



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E**  
**BIOTECNOLOGIA**

**DOUGLAS PENAFORTE CRUZ**

**EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES E DO**  
**RECEPTOR P2Y<sub>1</sub> NO CICLO CELULAR EM PROGENITORES**  
**RETINIANOS TARDIOS DE RATOS**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Lucianne Fragel Madeira

**Laboratório de Desenvolvimento e Regeneração Neural**

Niterói,

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

P397e Penaforte, Douglas Cruz  
EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES E DO RECEPTOR P2Y1  
NO CICLO CELULAR EM PROGENITORES RETINIANOS TARDIOS DE RATOS  
/ Douglas Cruz Penaforte. - 2023.  
62 f.: il.

Orientador: Lucianne Fragel-Madeira.  
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,  
Instituto de Biologia, Niterói, 2023.

1. Retina. 2. Sinalização purinérgica. 3. Receptor P2Y1.  
4. Ciclo Celular. 5. Produção intelectual. I. Fragel-  
Madeira, Lucianne, orientadora. II. Universidade Federal  
Fluminense. Instituto de Biologia. III. Título.

CDD - XXX

**DOUGLAS PENAFORTE CRUZ**

**EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES E DO  
RECEPTOR P2Y<sub>1</sub> NO CICLO CELULAR EM PROGENITORES  
RETINIANOS TARDIOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Lucianne Fragel Madeira

Niterói,

2023

**DOUGLAS PENAFORTE CRUZ**

**EFEITOS DO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES E DO  
RECEPTOR P2Y<sub>1</sub> NO CICLO CELULAR EM PROGENITORES  
RETINIANOS TARDIOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

Aprovado em 24 de novembro de 2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Presidente: Dra. Lucianne Fragel Madeira

---

Membro: Dra. Luana de Almeida Pereira Baltar

---

Membro: Dra. Mariana Rodrigues Pereira

---

Membro: Dra. Marinna Garcia Azevedo Repossi

---

Revisora e Suplente: Dra. Helena Carla Castro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Regeneração Neural, do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia no Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, sob a orientação da Professora Dra. Lucianne Fragel Madeira e na vigência dos auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense (PROPPi/UFF).

## AGRADECIMENTOS

Os meus primeiros agradecimentos com certeza vão aos meus pais, por terem me proporcionado uma boa vida em todos os sentidos. À minha mãe Denise, que sempre se esforçou, as vezes além da própria capacidade, para garantir um bom futuro para mim. Apesar de todas as dificuldades, ela é a prova de que o amor supera tudo, e eu só cheguei até aqui graças a ela, fico feliz em saber que cumpro as expectativas dela e espero poder retribuir pelo menos um pouco de tudo o que ela fez por mim. Ao meu pai Cláudio, que também fez de tudo para garantir meu futuro e manter a família unida. Se tem alguém que me inspira quanto ao conhecimento e à experiência de vida, sem dúvidas é ele.

À minha irmã Brenda, que sempre foi a minha dupla na vida e nunca me abandonou. Acho que menos de um ano de diferença entre nossas idades fez com que vivêssemos juntos o tempo inteiro, frequentando as mesmas escolas e tendo diversos interesses em comum. Sem dúvidas ela foi essencial para que eu aguentasse todas as dificuldades e chegasse até aqui. À minha prima Raynna, que é praticamente a minha cara-metade. Nos falamos todo dia, não importa a data ou a distância, sempre damos um jeito de conversarmos sobre qualquer coisa, desabafar sobre qualquer problema, rir por qualquer besteira. Uma parceira inigualável de bebida e diversão garantida não importa o quão triste eu esteja. Ela é um porto seguro que me sustentou em todos os momentos bons e ruins, sempre estando ali para ajudar da melhor maneira.

Aos meus primos Bruno, Thaís e a pequena Ana Luíza, que sempre dão um jeito de trazer alegria para a minha vida. Ao meu avô Célio, que pra mim é o verdadeiro exemplo de resistência e sabedoria, é como se fosse um porto seguro que une toda a família e representa a figura mais sagrada para mim. Aos meus tios César, Célio, Penha e Margareth, que também estão sempre ali para mim, como se eu tivesse três pais e três mães, todos com o mesmo amor e zelo por mim. As reuniões de família são as melhores, cada um deles me traz uma enorme sensação de amor e segurança, e eu não poderia ser mais grato por isso.

Aos meus amigos, os maiores e melhores presentes que a UFF poderia me trazer: Beatriz, Bruno, Pedro, Clara, Marina, Mariana, Laís, Vitória e Vinícius. É impressionante como um grupo de pessoas consegue me fazer tão bem, como se todos os problemas e todas as dificuldades simplesmente não existissem. Estamos juntos desde o início e até agora não soltamos as mãos uns dos outros, eles representam da melhor forma a frase 'da UFF para a vida'. Sem dúvidas quero leva-los para a vida inteira.

Aos meus veteranos Eduardo Bressan, Rebeca Lial, Julia Paixão, Gabriel Fernandes, Renan Faustino, Mariana Lacerda e tantos outros que ajudaram muito na minha trajetória. Sem as dicas, conselhos e momentos de diversão a minha passagem pela graduação não teria sido a mesma. À Larissa Silva, Gabrielle Barbosa, Juliane Fernandes e Pedro Marinho, que entraram depois no curso, mas marcaram minha vida de uma forma maravilhosa, obrigado por todos os momentos.

Ao PPBI, membros docentes, discentes e a coordenação. Obrigado por serem tão atenciosos e me direcionarem da melhor forma.

À minha querida orientadora Lucianne, minha fonte de inspiração desde fui aluno pela primeira vez lá em 2018. Fico admirado com a força e dedicação dela, uma professora e pesquisadora incrível com a qual eu sempre aprendo muito. Apesar da agenda apertada, ela sempre dá um jeito de ser acessível e ajudar eu tudo o que for preciso. Sei que não sou um aluno perfeito, e mereço muito todos os puxões de orelha, mas obrigado por me acompanhar até aqui! Muito obrigado por tudo!

Ao pessoal do laboratório (novos e antigos): Camila, Dani, Heitor, Adrielle, Marinna Rafael, Maria, Millena, Luiz, Aline. Foram mais de dois anos convivendo com essas pessoas incríveis no meu dia-a-dia, cada um teve uma contribuição indispensável na minha vida pessoal e na minha formação profissional. Cada um se ajuda do jeito que podia e assim o laboratório continuou apesar das adversidades. Um agradecimento especial à Marinna, minha maior guia dentro do laboratório. Estivemos próximos desde o primeiro dia que pisei no laboratório, foi ela quem me ensinou a grande maioria dos procedimentos e que me guiou nos diversos textos científicos e apresentações pelas quais eu passei. Muito obrigado por ser tão atenciosa e paciente para conseguir me aturar esse tempo todo. Você com certeza sabe que nada disso aqui seria possível sem sua ajuda, e por isso sou muito grato! Aqui também cabem meus agradecimentos ao Gustavo. Apesar de todos sempre dizerem que ele ‘atrapalha a ciência’, ele também me ajudou muito ao longo desses anos e tudo que ele fez por mim e pelo laboratório todo é indispensável. Muito obrigado por me aceitarem e me aturarem, e sobretudo me ensinarem tudo ao longo desses anos. Também não estaria aqui se não fossem vocês!

Aos membros da minha banca Dra. Luana de Almeida Pereira Baltar, Dra. Mariana Rodrigues Pereira, Dra. Marinna Garcia Azevedo Repposi e Dra. Helena Carla Castro, por terem aceitado o convite e disponibilizado seu tempo para analisar minha dissertação de mestrado, espero que gostem!

