron** **17**:1117-31.1996.

FUNA, K.; SASAHARA, M. The roles of PDGF in Development and During Neurogenesis in the Normal and Diseased Nervous System. **J Neuroimmune Pharmacol**. **9**:168-181.2014.

GABRIEL, R.; LESAUTER, J.; SILVER, R.; GARCIA-ESPANA, A.; WITKOVSKY, P. Diurnal and circadian variation of protein kinase C immunoreactivity in the rat retina. **J Comp Neurol**. **439**:140-150.2001.

GARCIA, M.; VECINO, E. Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. **Histol Histopathol.** **18**:1205-18.2003.

GARCIA, J.H.; LIU, K.F.; YOSHIDA, Y.; CHEN, S.; LIAN, J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). **Am J Pathol** **145**:728-40. 1994.

GELLER S.F.; LEWIS G.P.; FISHER, S.K. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Müller and RPE cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **42**: 1363-1369.2001.

GIARDINO, I.; FARD, A.K.; HATCHELL, D.L.; BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes.** **47**:1114-1120. 1998.

GOLDSTEIN, L.; KOOMOA, D.L.; MUSCH, M.W. ATP release from hypotonically stressed skate RBC: potential role in osmolyte channel regulation. **J Exp Zool.** **296**: 160-163.2003.

GORDON-THOMSON, C.; DE IONGH, RU.; HALES, A.M.; CHAMBERLAIN, C.G.; MCAVOY, J.W.; Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **39**:1399-1409.1998.

GUÉRIN, C.J.; HU, L.; SCICLI, G.; SCICLI, A.G. Transforming growth factor beta in experimentally detached retina and periretinal membranes. **Exp Eye Res.** **73**:753-764.2001.

HAMMES, H.P.; FEDEROFF, H.J.; BROWNLEE, M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. **Mol Med.** **1**:527-534. 1995.

HARADA, C.; HARADA, T.; QUAH, H.M.; MAEKAWA, F.; YOSHIDA, K.; OHNO, S.; WADA, K.; PARADA, L.F.; TANAKA, K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. **Neuroscience.** **122**:229-235. 2003.

HARADA, T.; HARADA, C.; KOHSAKA, S.; WADA, E.; YOSHIDA, K.; OHNO, S.; MAMADA, H.; TANAKA, K. PARADA, L.F.; WADA, K. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. **J Neurosci.** **22**:9228-9236. 2002.

HARADA, T.; HARADA, C.; NAKAYAMA, N.; OKUYAMA, S.; YOSHIDA, K.; KOHSAKA, S.; MATSUDA, H.; WADA, K. Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. **Neuron**. **26**:533-541. 2000.

HASKEW-LAYTON, R.E.; RUDKOUSKAYA, A.; JIN, Y.; FEUSTEL, P.J.; KIMELBERG, H.K.; MONGIN, A.A. Two distinct modes of hypoosmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. **PLoS ONE** **3**:e354.2008.

HAUCK, S.M.; KINKL, N.; DEEG, C.A.; SWIATEK-DE LANGE, M.; SCHOFFMANN, S.; UEFFING, M. GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. **Mol Cell Biol**. **26**:2746-57.2006.

HELDIN, C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. **Cell Communication and Signaling** **11**:97.2013.

HELMSTAEDTER, M.; BRIGGMAN, K.L.; TURAGA, S.C.; JAIN, V.; SEUNG, H.S.; DENK, W. Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. **Nature**. **500**:168-174.2013.

HIRRLINGER, P.G.; WURM, A.; HIRRLINGER, J.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. Osmotic swelling characteristics of glial cells in the murine hippocampus, cerebellum, and retina in situ. **J Neurochem**. **105**:1405-17.2008.

HOFFMANN, E.K.; LAMBERT, I.H.; PEDERSEN, S.F. Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. **Physiol Rev**. **89**:193-277.2009.

HOLLBORN, M.; TENCKHOFF, S.; JAHN, K.; IANDIEV, I.; BIEDERMANN, B.; SCHNURRBUSCH, U.E.; LIMB, G.A.; REICHENBACH, A.; WOLF, S.; WIEDEMANN, P.; et al. Changes in retinal gene expression in proliferative vitreoretinopathy: glial cell expression of HB-EGF. **Mol Vis**. **11**:397-413.2005.

HOSOYA, K-I.; TOMI, M. Advances in the Cell Biology of Transport via the Inner Blood-Retinal Barrier: Establishment of Cell Lines and Transport Functions. **Biol. Pharm. Bull**. **28**:1-8.2005.

HU, B.; YIP, H.K.; SO, K.F. Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. **Glia** **24**:187-197.1998.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Trk receptors: roles in signal transduction. **Annu Rev Biochem.** **72**:609–642. 2003.

IKEDA, T.; HOMMA, Y.; NISIDA, K.; HIRASE, K.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; PURO, D.G. Expression of transforming growth factor- β s and their receptors by human retinal glial cells. **Curr Eye Res.** **17**:546-550.1998.

IKEDA, T.; PURO, D.G. Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. **Brain Res.** **649**:260-264. 1994.

JOHNSON, T.V.; DEKORVER, N.W.; LEVASSEUR, V.A.; et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. **Brain** **137**:503–519.2014.

JOO, F.; KLATZO, I. Role of cerebral endothelium in brain oedema. **Neurol Res.** **1**:67-75. 1989.

KAHLE, K.T.; SIMARD, J.M.; STALEY, K.J.; NAHED, B.V.; JONES, P.S.; SUN, D. Molecular Mechanisms of Ischemic Cerebral Edema: Role of Electroneutral Ion Transport. **Physiology.** **24**: 257–265. 2009.

KALISCH, F.; WURM, A.; IANDIEV, I.; UCKERMANN, O.; DILSIZ, N.; REICHENBACH, A.; WIEDEMANN, P.; BRINGMANN, A. Atrial natriuretic peptide inhibits osmotical glial cell swelling in the ischemic rat retina: dependence on glutamatergic-purinergic signaling. **Exp Eye Res.** **83**:962-971. 2006.

KARL, M.O.; HAYES, S.; NELSON, B.R.; TAN, K.; BUCKINGHAM, B.; REH, T.A. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. **PNAS.** **105**: 19508-13.2008.

KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; YONG, Z.; LU, J.; FOULDS, W.S.; LING, E.A. Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. **J Pathol.** **212**:429-439. 2007.

KERRISON, J.B.; LEWIS, R.N.; OTTESON, D.C.; ZACK, D.J. Bone morpho-genetic proteins promote neurite outgrowth in retinal ganglion cells. **Mol Vis.** **11**:208–215.2005.

KIMELBERG, H.K. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. **Glia** **50**:389-97. 2005.

KIRSCH, M.; LEE, M.Y.; MEYER, V.; WIESE, A.; HOFMANN, H.D. Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. **J Neurochem.** **68**:979–990. 1997.

KLATZO, I. Pathophysiological aspects of brain edema. **Acta Neuropathol.** **72**:236-239. 1987.

KOEBERLE, P.D.; BÄHR, M. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. **Cell Death and Differentiation.** **15**:471-483.2008.

KOEBERLE, P.D.; BALL, A.K. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience** **110**:555-567.2002.

KOFUJI, P.; CELEN, P.; ZAHS, K.R.; SURBECK, L.W.; LESTER, H.A.; NEWMAN, E.A. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. **J Neurosci** **20**:5733-5740. 2000.

KOKONA, D.; CHARALAMPOPOULOS, I.; PEDIADITAKIS, I.; GRAVANIS, A.; THERMOS, K. The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. **Neuropharmacol.** **62**:2106-2117. 2012.

KRÜGEL, K.; WURM, A.; LINNERTZ, R.; PANNICKE, T.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Erythropoietin inhibits osmotic swelling of retinal glial cells by Janus kinase and extracellular signal-regulated kinases1/2-mediated release of vascular endothelial growth factor. **Neuroscience.** **165**:1147-1158. 2010.

KRÜGEL, K.; WURM, A.; PANNICKE, T.; HOLLBORN, M.; KARL, A.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; KOHEN, L.; BRINGMANN, A. Involvement of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the osmotic swelling of retinal glial cells from diabetic rats. **Exp Eye Res.** **92**: 87-93. 2011.

KUBICZKOVA, L.; SEDLARIKOVA, L.; HAJEK, R.; SEVCIKOVA, S. TGF- β —an excellent servant but a bad master. **J Translational Medicine** **10**:183.2012.

KUBO, Y.; HOSOYA, K-I. (2012). Inner Blood-Retinal Barrier Transporters: Relevance to Diabetic Retinopathy, Diabetic Retinopathy, Dr. Mohammad Shamsul Ola (Ed.), ISBN: 978-953-51-0044-7.

KUMAR, B.; GUPTA, S.K.; SRINIVASAN, B.P.; NAG, T.C.; SRIVASTAVA, S.; SAXENA, R.; JHA, K.A. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. **Microvasc Res.** **87**:65-74. 2013.

LAMBIASE, A.; COASSIN, M.; TIRASSA, P.; MANTELLI, F.; ALOE, L. Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. **Ann Ist Super Sanità.** **45**:439-442.2009.

LAMBIASE, A.; MANTELLI, F.; SACCHETTI, M.; ROSSI, S.; ALOE, L.; BONINI, S. Clinical applications of NGF in ocular diseases. **Arch Ital Biol.** **149**:283-292.2011.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, D. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. **Physiol Rev.** **78**: 247-306. 1998.

LaVAIL, M.M.; UNOKI, K.; YASUMURA, D.; MATTHES, M.T.; YANCOPOULOS, G.D.; STEINBERG, R.H. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**:11249–11253. 1992.

LEBRUN-JULIEN, F.; MORQUETTE, B.; DOUILLETTE, A.; SARAGOVI, H.U.; DI POLO, A. Inhibition of p75^{NTR} in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. **Mol Cell Neurosci.** **40**:410-420. 2009.

LEIBINGER, M.; MÜLLER, A.; GOBRECHT, P.; DIEKMANN, H.; ANDREADAKI, A.; FISCHER, D. Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. **Cell Death Dis.** **4**:e609. 2013.

LENZI, L.; COASSIN, M.; LAMBIASE, A.; BONINI, S.; AMENDOLA, T.; ALOE, L. Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. **Vis Res.** **45**:1491-1500. 2005.

LESCHEY, K.H.; HACKETT, S.F.; SINGER, J.H.; CAMPOCHIARO, P.A. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **31**:839-46.1990.

LEVI-MONTALCINI, R. Developmental Neurobiology and the Natural History of Nerve Growth Factor. **Ann Rev Neurosci.** **5:** 341-62. 1982.

LEVI-MONTALCINI, R.; SKAPER, S.D.; TOSO, R.D.; PETRELLI, L.; LEON, A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. **Trends Neurosci.** **19:**514–520. 1996.

LI, Y.; TAO, W.; LUO, L.; HUANG, D.; KAUPER, K.; STABILA, P.; LaVAIL, M.M.; LATIES, A.M.; WEN, R. CNTF Induces Regeneration of Cone Outer Segments in a Rat Model of Retinal Degeneration. **PLoS One.** **5:**e9495. 2010.

LIANG, C-M.; TAI, M-C.; CHANG, Y-H.; CHEN, Y-H.; CHEN, C-L.; CHIEN, M-W.; CHEN, J-T. Glucosamine inhibits epidermal growth factor-induced proliferation and cell-cycle progression in retinal pigment epithelial cells. **Mol Vision** **16:**2559-71.2010.