## RESUMO

A retina é um tecido localizado na parte posterior do olho e é responsável pela conversão de um estímulo luminoso em sinais elétricos, um processo conhecido como fototransdução, sendo responsável pelo sentido da visão. Nucleotídeos como o ATP e o ADP são essenciais para o desenvolvimento da retina, realizando diversos eventos através da ativação dos seus receptores específicos. Nosso grupo demonstrou a importância do receptor P2Y<sub>1</sub> e das E-NTPDases na proliferação de neuroblastos da retina com 5 dias pós-natais (P5). Nessa idade, a inibição das ectonucleotidases aumentou a proliferação na retina em 30%, enquanto o bloqueio do P2Y<sub>1</sub>R diminuiu o número de células em proliferação em aproximadamente 35%. Com isso, nosso objetivo foi analisar os efeitos do aumento da disponibilidade de nucleotídeos de adenina e da inibição de P2Y<sub>1</sub> na retina de ratos P4 *in vivo*, idade em que a taxa de proliferação celular é baixa. Foram utilizados ratos da linhagem Lister Hooded com idades de P4 à P7. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (UFF) sob número 2311120422. Ratos Lister Hooded P4 foram anestesiados por hipotermia e foram realizadas injeções intravítreas de ARL 67156 (inibidor das ectonucleotidases), MRS 2179 (antagonista seletivo do receptor P2Y<sub>1</sub>), LY294002 (inibidor da PI3K) e salina tamponada com fosfato concentrada (PBS) 0,01M nos experimentos referentes ao ciclo celular, ou DMSO 1% nos experimentos referentes às vias de sinalização. A proliferação celular foi avaliada por imuno-histoquímica para Ki-67, fosfo-histona H3 (mitose), ciclina D1 e 27 (fase G1) e ciclina A (fases S/G2). A expressão das proteínas do ciclo celular ciclina D1 e 27 (fase G1), após os tratamentos, foram analisadas através da técnica de Western Blot. Inicialmente, ao analisar as etapas do ciclo celular por imuno-histoquímica, tanto o tratamento com ARL 67156 quanto com MRS 2179 pareceram ser incapazes de alterar a expressão das proteínas fosfo-histona H3, ciclina D1, p27<sup>KIP1</sup> e ciclina A. O ensaio de Western Blot corrobora com esse dado, já que na análise a expressão proteica de ciclina D1 e 27 permaneceu inalterada após os tratamentos. Por fim, verificamos por qual via de sinalização acontecia o aumento de células proliferantes causado pelo uso do ARL *in vivo*. O resultado preliminar sugere que a inibição da via da PI3K/AKT pode ser capaz de reverter o efeito proliferativo causado pela inibição das ectonucleotidases. Portanto, nossos dados sugerem que E-NTPDases e o receptor P2Y<sub>1</sub> modulam a proliferação, porém sem afetar as proteínas do ciclo celular analisadas nas retinas de ratos recém-nascidos *in vivo*. Porém, mais experimentos são necessários para analisar outros marcadores do ciclo celular e também de diferenciação, além de avaliar outras vias de sinalização que possam estar envolvidas.

**Palavras-chave:** Retina, sinalização purinérgica, receptor P2Y<sub>1</sub>, E-NTPDases e ciclo celular

## ABSTRACT

The retina is a tissue located at the back of the eye and is responsible for converting a light stimulus into electrical signals, a process known as phototransduction, being responsible for the sense of vision. Nucleotides such as ATP and ADP are essential for the development of the retina, carrying out various events through the activation of their specific receptors. Our group demonstrated the importance of the P2Y<sub>1</sub> receptor and E-NTPDases in the proliferation of retinal neuroblasts at 5 postnatal days (P5). At this age, inhibition of ectonucleotidases increased proliferation in the retina by 30%, while blocking P2Y<sub>1</sub>R decreased the number of proliferating cells by approximately 35%. Therefore, our objective was to analyze the effects of increasing the availability of adenine nucleotides and inhibiting P2Y<sub>1</sub> in the retina of P4 rats *in vivo*, an age at which the cell proliferation rate is low. Lister Hooded rats aged P4 to P7 were used. The Animal Ethics Committee (UFF) under number 2311120422 approved this project. Lister Hooded P4 rats were anesthetized by hypothermia and intravitreal injections of ARL 67156 (ectonucleotidases inhibitor), MRS 2179 (selective P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist) were performed. LY294002 (PI3K inhibitor) and 0.01M concentrated phosphate buffered saline (PBS) in experiments referring to the cell cycle, or 1% DMSO in experiments referring to signaling pathways. Cell proliferation was assessed by immunohistochemistry for Ki-67, phospho-histone H3 (mitosis), cyclin D1 and 27 (G1 phase) and cyclin A (S/G2 phases). The expression of the cell cycle proteins cyclin D1 and 27 (G1 phase), after treatments, was analyzed using the Western Blot technique. Initially, when analyzing the stages of the cell cycle by immunohistochemistry, both treatment with ARL 67156 and MRS 2179 appeared to be incapable of altering the expression of phospho-histone H3, cyclin D1, p27<sup>KIP1</sup> and cyclin A proteins. Western Blot analysis corroborates this data, since in the analysis the protein expression of cyclin D1 and 27 remained unchanged after the treatments. Finally, we verified which signaling pathway caused the increase in proliferating cells caused by the use of ARL *in vivo*. The preliminary result suggests that inhibition of the PI3K/AKT pathway may be capable of reversing the proliferative effect caused by inhibition of ectonucleotidases. Therefore, our data suggest that E-NTPDases and the P2Y<sub>1</sub> receptor modulate proliferation, but without affecting cell cycle proteins analyzed in the retinas of newborn rats *in vivo*. However, more experiments are needed to analyze other cell cycle and differentiation markers, in addition to evaluating other signaling pathways that may be involved.

**Keywords:** Retina, purinergic signaling, P2Y<sub>1</sub> receptor, E-NTPDases and cell cycle.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema da estrutura da retina madura .....	15
<b>Figura 2:</b> Esquema do ciclo celular .....	17
<b>Figura 3:</b> Esquema da retina de um animal recém-nascido .....	18
<b>Figura 4:</b> Neurogênese da retina de ratos .....	20
<b>Figura 5:</b> Receptores purinérgicos .....	22
<b>Figura 6:</b> Tipos de ectonucleotidasas .....	24
<b>Figura 7:</b> Esquema mostrando a localização dos campos quantificados por retina .....	32
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografia de imunohistoquímica para fosfo-histona H3 na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou do bloqueador do receptor P2Y1 .....	36
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografia de imunohistoquímica para fosfo-histona H3 no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou do bloqueador do receptor P2Y1 .....	37
<b>Figura 10:</b> O bloqueio das E-NTPDases e do receptor P2Y1 aparentemente não altera o número de células mitóticas tanto no centro quanto na periferia da retina .....	38
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina D1 no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e bloqueador do receptor P2Y1 ....	39
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina D1 na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e bloqueador do receptor P2Y1 .....	40
<b>Figura 13:</b> O bloqueio das E-NTPDases ou do receptor P2Y1 aparentemente não alterou a expressão de ciclina D1 na fase G1 tanto no centro quanto na periferia da retina .....	41
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para p27 <sup>KIP1</sup> no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e inibidor do receptor P2Y1 .....	42
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para p27 <sup>KIP1</sup> na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e inibidor do receptor P2Y1 .....	43
<b>Figura 16:</b> O bloqueio das E-NTPDases ou do receptor P2Y1 aparentemente não alterou a expressão de p27 <sup>KIP1</sup> na fase G1 tanto no centro quanto na periferia da retina .....	44
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina A no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou inibidor do receptor P2Y1 .....	45
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina A na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou inibidor do receptor P2Y1 .....	46
<b>Figura 19:</b> O bloqueio das E-NTPDases e do receptor P2Y1 aparentemente não altera a expressão de ciclina A na fase S/G2 tanto no centro quanto na periferia da retina .....	47
<b>Figura 20:</b> Expressão da proteína Ciclina D1 permanece inalterada após inibição das ectonucleotidasas e/ou bloqueio de P2Y1 em retina de rato com quatro dias pós-natais .....	49
<b>Figura 21:</b> Expressão da proteína p27 <sup>KIP1</sup> do ciclo celular permanece inalterada após inibição das ectonucleotidasas e/ou bloqueio de P2Y1 em retina de rato com quatro dias pós-natais .....	50

**Figura 22:** Fotomicrografia de imunohistoquímica para Ki-67 em retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e inibidor da via PI3K em diferentes concentrações ..... 52

**Figura 23:** O bloqueio da via PI3K pode estar envolvida na proliferação induzida pela inibição das ectonucleotidasas ..... 53

## LISTA DE ABREVIATURAS

5'-NT: ecto-5'-nucleotidase

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

APs: fosfatases alcalinas

ARL 67156: sal 6-N, N-Dietil-D- $\beta$ ,  $\gamma$ -dibromometileno ATP trissódico

ATP: adenosina trifosfato

BSA: albumina sérica bovina

CCG: camada de células ganglionares

CDK : cinase dependente de ciclina

CKI: inibidores de CDK

CNB: camada neuroblástica

CNE: camada nuclear externa

CG: células ganglionares

CNI: camada nuclear interna

CNX: Conexina

CO: coróide

CPE: camada plexiforme externa

CPI: camada plexiforme interna

DAB: diaminobenzidina

E-NPP: ecto-nucleotídeo pirofosfatases

E-NTPDase: ecto-nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases

EPR: epitélio pigmentado da retina

IAP: fosfatase alcalina intestinal

MNI: migração nuclear intercinética

MRS 2179: 2'-Deoxi-N6-metil adenosina

NO: nervo óptico

NPP: nucleotídeo pirofosfatases

NT: Transportador de nucleotídeo

NTPDase: nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases

OCT: Optimum cutting temperature

P (x): animal com x dias pós-natal

PBS: salina tamponada com fosfato

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

Pi: fosfato inorgânico

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase

PLAP: fosfatase alcalina placentária

PNX: Panexina.

PPi: pirofosfato

SEF: segmento externo dos fotorreceptores

SNC: sistema nervoso central

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador beta

TNAP: fosfatase alcalina não tecido-específica

TUNEL: terminal deoxinucleotidil transferase dUTP

UDP: uridina difosfato

UTP: uridina trifosfato

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. A RETINA .....</b>	<b>14</b>
1.1.1. A RETINA COMO MODELO DE ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) .....	14
1.1.2. ESTRUTURA DA RETINA MADURA DE VERTEBRADOS .....	14
1.1.3. CICLO CELULAR E DESENVOLVIMENTO DA RETINA.....	16
1.1.4. NEUROGÊNESE DA RETINA DE VERTEBRADOS.....	19
<b>1.2. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E O DESENVOLVIMENTO DA RETINA.....</b>	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1. MATERIAIS UTILIZADOS .....	28
3.2. ANIMAIS.....	29
3.3. INJEÇÃO INTRAVÍTREA .....	29
3.4. PREPARAÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO.....	30
3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA .....	30
3.6. IMUNOFLORESCÊNCIA.....	31
3.7. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS .....	31
3.8. WESTERN BLOTTING .....	32
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. INIBIÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES E ANTAGONISMO DO RECEPTOR P2Y1 PARECE NÃO ALTERAR O CICLO CELULAR NA RETINA EM DESENVOLVIMENTO .....	34
4.2. A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PI3K/AKT PODE ESTAR ENVOLVIDA NA PROLIFERAÇÃO INDUZIDA PELO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES <i>IN VIVO</i> .....	51
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A RETINA

### *1.1.1. A retina como modelo de estudo do Sistema Nervoso Central (SNC)*

O olho consiste em estruturas físicas únicas, contendo células com uma coleção de moléculas com uma bioquímica complexa, sendo local de respostas fisiológicas únicas (LONDON; BENHAR; SCHWARTZ, 2013). A retina é um tecido que está localizado na parte posterior do olho e é responsável pela conversão de estímulos luminosos em sinais elétricos, um processo conhecido como fototransdução, sendo responsável pelo sentido da visão (VINBERG e cols., 2018).

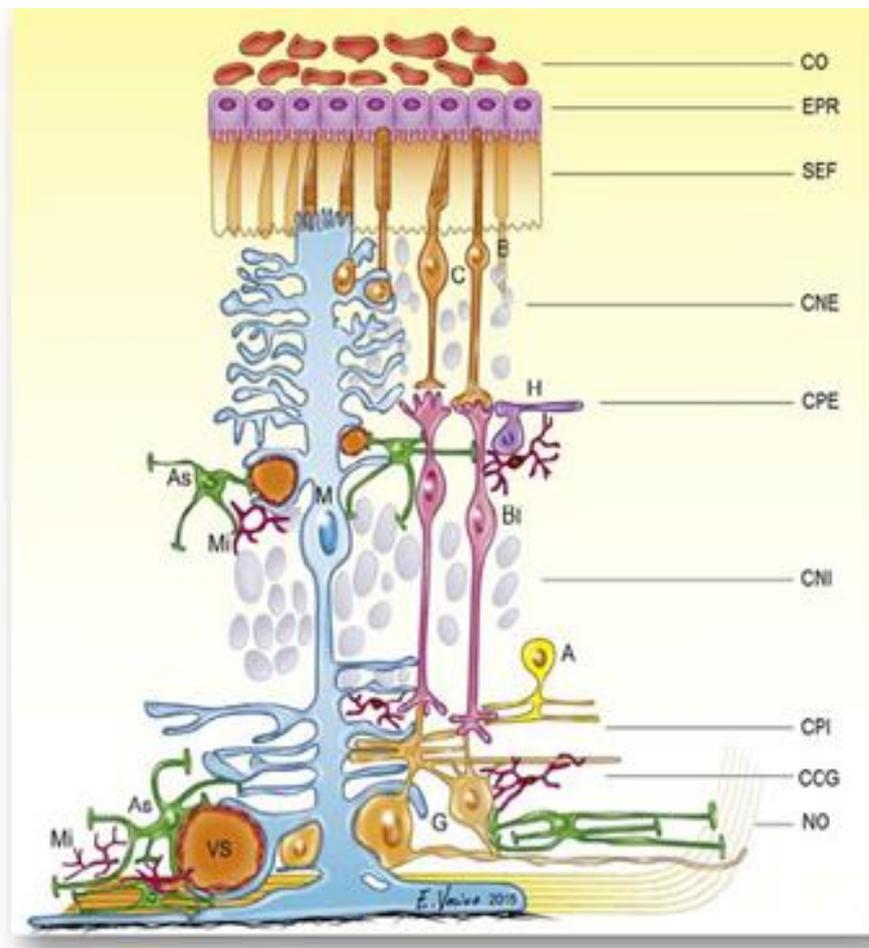
Em mamíferos, a retina é composta por tipos celulares específicos, dentre os quais estão os fotorreceptores, interneurônios, células ganglionares e células gliais (DEMB; SINGER, 2015). Durante o desenvolvimento embrionário, a retina e o nervo óptico projetam-se do diencéfalo e, portanto, são considerados parte do SNC (LONDON; BENHAR; SCHWARTZ, 2013). Além disso, por possuir uma localização mais acessível, sua manipulação facilitada com métodos menos invasivos a tornam um modelo ideal para o estudo do Sistema Nervoso Central, em eventos como proliferação, diferenciação e morte celular desses neurônios (AGRANOFF e cols., 1980).

### *1.1.2. Estrutura da retina madura de vertebrados*

A retina de vertebrados é uma estrutura estratificada e formada por 6 tipos celulares distintos: os fotorreceptores (cones e bastonetes), células ganglionares, bipolares e interneurônios (células amácrinas e horizontais). Além deles, as células gliais (microglia, Glia de Müller e astrócitos) também estão presentes para preservar a homeostase do tecido (HOON e cols., 2014).

A retina é extremamente organizada e seus tipos celulares se organizam em camadas. Os corpos celulares dos fotorreceptores cones e bastonetes compõem a camada nuclear externa (CNE). Já a camada nuclear interna (CNI) apresenta os corpos celulares das células amácrinas, bipolares e horizontais. A camada mais interna da retina, chamada de camada de células

ganglionares (CCG), compreende as células ganglionares, cujos axônios originam o nervo óptico, que conduz a informação visual aos centros superiores da visão, e também algumas células amácrinas deslocadas. Entre essas diferentes camadas celulares encontram-se as camadas plexiformes externa e interna (CPE e CPI), onde ocorrem os contatos sinápticos entre as células da retina (HOON e cols., 2014; KEELEY e cols., 2013). O corpo celular da glia de Müller, por sua vez, também se localiza na camada nuclear interna, porém seus prolongamentos percorrem todas as camadas da retina (WÄSSLE, 2004). Ademais, o epitélio pigmentar da retina está presente em contato com o segmento externo dos fotorreceptores, e sua função é absorver a energia luminosa e fornecer suporte vascular ao tecido (AO e cols., 2018; STRAUSS, 2005) (Figura 3).