LIANG, D.; BHATTA, S.; GERZANICH, V.; SIMARD, J.M. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. **Neurosurg Focus.** **22:**1-16.2009.

LILJEKVIST-SOLTIC, I.; OLOFSSON, J.; JOHANSSON, K. Progenitor cell-derived factors enhance photoreceptor survival in rat retinal explants. **Brain Res.** **1227:**226-233. 2008.

LILLIEN, L. Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor. **Nature** **377:**158-162.1995.

LIN, L.F.; DOHERTY, D.H.; LILE, J.D.; BEKTESH, S.; COLLINS, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurones. **Science** **260:**1130-1132.1993.

LINNERTZ, R.; WURM, A.; PANNICKE, T.; KRÜGEL, K.; HOLLBORN, M.; HÄRTIG, W.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Activation of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels is required for vesicular release of glutamate from retinal glial cells implicated in cell volume regulation. **Neuroscience.** **188:**23-34. 2011.

LIU, C.; PENG, M.; LATIES, A.M.; WEN, R. Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. **J Neurosci.** **18:**1337-44.1998.

LIU, X.; WANG, D.; LIU, Y.; LUO, Y.; MA, W.; XIAO, W; YU, Q. Neuronal-driven angiogenesis: role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **51:**3749-3757. 2010.

LORD, R.C.C. Osmosis, osmometry, and osmoregulation. **Postgrad Med J.** **75**:67-73.1999.

LU, X.; KANG, Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. **British Journal of Cancer** **102**:457-461.2010.

MANSOUR-ROBAEY, S.; CLARKE, D.B.; WANG, Y.C.; BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** **91**:1632-1636. 1994.

MARMAROU, A.; SIGNORETTI, S.; AYGOK, G.; FATOUROS, P.; PORTELLA, G. Traumatic brain edema in diffuse and focal injury: cellular or vasogenic? **Acta Neurochir.** **96**:24-9. 2006.

MARMAROU, A. The pathophysiology of brain edema and elevated intracranial pressure. **Cleve Clin J Med.** **71**:S6-S8.2004.

MASLAND, R.H. Cell Populations of the Retina: The Proctor Lecture. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **52**:4581-91.2011.

MASLAND, R.H. The Neuronal Organization of the Retina. **Neuron** **76**:266-280. 2012.

MATTSON, M.P.; LOVELL, M.A.; FURUKAWA, K.; MARKESBERY, W.R. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. **J Neurochem.** **65**:1740-1751. 1995.

MICERA, A.; LAMBIASE, A.; ALOE, L.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFERD, F.; BONINI, S. Nerve growth factor involvement in the visual system: implications in allergic and neurodegenerative diseases. **Cytokine Growth Factor Rev.** **15**:411-417. 2004.

MILENKOVIC, I.; WEICK, M.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **44**:1211-20.2003.

MOHAMMADI, M.; FROUM, S.; HAMBY, J.M.; SCHROEDER, M.C.; PANEK, R.L.; LU, G.H.; ELISEENKOVA, A.V.; GREEN, D.; SCHLESSINGER, J.; HUBBARD, S.R. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. **EMBO J.** **17**:5896-5904.1998.

MOON, S.W.; CHUNG, E.J.; JUNG, S-A.; LEE, J.H. PDGF stimulation of Müller cell proliferation: Contributions of c-JNK and the PI3K/Akt pathway. **Biochem Bioph Res Co.** **388**:167–171. 2009.

MOON, S.W.; CHUNG, J.E.; JUNG, S-A.; LEE, J.H. PDGF stimulation of Müller cell proliferation: Contributions of c-JNK and the PI3K/Akt pathway. **Biochem Biophys Res Comm** **388**:167-171.2009.

MORILLO, S.M.; ESCOLL, P.; de la HERA, A.; FRADE, J.M. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. **PNAS.** **107**:109-114. 2010.

NAKAMURA, K.; HARADA, C.; OKUMURA, A.; NAMEKATA, K.; MITAMURA, Y.; YOSHIDA, K.; OHNO, S.; YOSHIDA, H.; HARADA, T. Effect of p75^{NTR} on the regulation of photoreceptor apoptosis in the *rd* mouse. **Mol Vis.** **11**:1229-1235. 2005.
NEGISHI, K.; KATO, S.; TERANISHI, T. Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. **Neurosci Lett.** **94**: 247-252.1988.

NEUMANN, F.; WURM, A.; LINNERTZ, R.; PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Sex steroids inhibit osmotic swelling of retinal glial cells. **Neurochem Res.** **5**:522-530. 2010.

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

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

NEWMAN, E.A. Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. **J Neurosci.** **25**:5502–5510. 2005.

NEWMAN, E.A. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. **Glia** **47**:268–274. 2004b.

NEWMAN, E.A. Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. **Brain Res.** **498**:308–314. 1989.

NEWMAN, E.A. Propagation of Intercellular Calcium Waves in Retinal Astrocytes and Müller Cells. **J Neurosci.** **21**:2215-23.2001.

O'DRISCOLL, C.; O'CONNOR, J.; O'BRIEN, C.J.; COTTER, T.G. Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. **J Neurochem.** **105**:524-536.2008.

OGILVIE, J.M.; SPECK, J.D.; LETT, J.M. Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture. **Exp Neurol.** **161**:676-685. 2000.

OKADA, Y.; MAENO, E.; SHIMIZU, T.; DEZAKI, K.; WANG, J.; MORISHIMA, S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). **J Physiol.** **532.1**: 3–16. 2001.

OLLIVIER, H.; PICHAVANT-RAFINI, K.; PULL-STEPHAN, E.; CALVÈS, P.; NONNOTTE, L.; NONNOTTE, G. Effects of hypo-osmotic stress on ATP release in isolated turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes. **Biol Cell** **98**:427-437.2006.

OSHITARI, T.; YOSHIDA-HATA, N.; YAMAMOTO, S. Effect of neurotrophin-4 on endoplasmic reticulum stress-related neuronal apoptosis in diabetic and high glucose exposed rat retinas. **Neurosci Lett.** **501**: 102–106. 2011.

OSHITARI, T.; YOSHIDA-HATA, N.; YAMAMOTO, S. Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high glucose. **Brain Res.** **1346**:43-51. 2010.

PAN, Z.; PEREZ-POLO, R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. **J Neurochem.** **61**:1713-1721. 1993.

PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; UCKERMANN, O.; BIEDERMANN, B.; KUTZERA, F.; WIEDEMANN, P.; WOLBURG, H.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. **Mol Cell Neurosci.** **26**:493-502. 2004.

PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; WURM, A.; UCKERMANN, O.; vom HAGEN, F.; REICHENBACH, A.; WIEDEMANN, P.; HAMMES, H-P.; BRINGMANN, A. Diabetes

alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. **Diabetes** **55**:633-639. 2006.

PANNICKE, T.; UCKERMANN, O.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Müller glial cells. **J Neuroimmunol.** **161**:145-154. 2005.

PARRILLA-REVERTER, G.; AGUDO, M.; SOBRADO-CALVO, P.; SALINAS-NAVARRO, M.; VILLEGAS-PÉREZ, M.P.; VIDAL-SANZ, M. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: A quantitative in vivo study. **Exp Eye Res.** **89**:32–41. 2009.

PEDERSEN, S.F.; KAPUS, A.; HOFFMANN, E.K. Osmosensory Mechanisms in Cellular and Systemic Volume Regulation. **J Am Soc Nephrol.** **22**:1587-97. 2011.

PETERZIEL, H.; UNSICKER, K.; KRIEGLSTEIN, K. TGF α induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFR α 1 to the plasma membrane. **J Cell Biol.** **159**:157-167.2002.

POLITI, L.E.; ROTSTEIN, N.P.; CARRI, N.G. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **42**:3008-15.2001.

POLLOCK, G.S.; ROBICHON, R.; BOYD, K.A.; et al. TrkB Receptor Signaling Regulates Developmental Death Dynamics, But Not Final Number, of Retinal Ganglion Cells. **J Neurosci.** **23**:10137-45.2003.

POW, D.V. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. **Glia.** **34**:27–38. 2001.

RAJU, R.; PALAPETTA, S.M.; SANDHYA, V.K. A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. **J Signal Transduction.** **2014**:1-16.2014.

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

REICHARDT, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Phil Trans R Soc. B.** **361**:1545–1564. 2006.

REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. New Functions of Müller Cells. **GLIA**. **61**:651–678. 2013.

RONGO C. Epidermal growth factor and aging: A signaling molecule reveals a new eye opening function. **AGING** **3**:896-905.2011.

ROTHOVA, A.; SUTTORP-VAN SCHULTEN, M.S.; FRITS TREFFERS, W.; KIJLSTRA, A. Causes and frequency of blindness in patients with intraocular inflammatory disease. **Br. J. Ophthalmol.** **80**:332-336.1996.

ROTSOS. T.G.; MOSCHOS, M.M. Cystoid macular edema. **Clinical Ophthalmol.** **2**:919-930.2008.

ROUX, P.P.; BARKER, P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. **Prog Neurobiol.** **67**:203–233. 2002.

RUIZ-EDERRA, J.; HITCHCOCK, P.F.; VECINO, E. Two classes of astrocytes in the adult human and pig retina in terms of their expression of high affinity NGF receptor (TrkA). **Neurosci Lett.** **337**:127–130. 2003.

SAKAI, T.; KUNO, N.; TAKAMATSU, F.; KIMURA, E.; KOHNO, H.; OKANO, K.; KITAHARA, K. Prolonged Protective Effect of Basic Fibroblast Growth Factor–Impregnated Nanoparticles in Royal College of Surgeons Rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **48**:3381-87.2007.

SAMPATH, D.; JACKSON, G.R.; WERRBACH-PEREZ, K.; PEREZ-POLO, J.R. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. **J Neurochem.** **62**:2476-2479. 1994.

SANDOW, S.L.; HEYDON, K.; WEIBLE II, M.W.; REYNOLDS, A.J.; BARTLETT, S.E.; HENDRY, I.A. Signalling organelle for retrograde axonal transport of internalized neurotrophins from the nerve terminal. **Immunology and Cell Biology.** **78**:430-435.2000.

SAPIEHA, P.S.; HAUSWIRTH, W.W.; DI POLO, A. Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 are Required for Adult Retinal Ganglion Cell Axon Regeneration Induced by Fibroblast Growth Factor-2. **J Neurosci Res.** **83**:985–995. 2006.

SCHERER, J.; SCHNITZER, J. Growth factor effects on the proliferation of different retinal glial cells in vitro. **Brain Res Dev Brain Res.** **80**:209–21.1994.

SCHNITZER J. Astrocytes in mammalian retina. **Prog Ret Res.** 7:209-232.1988.
SCHUETTE, M.; WERNER, P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. **Neurosci Lett.** 246:53-6. 1998.

SHARMA, H.S. Hyperthermia induced brain oedema: current status and future perspectives. **Indian J Med Res.** 123:629-52. 2006.

SIEGEL, G.J. **Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects.** 7th Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 2006.
SIEVERS, J.; HAUSMANN, B.; UNSICKER, K.; BERRY, M. Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retina ganglion cells after transection of the optic nerve. **Neurosci Lett.** 76:157-162. 1987.

SILIPRANDI, R.; CANELLA, R.; CARMIGNOTO, G. Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 34:3232-3245.1993.

SIVILIA, S.; GIULIANI, A.; FERNÁNDEZ, M.; TURBA, M.E.; FORNI, M.; MASSELLA, A.; DE SORDI, N.; GIARDINO, L.; CALZÀ, L. Intravitreal NGF administration counteracts retina degeneration after permanent carotid artery occlusion in rat. **BMC Neurosci.** 10:52.2009.

SLEZAK, M.; GROSCHE, A.; NIEMIEC, A.; et al. Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. **Neuron** 74:504-516.2012.

SPRAUL, C.W.; KAVEN, C.; LANG, G.K.; LANG, G.E. Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. **Ophthalmic Res** 36:166-71.2004.

STEINLE, J.J.; GRANGER, H.J. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. **Auton Neurosci.** 108: 57-62. 2003.

STEPINAC, T.K.; CHAMOT, S.R.; RUNGGER-BRÄNDLE, E.; FERREZ, P.; MUNOZ, J-L.; van den BERGH, H. RIVA, C.E.; POURNARAS, C.J.; WAGNIERES, G.A. Light-induced retinal vascular damage by Pd porphyrin luminescent oxygen probes. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 46:956-966. 2005.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Adv Physiol Educ.** 28:155-159.2004.

STRANGE, K. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. **J Am Soc Nephrol.** **3**:12-27.1992.

SUN, X.; XU, X.; WANG, F.; ZHANG, X.; YU, Z.; LU, H.; HO, PC. Effects of nerve growth factor for retinal cell survival in experimental retinal detachment. **Curr Eye Res.** **32**:765-772.2007.

TANG, Z.; ARJUNAN, P.; LEE, C.; et al. Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3 β phosphorylation. **J Exp Med.** **207**:867-880.2010.

TOMI, M.; FUNAKI, T.; ABUKAWA, H.; KATAYAMA, K.; KONDO, T.; OHTSUKI, S.; UEDA, M.; OBINATA, M.; TERASAKI, T.; HOSOYA, K. Expression and regulation of L-cystine transporter, system Xc⁻, in the newly developed rat retinal Müller cell line (TR-MUL). **Glia** **43**:208–217.2003.

UCKERMANN, O.; VARGOVÁ, L.; ULBRICHT, E.; KLAUS, C.; WEICK, M.; RILLICH, K.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; SYKOVÁ, E.; BRINGMANN, A. Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea-pig retina. **J Neurosci.** **24**:10149-58.2004.

UCKERMANN, O.; WOLF, A.; KUTZERA, F.; KALISCH, F.; BECK-SICKINGER, A.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. **J Neurosci Res.** **83**:538-550.2006.

UEKI, Y.; REH, T.A. EGF Stimulates Müller Glial Proliferation via a BMP Dependent Mechanism. **Glia.** **61**:778-789.2013.

VOGLER, S.; GROSCHE, A.; PANNICKE, T.; ULBRICHT, E.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Hypoosmotic and glutamate-induced swelling of bipolar cells in the rat retina: comparison with swelling of Müller glial cells. **J Neurochem.** **126**:372-381. 2013.

WAHL, V.; VOGLER, S.; GROSCHE, A.; PANNICKE, T.; UEFFING, M.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; HAUCK, S.M.; BRINGMANN, A. Osteopontin inhibits osmotic swelling of retinal glial (Müller) cells by inducing release of VEGF. **Neuroscience.** **246**:59-72. 2013.

WAHLIN, K.J.; ADLER, R.; ZACK, D.J.; CAMPOCHIARO, P.A. Neuro-trophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. **Exp. Eye Res.** **73**:693–701. 2001.

WALSH, N; VALTER, K; STONE, J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. **Exp Eye Res.** **72**: 495-501.2001.

WALSHE, T.E.; LEACH, L.L.; D'AMORE, P.A. TGF- β signaling is required for maintenance of retinal ganglion cell differentiation and survival. **Neuroscience.** **189**:123–131. 2011.

WAN; Q-F.; HEIDELBERGER, R. Synaptic Release at Mammalian Bipolar Cell Terminals. **Vis Neurosci.** **28**: 109–119. 2011

WANG, L.; DENG, Q-Q.; WU, X-H.; YU, J.; YANG, X-L.; ZHONG, Y-M. Upregulation of Glutamate–Aspartate Transporter by Glial Cell Line–Derived Neurotrophic Factor Ameliorates Cell Apoptosis in Neural Retina in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **CNS Neurosci Ther.** **19**:945–953. 2013.

WANG, Y.; ABU-ASAB, M.S.; YU, C-R.; TANG, Z.; SHEN, D.; TUO, J.; LI, X.; CHAN, C-C. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C inhibits neuroretinal apoptosis in a murine model of focal retinal degeneration. **Lab Invest.** **94**: 674–682. 2014.

WÄSSLE, H.; PULLER, C.; MÜLLER, F.; HAVERKAMP, S. Cone Contacts, Mosaics, and Territories of Bipolar Cells in the Mouse Retina. **J Neurosci.** **29**:106–117. 2009.

WEHNER, F.; OLSEN, H.; TINEL, H.; KINNE-SAFFRAN, E.; KINNE, R.K.W. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** **148**:1-80. 2003.

WEN, R.; TAO, W.; LI, Y.; SIEVING, P.A. CNTF and retina. **Prog Retin Eye Res.** **31**:136-151.2012.

WEUSTE, M.; WURM, A.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. HB EGF: increase in the ischemic rat retina and inhibition of osmotic glial cell swelling. **Biochem Biophys Res Co.** **347**:310-318. 2006.

WEXLER, E.M.; BERKOVICH, O.; NAWY, S. Role of the low-affinity NGF receptor (p75) in survival of retinal bipolar cells. **Vis Neurosci.** **15**:211-218. 1998.

WOODBURY, M.E.; IKEZU, T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. **J Neuroimmune Pharmacol.** **9**:92-101.2014.

WU, S.M. Synaptic Organization of the Vertebrate Retina: General Principles and Species-Specific Variations. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **51**:1264-74. 2010.

WU, W.C.; LAI, C.C.; CHEN, S.L.; XIAO, X.; CHEN, T.L.; TSAI, R.J.F.; KUO, S.W.; TSAO, Y.P. Gene therapy for detached retina by adeno-associated virus vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **43**: 3480-88.2002.

WURM, A.; LIPP, S.; PANNICKE, T.; et al. Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells. **J Neurochem.****112**:1261-72.2010.

WURM, A.; LIPP, S.; PANNICKE, T.; LINNERTZ, R.; FÄRBER, K.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Involvement of A1 adenosine receptors in osmotic volume regulation of retinal glial cells in mice. **Mol Vis.****15**:1858-67.2009.

WURM, A.; PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; FRANCKE, M.; HOLLBORN, M.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; OSBORNE, N.N.; BRINGMANN, A. Purinergic signaling involved in Müller cell function in the mammalian retina. **Prog Retin Eye Res.** **30**:324–342.2011.

WURM, A.; PANNICKE, T.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. **J Neurochem.** **104**:386-399. 2008.

XUE, X.F.; ZHOU, J.H.; WU, L.M.; FU, L.H.; ZHAO, J. HPLC determination of adenosine in royal jelly. **Food Chem.** **115**:715-719.2009.

YAFAI, Y.; IANDIEV, I.; LANGE, J.; YANG, X.M.; WIEDEMANN, P.; ANDREAS BRINGMANN, A.; EICHLER, W. Basic Fibroblast Growth Factor Contributes to a Shift in the Angioregulatory Activity of Retinal Glial (Müller) Cells. **PLoS ONE** **8**:e68773.2013.

YAMADA, H. YAMADA, E.; ANDO, A.; ESUMI, N.; BORA, N.; SAIKIA, J.; SUNG, C-H.; ZACK, D.J.; CAMPOCHIARO, P.A. Fibroblast Growth Factor-2 Decreases Hyperoxia-Induced Photoreceptor Cell Death in Mice. **Am J Pathol.** **159**:1113-20.2001.

YAMADA, H.; YAMADA, E.; ANDO, A.; SEO, S-M.; ESUMI, N.; OKAMOTO, N.; VINOES, M.; LAROCHELLE, W.; ZACK, D.J.; CAMPOCHIARO, P.A. Platelet-Derived Growth Factor-A-Induced Retinal Gliosis Protects against Ischemic Retinopathy. **Am J Pathol.** **156**:477-487.2000.

YANG, X.; WEI, A.; LIU, Y.; HE, G.; ZHOU, Z.; YU, Z. IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways. **Mol Vis.** **19**:1901-1912. 2013.

YOSHIMURA, A.; WAKABAYASHI, Y.; MORI, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . **J Biochem.** **147**:781-792.2010.

ZHAO, B.; CHEN, Y-C. Regulation of TGF- β Signal Transduction. **Hindawi Publishing Corporation Scientific.** **2014**:1-9.2014.

9 APÊNDICE

Manuscrito publicado no periódico internacional *Journal of Neurochemistry*:

GARCIA,T.B.; PANNICKE, T.; VOGLER, S.; BERK, B-A.; GROSCHE, A.; WIEDEMANN, P.; SEEGER, J.; REICHENBACH, A.; HERCULANO, A.M.; BRINGMANN, A. Nerve growth factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by inducing glial cytokine release. **J Neurochem.** **131**:303-313.2014.

ORIGINAL
ARTICLE

Nerve growth factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by inducing glial cytokine release

Tarcyane Barata Garcia,^{*†} Thomas Pannicke,^{*} Stefanie Vogler,^{*} Benjamin-Andreas Berk,^{*‡} Antje Grosche,[§] Peter Wiedemann,[¶] Johannes Seeger,[‡] Andreas Reichenbach,^{*} Anderson Manoel Herculano[†] and Andreas Bringmann[¶]^{*}Paul Flechsig Institute of Brain Research, University of Leipzig, Leipzig, Germany[†]Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil[‡]Institute of Veterinary Anatomy, University of Leipzig, Leipzig, Germany[§]Institute of Human Genetics, University of Regensburg, Regensburg, Germany[¶]Department of Ophthalmology and Eye Hospital, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Abstract

Osmotic swelling of neurons and glial cells contributes to the development of retinal edema and neurodegeneration. We show that nerve growth factor (NGF) inhibits the swelling of glial (Müller) and bipolar cells in rat retinal slices induced by barium-containing hypoosmotic solution. NGF also reduced Müller and bipolar cell swelling in the post-ischemic retina. On the other hand, NGF prevented the swelling of freshly isolated Müller cells, but not of isolated bipolar cells, suggesting that NGF induces a release of factors from Müller cells that inhibit bipolar cell swelling in retinal slices. The inhibitory effect of NGF on Müller cell swelling was mediated by activation of TrkA (the receptor tyrosine kinase A), but not p75^{NTR}, and was prevented by blockers of metabotropic glutamate, P2Y₁, adenosine A₁, and fibroblast growth factor receptors. Basic

fibroblast growth factor fully inhibited the swelling of freshly isolated Müller cells, but only partially the swelling of isolated bipolar cells. In addition, glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor- β 1, but not epidermal growth factor and platelet-derived growth factor, reduced the swelling of bipolar cells. Both Müller and bipolar cells displayed TrkA immunoreactivity, while Müller cells were also immunostained for p75^{NTR} and NGF. The data suggest that the neuroprotective effect of NGF in the retina is in part mediated by prevention of the cytotoxic glial and bipolar cell swelling.