**Figura 1: Esquema da estrutura da retina madura.** A imagem mostra a divisão das células da retina de um mamífero adulto em camadas: CO: coróide; EPR: epitélio pigmentar da retina; SEF: segmento externo dos fotorreceptores; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares; NO: nervo óptico; VS: vasos sanguíneos. Nessa divisão. Existem 7 tipos celulares: bastonetes (B), cones (c), horizontais (H), Astrócitos (As), bipolares (Bi),

amácrinas (A), ganglionares (G). Além desses, outros tipos celulares que são encontrados ao longo da retina são a Microglia (Mi), Glia de Muller (M) Esquema modificado de VECINO e cols., 2015.

Na visão, os fotorreceptores transformam energia luminosa em sinais elétricos para que a imagem consiga ser formada nos centros superiores do cérebro. Essa informação visual é transferida através de conexões sinápticas pelas células horizontais e bipolares para as células ganglionares, cujos axônios se unem para formar o nervo óptico e carregar o sinal elétrico até o centro visual do cérebro (MOORE e cols., 2016; SELHORST; CHEN, 2009).

Apesar de estruturas e tipos celulares semelhantes, há algumas especializações neuronais ao longo das espécies, principalmente quando se trata da circuitaria associada aos fotorreceptores. A retina de camundongos, por exemplo, além dos bastonetes, contém a divisão dos fotorreceptores do tipo cone em dois tipos: os que contém opsinas de onda curta (cerca de 5%) e os que coexpressam opsinas de onda média e longa – verde e vermelho (cerca de 95%) (APPLEBURY e cols., 2000; HAVERKAMP e cols., 2005; NIKONOV e cols., 2006; RÖHLICH; VAN VEEN; SZÉL, 1994). Retinas de macaco, por sua vez, possuem três tipos de cones, cada um com um tipo diferente de opsina (para as cores azul, verde e vermelho), que são igualmente expressas na retina. Já o peixe-zebra contém quatro tipos de fotorreceptores do tipo cone, sendo um deles sensível à luz ultravioleta (HOON e cols., 2014).

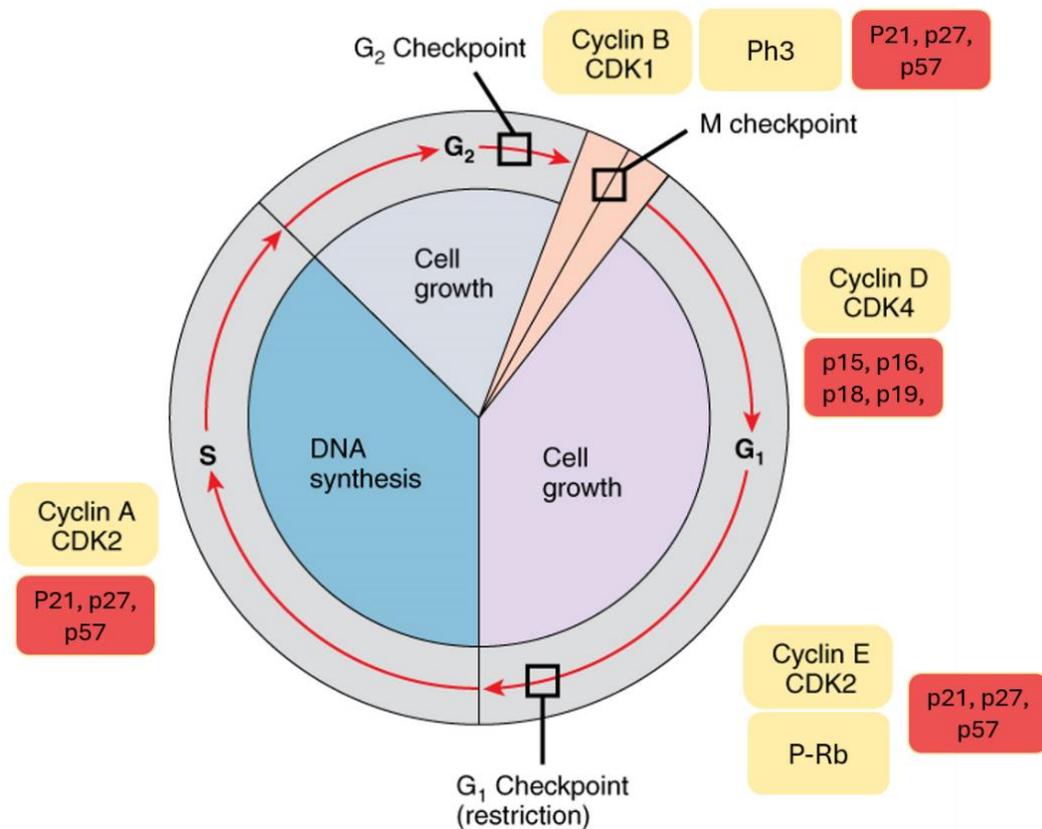
### *1.1.3. Ciclo Celular e desenvolvimento da retina*

Na retina em desenvolvimento, há a presença de células multipotentes que podem dar origem a qualquer um dos tipos celulares da retina, chamadas de células neuroblásticas. Essas células estão em constante processo de divisão celular, no entanto nem todos os tipos surgem ao mesmo tempo (STENKAMP, 2015; TURNER; SNYDER; CEPKO, 1990).

Em uma etapa do desenvolvimento onde a proliferação celular é tão importante, o entendimento do funcionamento ciclo celular torna-se crucial para entender a formação da retina. O ciclo celular envolve proteínas regulatórias que impactam diretamente a progressão por uma sequência específica de eventos que culmina na mitose e geração de duas células filhas. De um modo geral, o ciclo pode ser morfológicamente dividido em duas fases gerais: a interfase (subdividida em G1, S e G2) e a fase M (que é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase). Nos eucariontes, a replicação do DNA ocorre na fase S, e a segregação cromossômica ocorre na mitose ou fase M. Duas fases chamados ‘Gap’ separam a fase S e a mitose, conhecidas

como G1 e G2. Estes não são períodos de inatividade, mas sim períodos em que as células ganham massa, integram sinais de crescimento, organizam um genoma replicado e se preparam para a segregação cromossômica. (DALTON, 2015; GAO; LIU, 2019; SCHAFER, 1998).

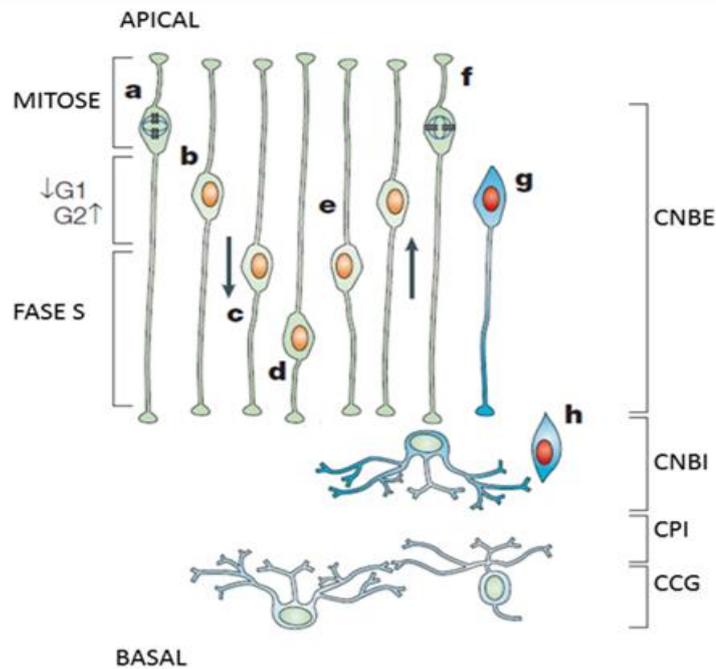
Esse processo é catalizado por enzimas que formam complexos para definir a progressão pelo ciclo: as proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e as ciclinas. As CDKs são proteínas serina/treonina cinases que fosforilam substratos-chave para promover a síntese de DNA e a progressão mitótica. A ligação à ciclina permite que CDKs inativas adotem uma configuração ativa semelhante às quinases monoméricas e ativas. Sobreposta a esta regulação, a atividade do CDK também pode ser regulada negativamente pela ligação de pequenas proteínas inibitórias, as CKIs, ou por fosforilação inibitória da tirosina que bloqueia a transferência de fosfato para substratos (figura 2) (BARNUM, 2016; DALTON, 2015).