Keywords: bipolar cell, cell swelling, glial, ischemia, nerve growth factor, retina.

J. Neurochem. (2014) **131**, 303–313.

One major vision-threatening condition of ischemic-hypoxic and inflammatory retinal diseases such as diabetic retinopathy, uveitis, and atherosclerotic vascular disorders is the development of tissue edema. In addition to vascular hyperpermeability (vasogenic edema), water accumulation in neurons and glial cells resulting in cellular swelling (cytotoxic edema) may contribute to the development of edema and neurodegeneration in the retina (Bringmann *et al.* 2005). Water accumulation in retinal glial (Müller) cells was found in various animal models of retinal ischemia-hypoxia and diabetic retinopathy (Stepinac *et al.* 2005; Kaur *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2013).

Neuronal activity in the retina is associated with a decrease in the extracellular fluid osmolarity (Dmitriev *et al.* 1999).

Received March 17, 2014; revised manuscript received July 11, 2014; accepted July 14, 2014.

Address correspondence and reprint requests to Andreas Bringmann, Department of Ophthalmology and Eye Hospital, University of Leipzig, Liebigstrasse 10-14, D-04103 Leipzig, Germany. E-mail: bria@medizin.uni-leipzig.de

Abbreviations used: bFGF, basic fibroblast growth factor; DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; EGF, epidermal growth factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; LY341495, (2*S*)-2-amino-2-[(1*S*,2*S*)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl) propanoic acid; MRS2179, *N*⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate; NGF, nerve growth factor; NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid; p75^{NTR}, p75 neurotrophin receptor; PD173074, *N*-[2-[[4-(diethylamino)butyl]amino-6-(3,5-dimethoxyphenyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl]-*N'*-(1,1-dimethylethyl)urea; PDGF, platelet-derived growth factor; PKC, protein kinase C; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Hypoosmolarity was shown to induce a swelling of bipolar cells that is mediated by a release of endogenous glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors, resulting in sodium and water flux into the cells (Vogler *et al.* 2013). In contrast, Müller cells do not swell under hypoosmotic stress (Vogler *et al.* 2013). The different volume regulation of Müller and bipolar cells has led to the suggestion that retinal glial cells play a role in mediating the homeostasis of the extracellular space volume (Vogler *et al.* 2013). Müller cell volume regulation was shown to depend on the passive transmembrane potassium flux (Pannicke *et al.* 2004) and activation of an endogenous glutamatergic–purinergic signaling cascade (Uckermann *et al.* 2006; Wurm *et al.* 2008). Because various neuroprotective factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin, and osteopontin activate this signaling cascade (Wurm *et al.* 2008; Krügel *et al.* 2010; Wahl *et al.* 2013), inhibition of cytotoxic Müller cell swelling might represent one neuroprotective mechanism.

Various growth factors, cytokines, and neurotrophins including basic fibroblast growth factor (bFGF), brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promote the survival of photoreceptors and retinal neurons such as ganglion and bipolar cells under pathological conditions (Sievers *et al.* 1987; Faktorovich *et al.* 1992; Mansour-Robaey *et al.* 1994; Wexler *et al.* 1998; Hauck *et al.* 2006). It has been shown that the simultaneous action of various trophic factors is required to effectively promote photoreceptor survival (Ogilvie *et al.* 2000), and that the survival of photoreceptors and neurons is, at least in part, indirectly supported via regulation of the trophic factor production in Müller glial cells (Wexler *et al.* 1998; Harada *et al.* 2002).

Nerve growth factor (NGF) controls neuronal survival in the retina via activation of high-affinity TrkA receptors, that transmit prosurvival signals, and low-affinity p75 neurotrophin receptors (p75^{NTR}) that transmit antisurvival signals (Ali *et al.* 2008; Coassin *et al.* 2008; Lebrun-Julien *et al.* 2009; Bai *et al.* 2010). NGF acting at TrkA protects retinal neurons from excitotoxicity (Kokona *et al.* 2012). NGF delays retinal cell degeneration in animal models of inherited retinitis pigmentosa, diabetic retinopathy, glaucoma, retinal ischemia, retinal detachment, and optic nerve transection (Carmignoto *et al.* 1989; Siliprandi *et al.* 1993; Hammes *et al.* 1995; Lenzi *et al.* 2005; Sun *et al.* 2007; Colafrancesco *et al.* 2011). NGF protects neuronal and glial cells from oxidant-induced cell death (Sampath *et al.* 1994; Mattson *et al.* 1995; Giardino *et al.* 1998). However, activation of p75^{NTR} was shown to have either pro- or antisurvival effects in the retina, in dependence on the experimental model studied (Wexler *et al.* 1998; Harada *et al.* 2000, 2002). NGF was suggested to decrease the production of bFGF by Müller cells resulting in increased photoreceptor apoptosis (Harada *et al.* 2000; Nakamura *et al.* 2005). In another study,

activation of p75^{NTR} was suggested to trigger release of bFGF from Müller cells, resulting in increased survival of bipolar cells (Wexler *et al.* 1998). Because water accumulation in retinal neurons and glial cells is a pathogenic factor involved in retinal degeneration under ischemic-hypoxic and inflammatory conditions, we tested whether NGF may influence the osmotic swelling of rat Müller glial and bipolar cells. We found that NGF prevents the osmotic swelling of Müller cells by inducing autocrine/paracrine FGF signaling, and indirectly the swelling of bipolar cells by inducing a release of cytokines from Müller cells.

Experimental procedures

Materials

Mitotracker Orange was obtained from Life Technologies (Darmstadt, Germany). Papain was from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). *N*⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate and (2*S*)-2-amino-2-[(1*S*,2*S*)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl) propanoic acid (LY341495) were from Tocris Cookson (Ellisville, MO, USA). Human recombinant bFGF, rat recombinant GDNF, TrkA receptor inhibitor (Calbiochem 648450), and TAT-conjugated Pep5 (506181) were obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Rat recombinant epidermal growth factor, human recombinant platelet-derived growth factor, and human recombinant transforming growth factor-β1 (TGF-β1) were purchased from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Rat recombinant NGF-β (N2513) and all other agents used were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless stated otherwise. The following antibodies were used: rabbit anti-NGF (1 : 100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-TrkA (1 : 100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-p75^{NTR} (1 : 100; Promega, Mannheim, Germany), mouse anti-glutamine synthetase (1 : 200; Merck Millipore), mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1 : 200; Sigma-Aldrich), mouse anti-protein kinase Cα (PKCα, 1 : 200; Santa Cruz Biotechnology), Cy3-coupled goat anti-rabbit IgG (1 : 200; Jackson Immuno Research, Newmarket, UK), and Cy2-coupled goat anti-mouse IgG (1 : 100; Jackson Immuno Research).

Animals and experimental retinal ischemia–reperfusion

All experiments were done in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC, and were approved by the local authorities (University of Leipzig Medical Faculty and Landesdirektion Leipzig). Adult Long-Evans rats (250–350 g; both sexes) were bred in the Medical-Experimental Center of the University of Leipzig Medical Faculty. Animals were killed with carbon dioxide. In four animals, retinal ischemia–reperfusion was induced in one eye by elevating the intraocular pressure to 160 mmHg for 60 min, as previously described (Pannicke *et al.* 2004). The contralateral eyes served as control. The animals were killed after 3 days.

Cell soma recording

Retinal slices and suspensions of dissociated retinal cells were prepared as described (Wurm *et al.* 2008). All experiments were

performed at 20–23°C. Retinal slices or isolated cells were transferred to a custom-made perfusion chamber and kept submerged in extracellular solution. Slices or cells were loaded with the vital dye Mitotracker Orange (1 μ M) for 3 min. Recordings were made with a confocal laser scanning microscope (LSM 510 Meta; Zeiss, Oberkochen, Germany) and an Achromplan 63 \times /0.9 water immersion objective (Zeiss). The pinhole was set at 151 μ m; the thickness of the optical section was adjusted to 1 μ m. Mitotracker Orange was excited at 543 nm with a HeNe laser (Zeiss), and emission was recorded with a 585 nm long-pass filter.

The recording chamber was continuously perfused with extracellular solution; test substances were applied by rapidly changing the perfusate. The extracellular solution consisted of (mM) 136 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 11 glucose, adjusted to pH 7.4 with Tris. The hypoosmotic solution (60% osmolarity) was made up by adding distilled water. Barium chloride (1 mM) was added to the hypoosmotic solution; the slices or cells were preincubated in barium-containing isoosmotic solution for 10 min. Blocking agents were preincubated for 15–45 min, and receptor agonists were applied within the hypoosmotic solution.

Immunostaining

Isolated retinas were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h. After washing in buffered saline, the tissues were embedded in saline containing 3% agarose (w/v), and 60- μ m thick slices were cut with a vibratome. The slices were incubated in 5% normal goat serum plus 0.3% Triton X-100 and 1% dimethylsulfoxide in saline for 2 h at 20–23°C and, subsequently, in primary antibodies overnight at 4°C. After several washing steps with saline, the secondary antibodies were applied overnight at 4°C. No specific staining was found in negative control slices stained without primary antibodies (data not shown). Dissociated retinal cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, incubated in 5% normal goat serum plus 0.03% Triton X-100 and 0.1% dimethylsulfoxide in saline for 2 h at 20–23°C and, subsequently, in primary antibodies overnight at 4°C. After washing with saline, the secondary antibodies were applied overnight at 4°C.

Data analysis

To determine the extent of cell soma swelling, the cross-sectional area of Mitotracker Orange-stained cell bodies was measured off-line using the Zeiss LSM Image Examiner version 3.2.0.70 (Zeiss). Data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was made with Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Significance was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test and by Mann–Whitney *U* test, respectively, and was accepted at $p < 0.05$.

Results

Hypoosmotic swelling of Müller and bipolar cell somata

It was shown recently that Müller and bipolar cells differ in their cell volume regulation in response to osmotic stress (Vogler *et al.* 2013). We measured the cross-sectional area of Müller and bipolar cell somata recorded in Mitotracker Orange-loaded freshly isolated retinal slices (Fig. 1b and c) and cells (Fig. 2d). Müller and bipolar cells were identified in

retinal slices and cell suspensions according to their characteristic morphologies (Figs 1b and 2d). The different cell morphologies and different localization of the somata within the inner nuclear layer was verified by immunohistochemical staining of Müller cells (glutamine synthetase) and rod bipolar cells (PKC α ; Gabriel *et al.* 2001) in retinal slices (Fig. 1a). Superfusion of retinal slices from control animals with a hypoosmotic extracellular solution (60% osmolarity) for 4 min did not induce a significant alteration in the size of Müller cell somata (Fig. 1d) while bipolar cell somata swelled under these conditions (Fig. 1e). Similarly, somata of freshly isolated Müller cells did not change their size under hypoosmotic conditions (Fig. 2a) while somata of freshly isolated bipolar cells swelled significantly under these conditions ($p < 0.05$; Fig. 2b). As previously described (Pannicke *et al.* 2004), potassium channel-blocking barium ions induced a significant ($p < 0.05$) hypoosmotic swelling of Müller cell bodies (Figs 1d and 2a). Müller cells in slices of post-ischemic retinas displayed a hypoosmotic swelling of their somata in the absence of barium ions (Fig. 1f); the osmotic glial swelling after retinal ischemia–reperfusion was suggested to be caused by the down-regulation of Kir4.1, the major potassium channel of Müller cells (Pannicke *et al.* 2004). The data are in agreement with previous studies that showed that Müller cells, but not bipolar cells, possess endogenous volume-regulatory mechanisms that prevent cellular swelling under hypoosmotic conditions in the normal retina (Vogler *et al.* 2013), and that these mechanisms are impaired after retinal ischemia–reperfusion (Pannicke *et al.* 2004).

Swelling inhibition by NGF

To reveal whether NGF affects the volume regulation of Müller and bipolar cells, retinal slices were superfused with a hypoosmotic solution containing barium chloride. NGF was simultaneously administered with the hypoosmotic solution. As shown in Fig. 1(d) and (e), the hypoosmotic swelling of Müller and bipolar cell somata in retinal slices from control animals was dose-dependently inhibited by NGF. NGF also reduced significantly ($p < 0.05$) the swelling of Müller and bipolar cell somata in slices of post-ischemic retinas (Fig. 1f). However, the inhibitory effect of NGF on the osmotic swelling of bipolar cell somata in slices of post-ischemic retinas (Fig. 1f) was significantly ($p < 0.05$) lower than the effect observed in slices of control retinas. On the other hand, while NGF fully prevented the osmotic soma swelling of freshly isolated Müller cells (Fig. 2a), it did not inhibit the soma swelling of isolated bipolar cells (Fig. 2b). The data suggest that Müller cells, but not bipolar cells, express NGF receptors that are coupled to cell volume-regulatory signaling mechanisms. The inhibitory effect of NGF on the swelling of bipolar cell somata in retinal slices might be an indirect effect, via NGF-induced stimulation of Müller cells which subsequently release factors that induce volume-regulatory signals in bipolar cells.

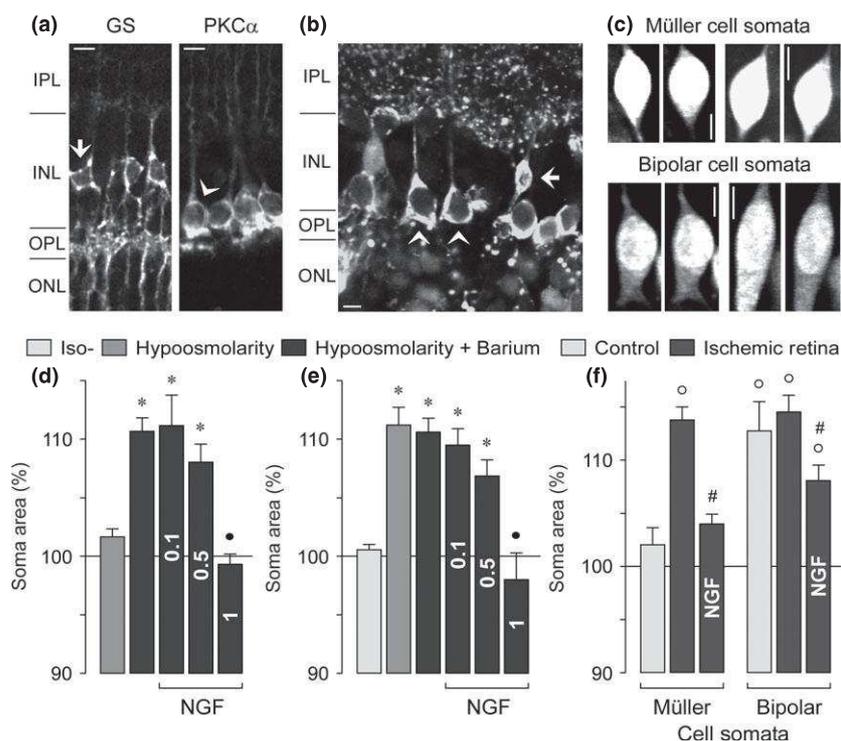


Fig. 1 Nerve growth factor (NGF) inhibits the osmotic swelling of Müller cell and bipolar cell somata in slices of control and post-ischemic retinas. (a) Immunohistochemical staining of control retinal slices against the glial marker glutamine synthetase (GS) and the rod bipolar cell marker protein kinase C α (PKC α). The focus is at the inner nuclear layer (INL). Arrow, Müller cell soma. Arrowhead, bipolar cell soma. Note that Müller cell somata are localized in the central part of the INL while bipolar cell somata are localized near the outer border of the INL. (b) Example of a freshly isolated retinal slice loaded with Mitotracker Orange. (c) Original records of cell somata obtained before (left) and during (right) superfusion of control retinal slices with a barium (1 mM)-containing hypoosmotic solution in the absence (left-hand side images) and presence (right-hand side images) of NGF (1 ng/mL). (d and e) Dose dependencies of the NGF effects on the osmotic swelling of Müller cell (d) and bipolar cell somata (e) in control retinal slices. The concentrations of NGF (ng/mL) are given in the bars. The cross-sectional area of cell somata was measured after a 4-min

superfusion of the slices with an iso- or hypoosmotic solution (60% osmolarity), and are expressed in percent of the soma size recorded before beginning of the superfusion (100%). The effects of the hypoosmotic solution were determined in the absence and presence of barium chloride (1 mM). (f) Effects of NGF (1 ng/mL) on the osmotic swelling of Müller and bipolar cell somata in slices of 3-day-post-ischemic retinas. The slices were superfused with the hypoosmotic solution without barium chloride. Each bar represents values obtained in 3–34 cells. * $p < 0.05$ compared with hypoosmolarity (d) and isoosmolarity control (e), respectively. • $p < 0.05$ compared with hypoosmolarity plus barium (d) and hypoosmolarity control (e), respectively. ◦ $p < 0.05$ compared with Müller cell somata in control retinas (f). # $p < 0.05$ compared with Müller cell and bipolar cell somata, respectively, in ischemic retinas in the absence of NGF (f). IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 5 μ m.

NGF binds with at least two classes of receptors, TrkA and p75^{NTR}. To reveal the types of receptors that mediate the inhibitory effect of NGF on the osmotic swelling of Müller cell somata, we tested a TrkA receptor inhibitor and a p75^{NTR} signaling inhibitor, TAT-conjugated Pep5. As shown in Fig. 2(c), the TrkA inhibitor fully prevented the inhibitory effect of NGF on the swelling of Müller cell somata, while the p75^{NTR} inhibitor had no effect.

Dependence of the NGF effect on receptor transactivation

Rat Müller cells were shown to possess an endogenous signaling cascade that mediates the agonist-induced homeo-

stasis of cellular volume under hypoosmotic conditions; this signaling cascade involves the autocrine/paracrine activation of glutamatergic and purinergic receptors (Uckermann *et al.* 2006; Wurm *et al.* 2008). The inhibitory effect of NGF on the swelling of Müller cell somata was abrogated in the presence of the selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors, LY341495 (Figure S1a). This suggests that NGF induces a release of endogenous glutamate, likely from Müller cells (Wurm *et al.* 2008), that subsequently activates metabotropic glutamate receptors on the cells. On the other hand, LY341495 inhibited the swelling of bipolar cells in retinal slices, but did not alter the inhibitory effect of

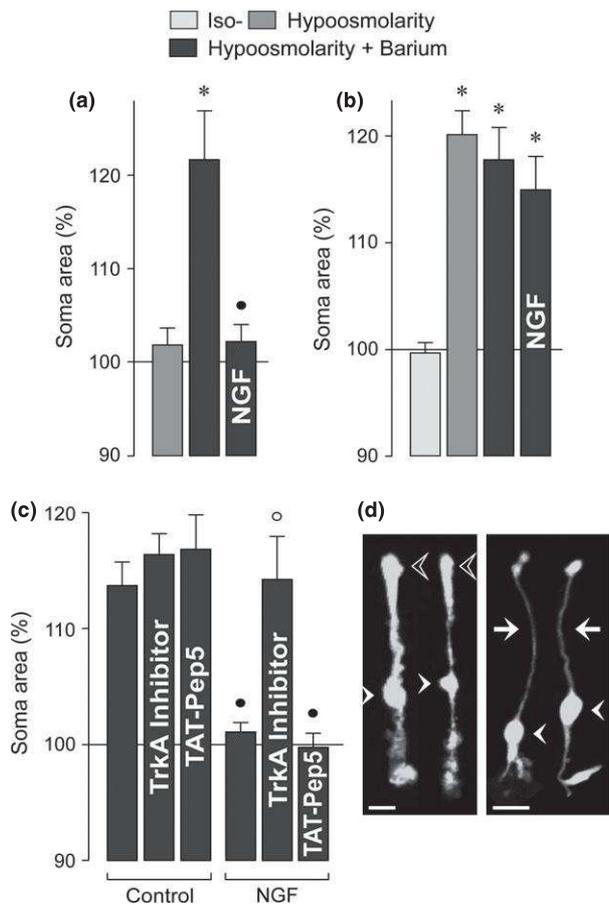


Fig. 2 Effects of nerve growth factor (NGF) (1 ng/mL) on the osmotic soma swelling of Müller (a and c) and bipolar cells (b) freshly isolated from retinas of control animals. (c) The inhibitory effect of NGF on the osmotic soma swelling of isolated Müller cells was prevented in the presence of a TrkA inhibitor (500 nM) but not in the presence of a p75^{NTR} inhibitor, TAT-conjugated Pep5 (TAT-Pep5; 1 μ M). (d) Original records of Mitotracker Orange-loaded freshly isolated Müller (left) and bipolar cells (right). Filled arrowheads, cell soma. Unfilled arrowheads, Müller cell endfoot. Arrows, inner process of bipolar cells. Data were measured after a 4-min superfusion of the cells with an iso- or hypoosmotic solution, and are expressed in percent of the soma size recorded before beginning of the superfusion (100%). The effects of the hypoosmotic solution were recorded in the absence and presence of barium chloride (1 mM). Each bar represents values obtained in 7–20 cells. * $p < 0.05$ compared with hypoosmolarity (a) and isoosmolarity control (b), respectively. $\bullet p < 0.05$ compared with hypoosmolarity plus barium control (a and c). $\circ p < 0.05$ compared with NGF control. Scale bars: 10 μ m.

NGF (Figure S1b). This finding is in agreement with a recent study that showed that the osmotic swelling of bipolar cell somata in rat retinal slices is mediated by induction of the release of endogenous glutamate and subsequent activation of metabotropic glutamate receptors (Vogler *et al.* 2013).

The inhibitory effects of NGF on the swelling of Müller and bipolar cell somata in retinal slices were fully abrogated in the presence of the selective antagonist of purinergic P2Y₁ receptors, *N*⁶-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate (MRS2179), and the antagonist of adenosine A₁ receptors, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), respectively (Figure S1c and d). The data suggest that the effects of NGF on the swelling of Müller and bipolar cell somata are mediated by transactivation of P2Y₁ and A₁ receptors, likely via inducing a release of ATP and adenosine from Müller cells.