**Figura 2: Esquema do ciclo celular.** A imagem mostra as etapas que compõem o ciclo celular, assim como as proteínas que estão envolvidas nesse processo. De um modo geral, o ciclo pode ser morfologicamente dividido em duas fases gerais: a interfase (subdividida em G1, S e G2) e a fase M (mitose). As proteínas que comandam esse processo são cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e as ciclinas (em amarelo), além de proteínas

inibitórias desse complexo, as CKIs (em vermelho). Esquema modificado do livro texto OpenStax Anatomy and Physiology, 2016.

Durante o desenvolvimento da retina, os neuroblastos que compõem a camada neuroblástica (CNB) estão em constante movimento e divisão celular. Essa é a chamada migração nuclear intercinética, em que os núcleos dos neuroblastos adotam uma movimentação vertical que é diretamente relacionada ao ciclo celular. Durante a fase G1, os núcleos se deslocam em direção à parte mais basal da camada neuroblástica, onde duplicam seu DNA na fase S. Após isso, os núcleos migram para a porção apical ao longo da fase G2, até chegarem próximos ao epitélio pigmentar, local em que ocorrerá a mitose (figura 3) (BELLE e cols., 2016; BILITOU; OHNUMA, 2010).



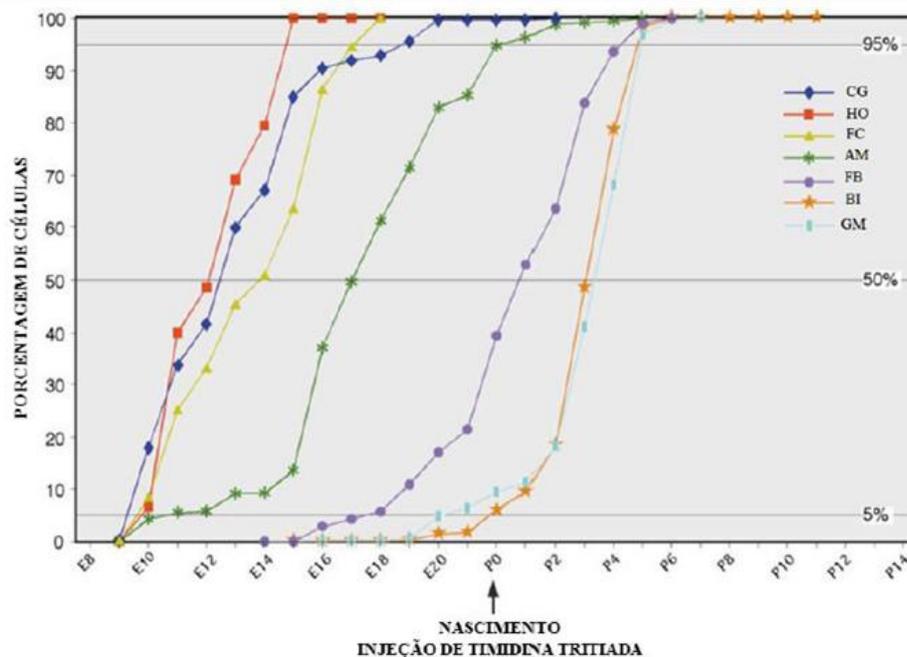
**Figura 3: Esquema da estrutura da retina de um vertebrado recém-nascido.** A imagem mostra a divisão das células da retina de um vertebrado recém-nascido em camadas: Na CNBE, os progenitores estão em proliferação, onde em cada fase do ciclo o seu núcleo se encontra em uma posição na retina, um evento chamado de migração nuclear intercinética. Neste caso, durante a mitose, o núcleo está localizado na região apical da retina (a e f), enquanto que na fase S o núcleo está na região mais basal (c, d e e). Durante as fases G1 e G2, os núcleos transitam entre a região apical e basal (b). Após a mitose, o progenitor pode continuar no ciclo celular ou se tornar uma célula pós-mitótica (g). Caso o progenitor se torne pós-mitótico ele migra em direção a CNBi, onde iniciará seu processo de diferenciação (h). CNBE: camada neuroblástica externa; CNBi: camada neuroblástica interna; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares. Esquema modificado de DYER & BREMMER., 2005.

Especificamente durante o desenvolvimento da retina, os neuroblastos estão constantemente sob a influência de fatores de crescimento extrínsecos, e as células precursoras da retina realizam uma série de mitoses para produzir um número suficiente de progenitores. Ativadores do ciclo celular, como ciclinas, CDKs e antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), são fortemente ativados e conduzem esse estágio proliferativo (BARTON; LEVINE, 2008). Os fatores de transcrição então decidem o destino dos retinoblastos, que finalmente se comprometem aos seis tipos principais de neurônios da retina (células ganglionares, amácrinas, horizontal, bipolares fotorreceptores do tipo cone e bastonetes) e um tipo de glia (células gliais de Müller), em um processo conhecido como neurogênese (GRIGORYAN, 2022).

#### *1.1.4. Neurogênese da retina de vertebrados*

Neurogênese é um processo cronológico no qual as células neuroblásticas começam a expressar fatores de transcrição que as levam a se comprometer com um determinado tipo de célula da retina para que, quando o momento for propício, essas células se diferenciem e desempenhem uma função específica (LANG, 2001). Esse processo é determinado por diversos fatores e genes que são expressos em etapas específicas do desenvolvimento pré e pós-natal (fases embrionária e tardia, respectivamente), determinando a ativação ou inibição de fatores que no futuro gerarão a diferenciação celular (LIVESEY; CEPKO, 2001; PERRON; HARRIS, 2000).

Em ratos, a neurogênese da retina se inicia no 9o dia embrionário (E9) e é finalizado 12o dia pós-natal (P12) (REESE, 2010). As primeiras células a iniciarem esse processo são as progenitoras das células ganglionares (E9 e E20) seguidas pelas progenitoras das células amácrinas começam a surgir, embora sua formação termine por volta do 2o dia pós-natal. As células horizontais são formadas entre o 12o e 17o dias embrionários, os cones são gerados entre o 14o dia embrionário e o 1º dia pós-natal. Os fotorreceptores do tipo bastonete se formam no final do período embrionário, podendo ter sua gênese até o 6o dia pós-natal. Os progenitores da glia de Müller e as células bipolares começam sua formação durante o período pós-natal podendo chegar até o 10o dia pós-natal (Figura 4) (RAPAPORT e cols., 2004; CEPKO, 2014).



**Figura 4: Neurogênese da retina de ratos.** O gráfico mostra cronologicamente o nascimento dos progenitores retinianos, prosseguindo pelo processo de neurogênese dos tipos celulares da retina madura. Os progenitores das células ganglionares são os primeiros a deixar o ciclo celular em E9, e terminam a neurogênese por volta de E18. Por último nós temos os progenitores das células bipolares e a glia de Müller deixando o ciclo celular também no final do período embrionário, podendo ter sua formação até o 7º dia pós-natal. CG: células ganglionares; HO: células horizontais; FC: fotorreceptores do tipo cone; AM: células amácrinas; FB: fotorreceptores do tipo bastonete; BI: células bipolares; GM: glia de Müller. Esquema modificado de RAPAPORT e cols., 2004.