Dependence of the NGF effect on cytokine release

It was shown that exogenous glutamate, ATP, and adenosine inhibit the hypoosmotic swelling of Müller cell somata, but not of bipolar cell somata (Vogler *et al.* 2013). Therefore, it is unlikely that glutamate, ATP or adenosine released from Müller cells mediate the inhibitory effect of NGF on the swelling of bipolar cell somata in retinal slices (Fig. 1e). In order to test the assumption that the swelling-inhibitory effect of NGF on bipolar cells in retinal slices is an indirect effect mediated by other Müller cell-derived factors, we tested the FGF receptor tyrosine kinase inhibitor *N*-[2-[[4-(diethylamino)butyl]amino-6-(3,5-dimethoxyphenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-*N'*-(1,1-dimethylethyl)urea (PD173074) (Mohammadi *et al.* 1998). bFGF is a major neuroprotectant in the retina (Sievers *et al.* 1987; Faktorovich *et al.* 1992), and Müller cells are known to produce bFGF (Harada *et al.* 2000, 2002; Hauck *et al.* 2006). We found that the inhibitory effects of NGF on the osmotic swelling of Müller and bipolar cell somata in retinal slices were completely blocked by PD173074 (Fig. 3a and b). The data suggest that the effects of NGF are mediated by transactivation of FGF receptors. We found that exogenous bFGF fully blocked the osmotic soma swelling in isolated Müller cells (Fig. 3c), but inhibited the osmotic soma swelling in isolated bipolar cells by approximately 30% (Fig. 3d). This may suggest that, in addition to bFGF, further Müller cell-derived factors play a role in mediating the inhibitory effect of NGF on the osmotic swelling of bipolar cell somata in retinal slices.

In order to determine further factors that inhibit the osmotic swelling of bipolar cell somata, we tested various cytokines. GDNF and TGF- β 1 significantly ($p < 0.05$) reduced the osmotic swelling of bipolar cell somata in retinal slices while epidermal growth factor and platelet-derived growth factor had no effects (Fig. 4a). To distinguish whether GDNF and TGF- β 1 directly inhibit the swelling of bipolar cell somata or indirectly via their effects in Müller cells, we tested the cytokines in freshly isolated bipolar cells. As shown in Fig. 4(b), both cytokines reduced significantly ($p < 0.05$) the osmotic soma swelling in isolated bipolar cells, albeit to degrees lower than that observed in retinal slices (Fig. 4a). Coadministration of GDNF and TGF- β 1 resulted in a reduction in the soma swelling in isolated

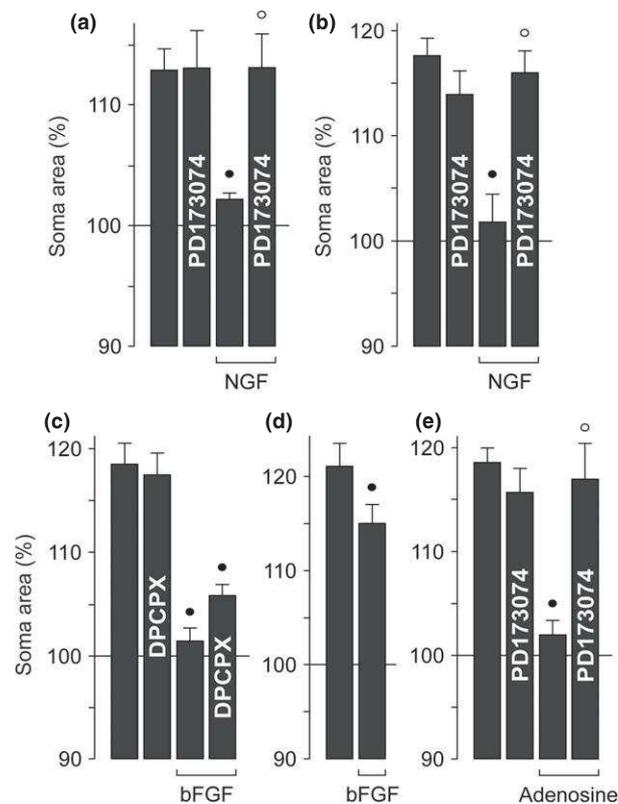


Fig. 3 The inhibitory effect of nerve growth factor (NGF) on the osmotic swelling of Müller cell somata is mediated by the activation of fibroblast growth factor (FGF) signaling. The data were measured after a 4-min superfusion of retinal slices (a and b) and isolated cells (c–e) with a hypoosmotic solution containing barium chloride (1 mM), and are expressed in percent of the soma size recorded before beginning of the superfusion (100%). (a and b) The inhibitory effects of NGF (1 ng/mL) on the osmotic swelling of Müller (a) and bipolar cell somata (b) are prevented by the FGF receptor inhibitor *N*-[2-[[4-(diethylamino)butyl]amino-6-(3,5-dimethoxyphenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-*N*-(1,1-dimethylethyl)urea (PD173074) (500 nM). (c and d) Effects of basic FGF (10 ng/mL) on the osmotic soma swelling in isolated Müller (c) and bipolar cells (d). In isolated Müller cells, the antagonist of adenosine A_1 receptors, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) (100 nM), did not significantly block the swelling-inhibitory effect of basic FGF (c). (e) The inhibitory effect of adenosine (10 μ M) on the osmotic swelling of Müller cell somata is prevented by PD173074 (500 nM). Each bar represents values obtained in 7–23 cells. $\bullet p < 0.05$ compared with hypoosmolarity plus barium control. $\circ p < 0.05$ compared with NGF (a, b) and adenosine control (e).

bipolar cells (Fig. 4b) to a degree similar to that observed in retinal slices (Fig. 4a). Coadministration of bFGF, GDNF, and TGF- β 1 did not further decrease the extent of soma swelling in isolated bipolar cells (Fig. 4b).

Glial bFGF release occurs downstream from A_1 receptor activation

We found that the inhibitor of adenosine A_1 receptors, DPCPX, fully blocked the inhibitory effect of NGF on the

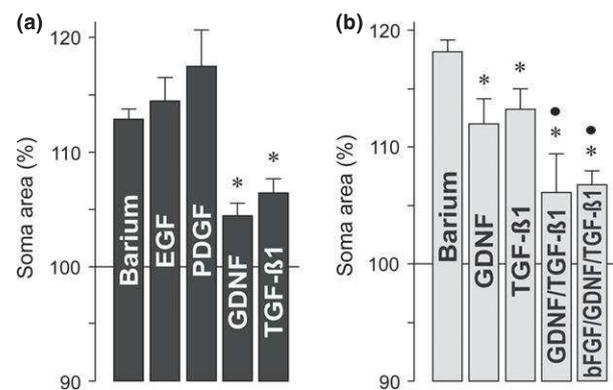


Fig. 4 Cytokine-induced inhibition of the osmotic swelling of bipolar cell somata. The data were measured after a 4-min superfusion of retinal slices (a) and freshly isolated cells (b) with a hypoosmotic solution containing barium chloride (1 mM), and are expressed in percent of the soma size recorded before beginning of the superfusion (100%). (a) Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the swelling of bipolar cell somata. (b) Effects of GDNF, TGF- β 1, and of coadministrations of GDNF and TGF- β 1, and of basic fibroblast growth factor (bFGF), GDNF, and TGF- β 1, respectively, on the swelling of bipolar cell somata. Each cytokine was tested at 10 ng/mL. Each bar represents the values obtained in 10–45 cells. $*p < 0.05$ compared with hypoosmolarity plus barium control. $\bullet p < 0.05$ compared with TGF- β 1.

osmotic Müller cell swelling in retinal slices (Figure 51c). However, DPCPX blocked only partially the swelling-inhibitory effect of bFGF in isolated Müller cells (Fig. 3c). This suggests that the NGF-induced release of bFGF from Müller cells occurs downstream from autocrine/paracrine A_1 receptor activation. This assumption is supported by the finding that the inhibitory effect of adenosine on the osmotic Müller cell swelling (Uckermann *et al.* 2006) is blocked in the presence of the FGF receptor inhibitor PD173074 (Fig. 3e).

Dependence of swelling inhibition on ion channel activation

We described previously that the agonist-mediated inhibition of osmotic Müller cell swelling is mediated by activation of potassium and chloride channels (Uckermann *et al.* 2006). We found that the potassium channel blocker clofilium and the chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) blocked the inhibitory effects of NGF and bFGF on the osmotic soma swelling of isolated Müller cells (Fig. 5a). Both blockers also prevented the inhibitory effect of GDNF plus TGF- β 1 on the osmotic soma swelling of isolated bipolar cells (Fig. 5b).

Retinal localization of NGF, TrkA, and p75^{NTR}

To determine whether Müller and bipolar cells of the rat retina express NGF, TrkA, and p75^{NTR}, we immunostained retinal slices and cells. The slices and cells were colabeled

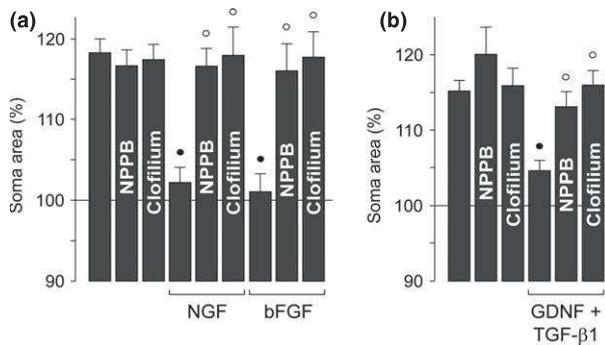


Fig. 5 Dependence of the swelling-inhibitory cytokine effects on ion channel activation. (a) In freshly isolated Müller cells, the effects of nerve growth factor (NGF) (10 ng/mL) and basic fibroblast growth factor (bFGF) (10 ng/mL) were abrogated in the presence of the chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) (100 μ M) and the potassium channel blocker clofilium (10 μ M), respectively. (b) Both blockers also abrogated the inhibitory effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) plus transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (each at 10 ng/mL) on the osmotic soma swelling of freshly isolated bipolar cells. The data were measured after a 4-min superfusion of the cells with a hypoosmotic solution containing barium chloride (1 mM), and are expressed in percent of the soma size recorded before beginning of the superfusion (100%). Each bar represents values obtained in 7–22 cells. $\bullet p < 0.05$ compared with hypoosmolarity plus barium control. $\circ p < 0.05$ compared with cytokine control.

against glutamine synthetase (predominantly expressed by Müller cells), GFAP (mainly expressed by astrocytes), and PKC α (marker of rod bipolar cells; Gabriel *et al.* 2001). NGF immunoreactivity displayed a widespread distribution throughout the retinal tissue (Figure S2a). In addition to other structures, the somata of retinal ganglion cells and cell bodies in the inner nuclear layer were surrounded by NGF immunoreactivity (Figure S2a). Müller cells displayed immunoreactivity for NGF, as indicated by their labeled processes that traverse the outer nuclear layer (Figure S2a). GFAP-expressing astrocytes localized to the ganglion cell layer were not immunolabeled for NGF (Figure S2b). Isolated Müller cells displayed a punctate NGF immunolabeling at their whole cell bodies (Fig. 6a) while isolated bipolar cells did not display immunolabeling for NGF (Fig. 6b). The data are in agreement with a previous study that showed expression of NGF in rat retinal ganglion and Müller cells (Chakrabarti *et al.* 1990).

Retinal slices displayed a widespread immunostaining for TrkA; among others, retinal ganglion cell and amacrine cell bodies were immunopositive for TrkA (Figure S3). Both isolated Müller and bipolar cells displayed a punctate TrkA labeling (Fig. 6c and d). The retinal cell suspensions contained also TrkA-positive, glutamine synthetase- and PKC α -negative cell bodies (data not shown), suggesting that further neuronal cell types, for example, amacrine

(Figure S3), express TrkA. The data are in agreement with previous studies that showed a widespread distribution of TrkA in the rat retina (Coassin *et al.* 2008). Retinal slices were immunolabeled for p75^{NTR} throughout all retinal layers (Figure S4). Among others, Müller cells displayed immunoreactivity for p75^{NTR}, as indicated by the colabeling with glutamine synthetase in both plexiform layers and at the outer limiting membrane (Figure S4). Isolated Müller cells displayed p75^{NTR} immunoreactivity at their whole cell bodies (Fig. 6e) while isolated bipolar cells were devoid of p75^{NTR} immunolabeling (Fig. 6f). The data are in agreement with previous studies that showed localization of p75^{NTR} in Müller cells but not bipolar cells in the rat retina (Hu *et al.* 1998; Wexler *et al.* 1998; Lebrun-Julien *et al.* 2009).

Discussion

Water accumulation in retinal neurons and glial cells resulting in cellular swelling contributes to the development of retinal edema and neuronal degeneration (Bringmann *et al.* 2005). Here, we examined whether NGF prevents the cytotoxic swelling of rat Müller and bipolar cells under hypoosmotic conditions, via activation of cell volume-regulatory mechanisms. We found that NGF inhibits the osmotic swelling of Müller and bipolar cells in control and post-ischemic retinal slices (Fig. 1d–f). On the other hand, NGF prevented the swelling of freshly isolated Müller cells (Fig. 2a) but not of isolated bipolar cells (Fig. 2b). The data may suggest that NGF induces a release of soluble factors from Müller cells that inhibit the swelling of bipolar cells in retinal slices. One such Müller cell-derived factor may represent bFGF, because the FGF receptor inhibitor PD173074 blocked the inhibitory effects of NGF on the swelling of Müller and bipolar cells in retinal slices (Fig. 3a and b). However, bFGF fully blocked the swelling of isolated Müller cells (Fig. 3c) and only in part the swelling of isolated bipolar cells (Fig. 3d). This suggests that further Müller cell-derived factors also mediate the inhibitory effect of NGF on bipolar cell swelling. We found that, in addition to the inhibitor of FGF receptors, blockers of P2Y₁ and adenosine A₁ receptors abrogated the inhibitory effect of NGF on the swelling of Müller and bipolar cells in retinal slices (Figure S1c and d). However, because agonists of P2Y₁ (ATP) and A₁ receptors (adenosine) do not block the hypoosmotic swelling of bipolar cells, as recently described (Vogler *et al.* 2013), it is unlikely that Müller cell-derived purinergic receptor agonists mediate the inhibitory effect of NGF on the bipolar cell swelling in retinal slices. PD173074 was described to block the tyrosine kinase activities of FGF and VEGF receptors (Mohammadi *et al.* 1998). It was shown that VEGF does not block the hypoosmotic swelling of bipolar cells (Vogler *et al.* 2013); thus, it is also unlikely that Müller cell-derived VEGF is involved in mediating the NGF-induced inhibition of bipolar cell swelling. In addition,

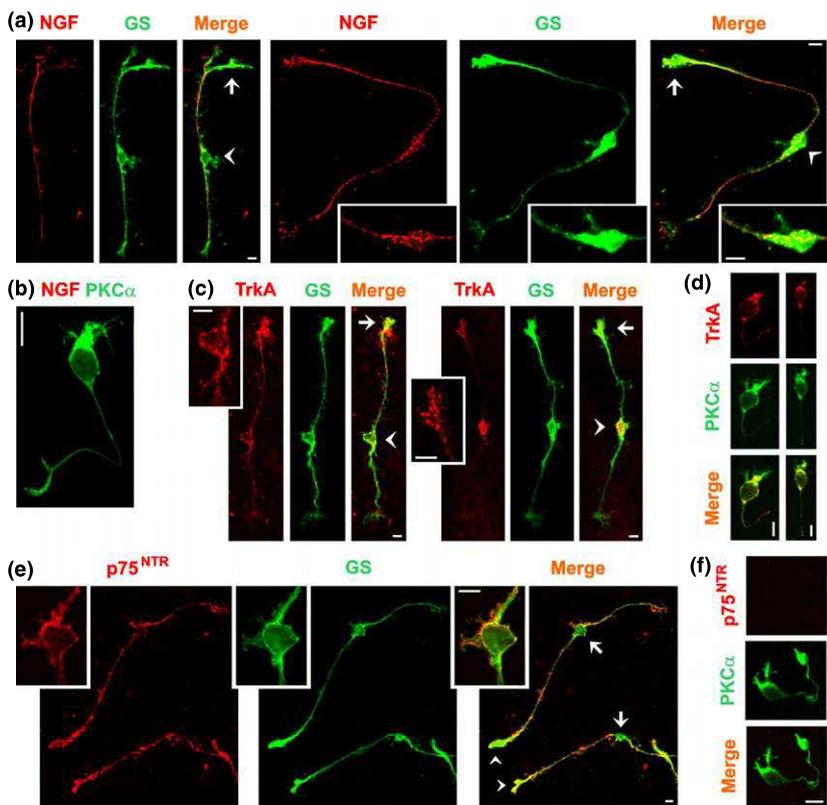


Fig. 6 Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) (a and b), TrkA (c and d), and p75^{NTR} (e and f) in freshly isolated Müller (a, c, and e) and bipolar cells (b, d, and f) of the rat retina. Müller cells were colabeled with an antibody against glutamine synthetase (GS). Bipolar cells were colabeled with an antibody against protein kinase C α (PKC α). (a and e) Insets: Müller cell soma at higher magnification. (c) Insets: Soma (left) and endfoot (right) of Müller cells at higher magnification. Arrows, Müller cell endfeet. Arrowheads, Müller cell somata. Scale bars: 5 μ m.

glutamate does not block the osmotic swelling of bipolar cells (Vogler *et al.* 2013). Instead, glutamate is involved in mediating the osmotic swelling of bipolar cells, via activation of metabotropic glutamate receptors (Vogler *et al.* 2013); inhibition of these receptors prevented the swelling of bipolar cells (Figure S1b).

The kinds of the other factors that are released from Müller cells after stimulation with NGF and that inhibit the swelling of bipolar cells remain to be determined in future experiments. Two candidate molecules are GDNF and TGF- β 1. We found that both cytokines reduced, when simultaneously administered to isolated cells, the extent of the bipolar cell swelling by two-third (Fig. 4b). However, because both cytokines alone reduced the swelling of isolated bipolar cells (Fig. 4b) to degrees lower than that observed in retinal slices (Fig. 4a), we assume that GDNF and TGF- β 1 act by two mechanisms: via direct effects in bipolar cells and via indirect effects involving Müller cells. It was shown that Müller cells are a source of TGF- β (Ikeda *et al.* 1998) and that GDNF induces the expression of bFGF in Müller cells (Harada *et al.* 2003). However, because coadministration of bFGF, GDNF, and TGF- β 1 did not fully inhibit the swelling of isolated bipolar cells (Fig. 4b), it is likely that further Müller cell-derived factors not investigated in the present study are also involved in mediating the effect of NGF on the swelling of bipolar cells. It can not be ruled out that various subtypes of bipolar cells express different kinds of cytokine

receptors. In this case, the NGF-induced release of a variety of cytokines from Müller cells increases the efficiency of the glial control of bipolar cell volume.

The inhibitory effect of NGF on the osmotic swelling of Müller cells is mediated by transactivation of metabotropic glutamate, P2Y₁, and adenosine A₁ receptors (Figure S1a and c). These effects are likely mediated by the NGF-induced release of glutamate, ATP, and adenosine from Müller cells, as previously described for the swelling-inhibitory effects of other receptor ligands (Uckermann *et al.* 2006; Wurm *et al.* 2008; Krügel *et al.* 2010; Wahl *et al.* 2013). We found that the FGF receptor inhibitor PD173074 fully prevented the inhibitory effect of adenosine in isolated Müller cells (Fig. 3e), suggesting that the NGF-induced release of bFGF from Müller cells occurs downstream from autocrine/paracrine A₁ receptor activation (Fig. 7). The data suggest that NGF induces activation of the previously described swelling-inhibitory glutamatergic-purinergic signaling cascade in Müller cells (Uckermann *et al.* 2006; Wurm *et al.* 2008). The final steps of the cascade may represent the adenosine-induced release of bFGF that subsequently activates FGF receptors, resulting in activation of potassium channels (likely two-pore domain channels; Skatchkov *et al.* 2006) and chloride channels (Fig. 5a). The ion flux compensates the osmotic gradient across the Müller cell membrane and thus prevents the cellular swelling. However, further experiments are required to determine more precisely the

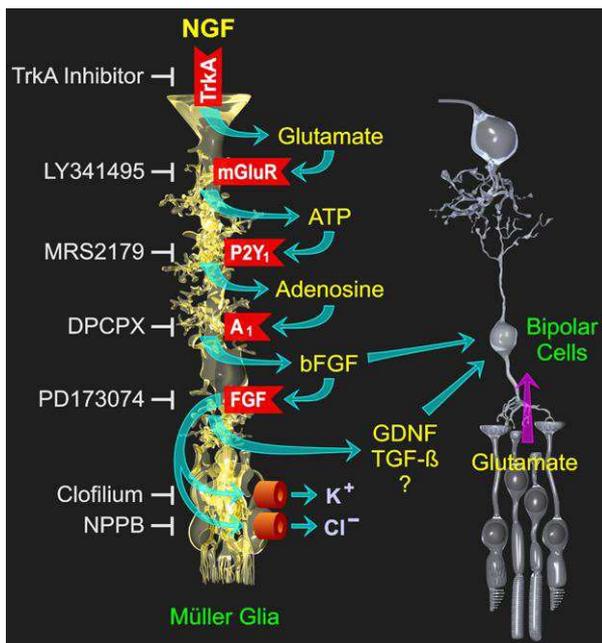


Fig. 7 Hypothetical scheme of the nerve growth factor (NGF)-induced signaling involved in the volume regulation of Müller glial and bipolar cells in the rat retina. NGF acting at TrkA activates a glutamatergic-purinergic signaling cascade in Müller cells. This cascade consists of the consecutive release of glutamate, ATP, and adenosine, and the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs), P2Y₁, and adenosine A₁ receptors. Activation of A₁ receptors induces a release of basic fibroblast growth factor (bFGF) from Müller cells that activates FGF receptors, resulting in the opening of potassium and chloride channels in the Müller cell membrane. The ion efflux compensates the transmembranous osmotic gradient and thus prevents the cellular swelling under hypoosmotic conditions. Müller cell-derived cytokines such as bFGF, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and transforming growth factor- β (TGF- β), and possibly further cytokines, inhibit the hypoosmotic swelling of bipolar cells. While glutamate inhibits the osmotic swelling of Müller cells, it induces the osmotic swelling of bipolar cells. The glutamate-induced swelling of bipolar cells is prevented by Müller cell-derived cytokines. Different steps of the signaling cascade can be blocked by antagonists (left side), resulting in cellular swelling when the extracellular osmolarity decreases.

NGF-induced signaling mechanisms in Müller cells. Activation of potassium and chloride channels is also involved in mediating the inhibitory effects of GDNF and TGF- β 1 on the osmotic swelling of bipolar cells (Fig. 5b).