Apesar desse padrão ser seguido de forma similar entre as espécies, os fatores que determinam o tempo de saída das células do ciclo celular e o início da diferenciação variam. Em sapos, por exemplo, a diferenciação ocorre de maneira rápida (aproximadamente 2 dias desde a saída da primeira célula) (HOLT e cols., 1988). Já em camundongos, esse processo ocorre em, aproximadamente, duas semanas. Isso mostra que, apesar da neurogênese ser um processo observado em todos os vertebrados, o padrão de ativação de fatores e genes de diferenciação não é o mesmo (AGATHOCLEOUS; HARRIS, 2009; TURNER; SNYDER; CEPKO, 1990). Uma outra característica importante da retina é que a mesma segue um gradiente de diferenciação, no qual células da região central se diferenciam primeiro que células da região periférica. (KIM e cols., 2002; VECINO e cols., 2004).

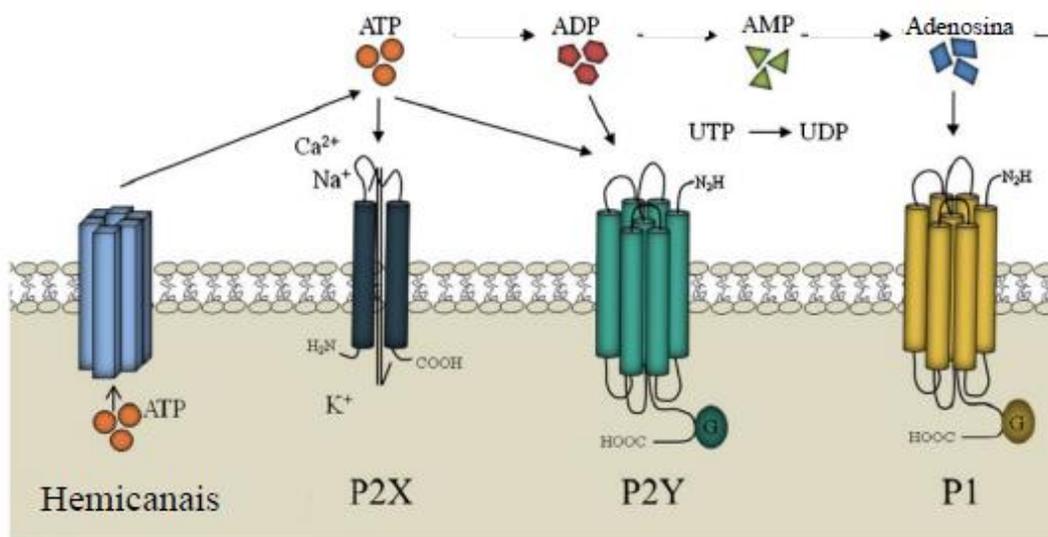
Com o passar do desenvolvimento, eventualmente a frequência de divisões celulares e do número de células progenitoras irão diminuir, já que a maioria terá se comprometido com um

certo tipo celular ou terá completado o processo de diferenciação, ou seja, terá se tornado o tipo celular ao qual se comprometeu. Porém, essa não é a única fonte de diferenciação na retina, já que as Glia de Müller são as últimas a se diferenciarem, e elas retêm uma série de fatores favoráveis à divisão. Assim, quando expostas aos fatores favoráveis como, por exemplo, o Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ), essas células podem entrar novamente no ciclo celular e dar origem a novos neurônios, já que possuem fatores intrínsecos que possibilitam a volta ao ciclo celular e a configuram como células tronco (AGATHOCLEOUS; HARRIS, 2009; CEPKO; DYER, 2000; FISCHER; REH, 2002).

## **1.2. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA**

Fatores extrínsecos e intrínsecos do organismo modulam o desenvolvimento da retina, e qualquer mudança que ocorra nesses mecanismos pode acarretar déficits funcionais e morfológicos (CEPKO; DYER, 2000). Entre os fatores extrínsecos estão os nucleotídeos de adenina, como ATP, ADP, adenosina e adenina, constituindo o sistema purinérgico que já foi provado estar envolvido em diversos processos celulares tais como proliferação, diferenciação e morte celular (LIU e cols., 2016).

O ATP pode ser liberado no meio extracelular de diversas maneiras. Basicamente, todos os tecidos e tipos celulares liberam ATP, principalmente, por meio de vesículas ou mecanismos de condução, como os hemicanais de panexina, além de por meio de lesões celulares (KAR e cols., 2012). Depois de liberado, o ATP pode ser degradado por enzimas presentes no meio extracelular, conforme será explicado adiante, gerando ADP, AMP, adenosina e adenina. ATP e ADP ativam seus receptores P2 e a adenosina ativa os receptores P1 (figura 5) (KAEBISCH e cols., 2015).



**Figura 5: Receptores purinérgicos.** Os receptores purinérgicos são divididos em receptores P1 e P2. Os P1, também conhecidos como receptores de adenosina (A), são receptores metabotrópicos subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores P2X (1-7) são ionotrópicos ativados pelo ATP, e os P2Y (1, 2, 4, 6, 11-14) são metabotrópicos e podem ser ativados por ATP, ADP, UTP e UDP. Esquema modificado de KAEBISCH e cols., 2015.

Receptores P1, também conhecidos como receptores de adenosina (A), são uma família de receptores ligados à proteína G que são expressos em, praticamente, todos os tipos celulares e participam de diversos processos fisiológicos no sistema cardiovascular, muscular, sistema nervoso, durante um processo inflamatório e de dor, entre outros (KAEBISCH e cols., 2015). Essa família de receptores é dividida em receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. A adenosina age como um ligante natural dos receptores P1 e contribui para processos fisiológicos como a proliferação celular e migração em diversos sistemas (BURNSTOCK, 2002).

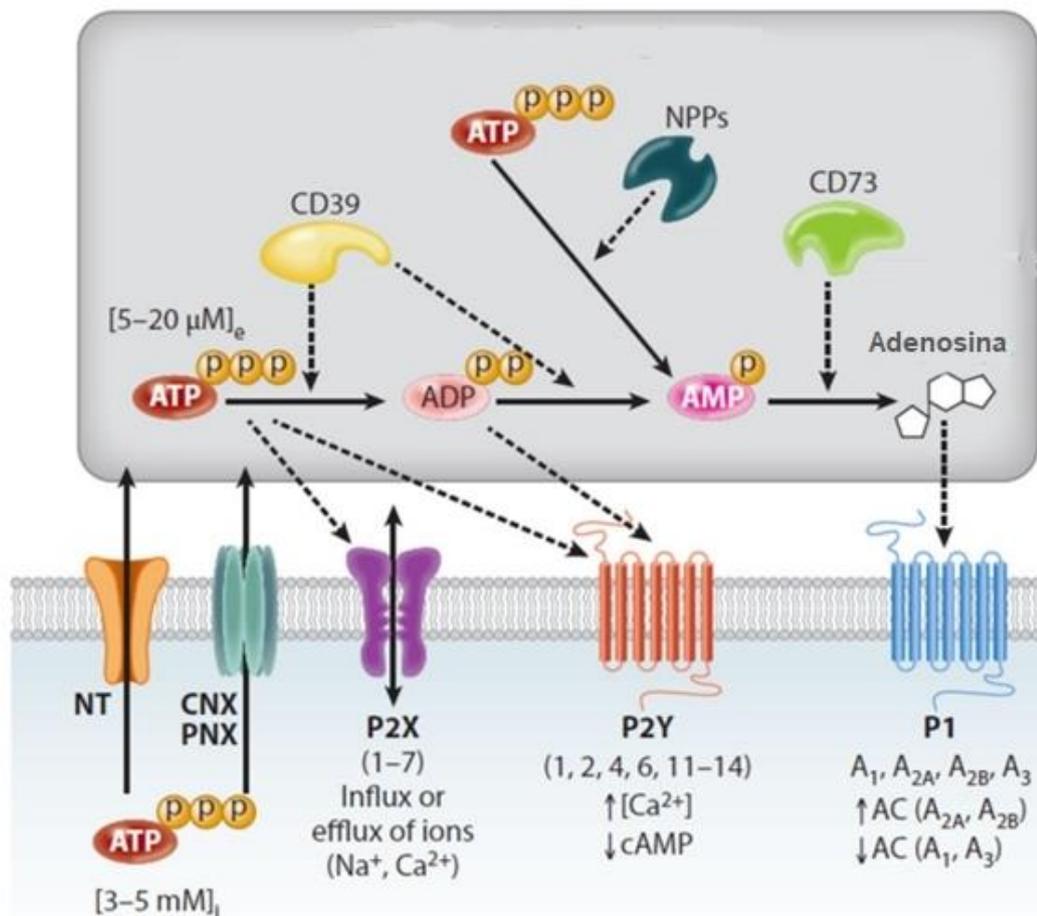
Receptores P2X são canais iônicos permeáveis à cátions e dependentes do seu ligante específico, o ATP. Até hoje, sete subtipos de receptores (P2X 1-7) são conhecidos (Kaebisch e cols., 2015). Esses receptores estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, como a modulação do tônus vascular, dor crônica, contração da bexiga urinária, agregação plaquetária, ativação de macrófagos, processos apoptóticos e interação neuro-glial (KAWANO e cols., 2012; WEWERS; SARKAR, 2009).

Receptores P2Y também são receptores ligados à proteína G. Porém, em contraste ao receptor P1, eles são ativados por nucleotídeos, como ATP, ADP, UTP e UDP (BOEYNAEMS

e cols., 2005). Existem 8 subtipos conhecidos desses receptores em tecidos humanos, conhecidos como P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>. Os números que são pulados nessa sequência representam receptores não estão presentes em mamíferos ou receptores que não apresentam nenhuma resposta funcional quando expostos aos nucleotídeos citados (Figura 4). Os receptores P2Y são expressos em vários tipos de células e desempenham papéis importantes na fisiologia e fisiopatologia, incluindo respostas inflamatórias e dor neuropática (VON KÜGELGEN, 2019), e proliferação de células endoteliais, por exemplo (MÜHLEDER e cols., 2020). Em específico o receptor P2Y<sub>1</sub> foi encontrado na retina de ratos de ratos recém-nascidos nas células neuroblásticas (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2016). Na retina de ratos adultos, esse receptor foi encontrado nas células bipolares, ganglionares e glias de Müller por RT-PCR, sendo que esse receptor está expresso em 80% das células ganglionares, 60% das células bipolares e 60% das glias de Müller. Além disso já está clara na literatura a sua participação em processos chave do desenvolvimento do SNC, como proliferação e controle do ciclo celular.

A regulação da sinalização purinérgica no meio extracelular é de extrema importância no desenvolvimento da retina, sendo que o controle da concentração de nucleotídeos de adenina é essencial para manutenção da homeostase do tecido. Com esse propósito, existem as ectonucleotidases, enzimas presentes na membrana plasmática que são responsáveis por hidrolisar uma série de nucleotídeos em nucleosídeos. De modo geral, existem 4 tipos de ectonucleotidases: as Ectonucleosídeos trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), Ectonucleotídeo pirofosfatases (NPPs), Fosfatases alcalinas (AP) e Ecto-5'-nucleotidase (5'-NT ou CD73) (Zimmermann, 2012).

As Ectonucleosídeos trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) são responsáveis por catalisar nucleotídeos que possuem somente dois ou três fosfatos associados, sendo que os nucleotídeos monofosfatados não são hidrolizados por essas enzimas. O ATP pode ser primeiramente convertido em ADP e depois perder outro fosfato para se tornar AMP (MANSOOR e cols., 2016). Existem oito tipos de NTPDases (também conhecidas como CD39): NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3, NTPDase 4, NTPDase 5, NTPDase 6, NTPDase 7 e NTPDase 8. Porém, dentre estas, somente quatro estão ancoradas à superfície celular via domínios transmembrana, contendo sítios ativos extracelulares: NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3 e NTPDase 8, enquanto as outras quatro estão localizadas intracelularmente (figura 6) (KISHORE; ROBSON; DWYER, 2018).



**Figura 6: Tipos de ectonucleotidasas.** Depois do ATP ser liberado para o meio extracelular, pode ativar receptores purinergicos ou ser hidrolisado por diferentes tipos de ectonucleotidasas. As Ecto-nucleotídeo pirofosfatases (E-NPPs) são ectonucleotidasas que conseguem hidrolisar o ATP diretamente em AMP, enquanto as Ectonucleosídeos trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases/CD39) quebram o ATP em ADP e ADP em AMP. A ectonucleotidase ecto-5'-nucleotidase (5'-NT/CD73) hidrolisa o AMP em adenosina que ativa os receptores P1. NT: Transportador de nucleotídeo; CNX: Conexina; PNX: Panexina. Esquema modificado de KISHORE, B. K. e cols., 2018.

As enzimas Ecto-nucleotídeo pirofosfatases (NPPs) quebram o ATP diretamente em AMP. Existem sete tipos de NPPs (NPP1-7), porém, do ponto de vista da sinalização purinérgica, apenas três NPPs são relevantes, já que somente essas possuem domínios extracelular largo: NPP1, NPP2 e NPP3. Com exceção da NPP2, todas as outras NPPs são proteínas transmembrana (BOLLEN e cols., 2000; GODING; GROBBEN; SLEGGERS, 2003). Essas enzimas hidrolisam uma variedade de substratos, incluindo polifosfatos de diadenosina e ligações fosfodiéster e pirofosfato de nucleotídeos (AL-RASHIDA e cols., 2017). São

responsáveis também pelo controle de nucleotídeos de adenina no meio extracelular, convertendo ATP em AMP (KISHORE; ROBSON; DWYER, 2018).

Fosfatases alcalinas (AP) são divididas em dois tipos: a fosfatase alcalina não tecido-específica (TNAP) e a fosfatase alcalina tecido-específica. Essa última é subdividida em três tipos: fosfatase alcalina intestinal (IAP), fosfatase alcalina de células germinativas (GCAP) e a fosfatase alcalina placentária (PLAP). Essas enzimas hidrolisam uma grande variedade de substratos fosfatados, sendo espalhadas por todo o corpo. São responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos purinergicos monofosfatados (AL-RASHIDA e cols., 2017).

A Ecto-5'-nucleotidase (5'-NT ou CD73) é uma enzima ancorada à membrana celular via ligação com glicosil fosfatidilinositol (GPI). Essa enzima é responsável pela hidrólise do AMP em adenosina (AL-RASHIDA e cols., 2017).

Apesar de existirem essas quatro famílias diferentes de ectonucleotidases, focaremos nas E-NTPDases, já que estas são estão presentes em diversos tipos celulares da retina, além de serem as ectonucleotidases que hidrolisam o ATP e ADP, os nucleotídeos fosfatados com maior abundancia na retina (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

### **1.3. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E O DESENVOLVIMENTO DA RETINA**

Nosso grupo já vem trabalhando com o desenvolvimento de progenitores retinianos de ratos há alguns anos, utilizando outras idades de roedores e obtendo resultados que já foram publicados em revistas internacionais (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017, 2018). Os resultados mostram a participação de receptores purinérgicos, como por exemplo os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> com o desenvolvimento da retina. Foi visto também que quaisquer alterações na concentração dos nucleotídeos de adenina, que podem ser provenientes, por exemplo, da desregulação das ectonucleotidases, pode impactar de maneira significativa o desenvolvimento dos progenitores retinianos.

Resultados prévios do nosso grupo vêm mostrando que ratos com quatro dias pós-natal (P4) da linhagem Lister Hooded, após injeção intravítrea de 200 µM de ARL 67156, inibidor das E-NTPDases, tiveram aumento significativo de cerca de 30% no número de células Ki-67 positivas (marcador de proliferação celular) no centro e na periferia da retina após 24 horas. Mas, quando analisamos essas regiões 48 e 72 horas depois, observamos que o número de

células proliferantes eram iguais ao seu controle. Por outro lado, a avaliação de morte celular nessas células por ensaio de TUNEL, mostrou que, após 24 horas, os animais tratados com ARL 67156 200  $\mu$ M apresentam uma redução de 40% no número de células apoptóticas em relação ao seu controle. Porém, após 72 horas, os animais tratados com esse fármaco apresentam um aumento de células marcadas para TUNEL. Além disso, observamos que a inibição tanto da via da ERK quanto da AKT *in vitro* reverteu o efeito causado pela inibição das ectonucleotidases, enquanto que o inibidor da PKC não reverteu o seu efeito. Em virtude dos dados mencionados, sugerimos que o aumento dos níveis de ATP e ADP endógenos, gerado pela inibição das E-NTPDases, leva à proliferação dos progenitores retinianos mediado pelas vias da ERK e AKT mas não pela via da PKC. Por fim, trabalhos antigos do grupo já comprovaram a participação dos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> em processos chave do desenvolvimento de retina de ratos com dois dias pós-natal (P2).