The inhibitory effect of NGF on the osmotic Müller cell swelling was mediated by the activation of TrkA, but not p75^{NTR} (Fig. 2c). Müller and bipolar cells display TrkA immunoreactivity (Fig. 6c and d). Because NGF inhibited the swelling of isolated Müller cells (Fig. 2a), but not of isolated bipolar cells (Fig. 2b), we assume that TrkA is coupled to cell volume-regulatory intracellular signaling mechanisms in Müller cells but not bipolar cells. The

presence of TrkA-immunolabeled Müller cells (Fig. 6c) is in disagreement with a recent study that showed the absence of TrkA immunoreactivity in rat Müller cells (Kokona *et al.* 2012). However, the inhibitory effect of the TrkA inhibitor on the NGF effect in isolated Müller cells (Fig. 2c) suggests the presence of functional TrkA in Müller cells that is coupled to volume-regulatory signaling. The reasons for the different immunohistochemical data are unclear and may include, for example, the use of different rat strains and differences in the recognizability of plasma membrane stainings between retinal slices and isolated cells. Müller cells are also a source of NGF in the rat retina, as indicated by the punctate NGF labeling of isolated cells (Fig. 6a).

We found that the inhibitory effect of NGF on the osmotic swelling of bipolar cells in slices of post-ischemic retinas (Fig. 1f) was lower than that of the effect observed in slices of control retinas (Figs 1e and 3b). This may suggest a decreased efficiency of the NGF-induced glial control of the bipolar cell volume in the ischemic retina. The reasons for the decreased efficiency are unclear and may include alterations in the NGF-induced cytokine release from Müller cells and in the responsiveness of bipolar cells to glial-derived cytokines.

Dependent on specific conditions, NGF was shown to promote neuronal survival in the retina by activation of TrkA or to be neurotoxic via activation of p75^{NTR} (Ali *et al.* 2008; Coassin *et al.* 2008; Lebrun-Julien *et al.* 2009; Bai *et al.* 2010). It has been suggested that NGF may represent a promising agent for the treatment of degenerative retinal diseases such as glaucoma and age-related macular degeneration (Lambiase *et al.* 2011). However, NGF may have also TrkA-dependent detrimental effects in the retina including promotion of retinal and choroidal neovascularization, and of Müller cell proliferation (Ikeda and Puro 1994; Steinle and Granger 2003; Liu *et al.* 2010). The present data suggest that the neuroprotective effect of NGF in the retina is in part mediated by preventing the cytotoxic swelling of glial and bipolar cells that contributes to neuronal degeneration in ischemic and inflammatory retinal diseases (Bringmann *et al.* 2005).

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 1097/1, RE 849/16-1). T.B.G. was recipient of a graduate student fellowship from CNPq-Brazil. The authors have no conflicts of interest to disclose.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. The inhibitory effects of NGF on the osmotic swelling of Müller and bipolar cell somata in retinal slices are mediated by receptor transactivation.

Figure S2. Immunolocalization of NGF in slices of the rat retina.

Figure S3. Immunolocalization of TrkA in slices of the rat retina.

Figure S4. Immunolocalization of p75^{NTR} in slices of the rat retina.

References

- Ali T. K., Matragoon S., Pillai B. A., Liou G. I. and El-Remessy A. B. (2008) Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* **57**, 889–898.
- Bai Y., Dergham P., Nedev H. *et al.* (2010) Chronic and acute models of retinal neurodegeneration TrkA activity are neuroprotective whereas p75^{NTR} activity is neurotoxic through a paracrine mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 39392–39400.
- Bringmann A., Uckermann O., Pannicke T., Iandiev I., Reichenbach A. and Wiedemann P. (2005) Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol. Scand.* **83**, 528–538.
- Carmignoto G., Maffei L., Candeo P., Canella R. and Comelli C. (1989) Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J. Neurosci.* **9**, 1263–1272.
- Chakrabarti S., Sima A. A., Lee J., Brachet P. and Dicou E. (1990) Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.* **523**, 11–15.
- Coassin M., Lambiase A., Sposato V., Micera A., Bonini S. and Aloe L. (2008) Retinal p75 and bax overexpression is associated with retinal ganglion cells apoptosis in a rat model of glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **246**, 1743–1749.
- Colafrancesco V., Parisi V., Sposato V., Rossi S., Russo M. A., Coassin M., Lambiase A. and Aloe L. (2011) Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. *J. Glaucoma* **20**, 100–108.
- Dmitriev A. V., Govardovskii V. I., Schwahn H. N. and Steinberg R. H. (1999) Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis. Neurosci.* **16**, 1157–1167.
- Faktorovich E. G., Steinberg R. H., Yasumura D., Matthes M. T. and LaVail M. M. (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* **12**, 3554–3567.
- Gabriel R., Lesauter J., Silver R., Garcia-Espana A. and Witkovsky P. (2001) Diurnal and circadian variation of protein kinase C immunoreactivity in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* **439**, 140–150.
- Giardino I., Fard A. K., Hatchell D. L. and Brownlee M. (1998) Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* **47**, 1114–1120.
- Hammes H. P., Federoff H. J. and Brownlee M. (1995) Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol. Med.* **1**, 527–534.
- Harada T., Harada C., Nakayama N., Okuyama S., Yoshida K., Kohsaka S., Matsuda H. and Wada K. (2000) Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* **26**, 533–541.
- Harada T., Harada C., Kohsaka S., Wada E., Yoshida K., Ohno S., Mamada H., Tanaka K., Parada L. F. and Wada K. (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* **22**, 9228–9236.
- Harada C., Harada T., Quah H. M., Maekawa F., Yoshida K., Ohno S., Wada K., Parada L. F. and Tanaka K. (2003) Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* **122**, 229–235.
- Hauck S. M., Kinkl N., Deeg C. A., Swiatek-de Lange M., Schöffmann S. and Ueffing M. (2006) GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2746–2757.
- Hu B., Yip H. K. and So K. F. (1998) Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. *Glia* **24**, 187–197.
- Ikeda T. and Puro D. G. (1994) Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. *Brain Res.* **649**, 260–264.
- Ikeda T., Homma Y., Nisida K., Hirase K., Sotozono C., Kinoshita S. and Puro D. G. (1998) Expression of transforming growth factor- β s and their receptors by human retinal glial cells. *Curr. Eye Res.* **17**, 546–550.
- Kaur C., Sivakumar V., Yong Z., Lu J., Foulds W. S. and Ling E. A. (2007) Blood-retinal barrier disruption and ultrastructural changes in the hypoxic retina in adult rats: the beneficial effect of melatonin administration. *J. Pathol.* **212**, 429–439.
- Kokona D., Charalampopoulos I., Padiaditakis I., Gravanis A. and Themos K. (2012) The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement. *Neuropharmacology* **62**, 2106–2117.
- Krügel K., Wurm A., Linnertz R., Pannicke T., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2010) Erythropoietin inhibits osmotic swelling of retinal glial cells by Janus kinase and extracellular signal-regulated kinases/2-mediated release of vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* **165**, 1147–1158.
- Kumar B., Gupta S. K., Srinivasan B. P., Nag T. C., Srivastava S., Saxena R. and Jha K. A. (2013) Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc. Res.* **87**, 65–74.
- Lambiase A., Mantelli F., Sacchetti M., Rossi S., Aloe L. and Bonini S. (2011) Clinical applications of NGF in ocular diseases. *Arch. Ital. Biol.* **149**, 283–292.
- Lebrun-Julien F., Morquette B., Douillette A., Saragovi H. U. and Di Polo A. (2009) Inhibition of p75^{NTR} in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **40**, 410–420.
- Lenzi L., Coassin M., Lambiase A., Bonini S., Amendola T. and Aloe L. (2005) Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. *Vision Res.* **45**, 1491–1500.
- Liu X., Wang D., Liu Y., Luo Y., Ma W., Xiao W. and Yu Q. (2010) Neuronal-driven angiogenesis: role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 3749–3757.
- Mansour-Robaey S., Clarke D. B., Wang Y. C., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 1632–1636.
- Mattson M. P., Lovell M. A., Furukawa K. and Markesbery W. R. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **65**, 1740–1751.
- Mohammadi M., Froum S., Hamby J. M., Schroeder M. C., Panek R. L., Lu G. H., Eliseenkova A. V., Green D., Schlessinger J. and Hubbard S. R. (1998) Crystal structure of an angiogenesis inhibitor

- bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* **17**, 5896–5904.
- Nakamura K., Harada C., Okumura A., Namekata K., Mitamura Y., Yoshida K., Ohno S., Yoshida H. and Harada T. (2005) Effect of p75^{NTR} on the regulation of photoreceptor apoptosis in the *rd* mouse. *Mol. Vis.* **11**, 1229–1235.
- Ogilvie J. M., Speck J. D. and Lett J. M. (2000) Growth factors in combination, but not individually, rescue *rd* mouse photoreceptors in organ culture. *Exp. Neurol.* **161**, 676–685.
- Pannicke T., Iandiev I., Uckermann O., Biedermann B., Kutzera F., Wiedemann P., Wolburg H., Reichenbach A. and Bringmann A. (2004) A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 493–502.
- Sampath D., Jackson G. R., Werrbach-Perez K. and Perez-Polo J. R. (1994) Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J. Neurochem.* **62**, 2476–2479.
- Sievers J., Hausmann B., Unsicker K. and Berry M. (1987) Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retina ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci. Lett.* **76**, 157–162.
- Siliprandi R., Canella R. and Carmignoto G. (1993) Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 3232–3245.
- Skatchkov S. N., Eaton M. J., Shuba Y. M. *et al.* (2006) Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial cells. *Glia* **53**, 266–276.
- Steinle J. J. and Granger H. J. (2003) Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton. Neurosci.* **108**, 57–62.
- Stepinac T. K., Chamot S. R., Rungger-Brändle E., Ferrez P., Munoz J. L., Van Den Bergh H., Riva C. E., Pournaras C. J. and Wagnieres G. A. (2005) Light-induced retinal vascular damage by Pd-porphyrin luminescent oxygen probes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 956–966.
- Sun X., Xu X., Wang F., Zhang X., Yu Z., Lu H. and Ho P. C. (2007) Effects of nerve growth factor for retinal cell survival in experimental retinal detachment. *Curr. Eye Res.* **32**, 765–772.
- Uckermann O., Wolf A., Kutzera F., Kalisch F., Beck-Sickingler A., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2006) Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: activation by neuropeptide Y. *J. Neurosci. Res.* **83**, 538–550.
- Vogler S., Grosche A., Pannicke T., Ullbricht E., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2013) Hypoosmotic and glutamate-induced swelling of bipolar cells in the rat retina: comparison with swelling of Müller glial cells. *J. Neurochem.* **126**, 372–381.
- Wahl V., Vogler S., Grosche A., Pannicke T., Ueffing M., Wiedemann P., Reichenbach A., Hauck S. M. and Bringmann A. (2013) Osteopontin inhibits osmotic swelling of retinal glial (Müller) cells by inducing release of VEGF. *Neuroscience* **246**, 59–72.
- Wexler E. M., Berkovich O. and Nawy S. (1998) Role of the low-affinity NGF receptor (p75) in survival of retinal bipolar cells. *Vis. Neurosci.* **15**, 211–218.
- Wurm A., Pannicke T., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2008) Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. *J. Neurochem.* **104**, 386–399.