Sabendo disso, é de grande importância para compreensão do desenvolvimento da retina esclarecer os mecanismos pelos quais essa proliferação celular ocorre, de modo a entender melhor o destino dessas células durante essa etapa tardia do desenvolvimento. Assim, para dar continuidade à essa linha de pesquisa, visamos avaliar quais receptores purinérgicos e vias de sinalização celular estão envolvidos no processo de proliferação celular e qual etapa do ciclo celular encontra-se alterada após o tratamento apresentado, por meio de estudos *in vivo*. Os resultados obtidos podem servir como base para futuras estratégias terapêuticas quando se trata de doenças retinianas, como o retinoblastoma, e má formação da retina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar como a modulação da sinalização purinérgica *in vivo* afeta a proliferação e o ciclo celular em progenitores tardios da retina de ratos recém-nascidos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar alterações nas etapas do ciclo celular após o tratamento dos animais com o inibidor das ectonucleotidases ou inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>;
- Verificar alterações na expressão de proteínas do ciclo celular após o tratamento dos animais com o inibidor das ectonucleotidases e bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub>;
- Investigar a possível participação da via PI3K/AKT na proliferação induzida pelo inibidor das ectonucleotidases após o tratamento dos animais com o antagonista do receptor P2Y<sub>1</sub> e inibidor da via da PI3K.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto envolve ratos da linhagem Lister Hooded e foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) e recebeu autorização para sua execução sob o número de protocolo CEUA no 2311120422. Todos os procedimentos seguem as normas de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.1. MATERIAIS UTILIZADOS

- 6-N,N-Dietil-D- $\beta$ - $\gamma$ -dibromometileno adenosina trifosfato (ARL67156), cat#A265;
- 2'-Deoxi-N6-metil adenosina (MRS2179), cat#3808;
- 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-onehidroclorido(LY294002), cat#L9908;
- Albumina sérica bovina (BSA), cat#A2153;
- Triton X-100, cat#23,472-9;
- 4',6-Diamidino-2-penlindole (DAPI), cat#D9542;
- Gelatina de glicerol cat#GG1;
- Paraformaldeído cat#158127 produzidos pela Sigma-Aldrich;
- OCT produzido pela Tissue-Tek, Sakura;
- Anticorpo primário anti-Ki-67, cat#556003, produzido pela BD Biosciences;
- Anticorpo primário anti-Ciclina D1, cat#2978, produzido pela Cell Signalling;
- Anticorpo primário anti- p27<sup>KIP1</sup>, cat#610241, produzido pela BD Biosciences;
- Anticorpo primário anti-Ciclina A, cat#4656, produzido pela Cell Signalling;
- Anticorpo primário anti-Fosfo-Histona H3, cat#9701, produzido pela Cell Signalling;
- Anticorpo secundário policlonal biotilado anti-camundongo, do kit ABC cat#PK-6101, produzido pela Vector Laboratories;
- Anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo Alexa Fluor™ 488, cat# A-21202, produzido pela Invitrogen;
- Anticorpo secundário fluorescente anti-coelho Alexa Fluor™ 546, cat# A-11010, produzido pela Invitrogen;
- Microseringa Hamilton modelo 95;

### 3.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Lister Hooded com 4, 5 ou 6 dias pós-natal, dependendo do objetivo do experimento. Para os experimentos de injeção intravítrea foram utilizados ratos P4 com 24, 48 ou 72h de sobrevivência. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, sob um ciclo claro-escuro de 12h/12h, com acesso à água e comida *ad libitum*. Antes do preparo do material biológico, os animais foram anestesiados por hipotermia e eutanasiados por decapitação seguida de enucleação dos olhos.

### 3.3. INJEÇÃO INTRAVÍTREA

A injeção foi realizada na cavidade intravítrea com uma microseringa Hamilton #95, calibre 26S, em animais anestesiados por hipotermia (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017, 2018; SILVERMAN, 2008). Para não haver nenhuma lesão na retina durante a injeção intravítrea, a agulha da seringa foi posicionada no limbo, área de união entre a córnea e a esclera. Em cada olho foi injetado 1 µl dos fármacos ou combinação dos seguintes fármacos: ARL 67156 (inibidor das ectonucleotidases), MRS 2179 (antagonista seletivo do receptor P2Y<sub>1</sub>), LY294002 (inibidor da PI3K) e salina tamponada com fosfato concentrada (PBS) 0,01M nos experimentos referentes ao ciclo celular ou DMSO 1% nos experimentos referentes às vias de sinalização como fármacos controle. Os fármacos utilizados foram previamente diluídos em água ultrapura ou DMSO 1% (Ly294002) e armazenados à -4°C. Após a injeção intravítrea os animais foram submetidos a 24, 48 ou 72 horas de sobrevivência de acordo com o experimento realizado. Uma injeção intravítrea de fármaco foi realizada em ambos os olhos de um animal de cada ninhada, portanto, considerando isso como uma duplicata. Para cada ponto experimental, usamos pelo menos três filhotes diferentes de três ninhadas diferentes.

Para análise do envolvimento das vias de sinalização na proliferação de progenitores na retina após inibição das ectonucleotidases e do receptor P2Y<sub>1</sub>, foi necessária a realização de uma curva de concentração, uma vez que não existem na literatura dados sobre a injeção intravítrea dos fármacos que serão utilizados. Com esse objetivo, foi injetado 1 µl dos fármacos ou combinação dos seguintes fármacos: ARL 67156 200 uM; LY294002 na concentração de 1 uM, 50 uM ou 100 uM; ARL 67156 200 uM + LY294002 na concentração de 1 uM, 50 uM ou

100 µM; e DMSO 1% no grupo controle.

### 3.4. PREPARAÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

Após o tempo de sobrevida, os animais foram eutanasiados por decapitação seguida da remoção dos olhos. Os olhos tiveram a córnea e o cristalino retirados e o restante do globo ocular foi fixado com paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os olhos foram lavados três vezes com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e armazenados nesta mesma solução à 4°C. No dia anterior à criosecção, os olhos e os explantes foram colocados em sacarose 30% diluída em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. No dia seguinte, os olhos foram colocados em OCT (meio de congelamento) durante 30 minutos e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os olhos foram cortados sagitalmente de maneira seriada no criostato em uma espessura de 10 µm e recolhidos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (200µg/ml). Os cortes das retinas foram coletados na mesma lâmina, ou seja, cada lâmina possuirá cortes do grupo controle e dos grupos experimentais.

### 3.5. IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas com os cortes de retina foram imersas em tampão citrato 10 mM pH 6,0 e levadas no forno de micro-ondas em potência alta até levantar fervura. Esse passo é crucial para a exposição dos epítomos, facilitando a detecção pelo anticorpo. As lâminas com os cortes foram incubadas com Triton X-100 0,5% em PBS por 15 minutos. Então, foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos para retirada do excesso de Triton X-100. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 1% de albumina sérica bovina (BSA) em 0,01M PBS por 30 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário em questão (Ki-67 [1:200] ou fosfo-histona H3 [1:100]) *overnight* à 37°C. No dia subsequente, foi adicionado o anticorpo secundário policlonal biotilado anti-camundongo ou anti-coelho, por 45 minutos, à 37°C. Posteriormente, lavamos novamente, duas vezes com PBS por 5 minutos e incubamos com os reagentes A e B do kit ABC por 30 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, a imunomarcção foi visualizada pela utilização do substrato da peroxidase, o cromógeno diaminobenzidina (DAB), na presença de peróxido de hidrogênio. Para isso utilizamos 1 ml de

DAB 1 mg/ml em Tris-HCL e misturamos com 1 ml de água oxigenada 0,02%, colocamos nas lâminas durante 7 minutos e lavamos duas vezes de 5 minutos com PBS. Em seguida, as lâminas foram montadas com gelatina de glicerol. Após a montagem, os cortes foram analisados, quantificados e fotografados utilizando microscópio óptico de campo claro.

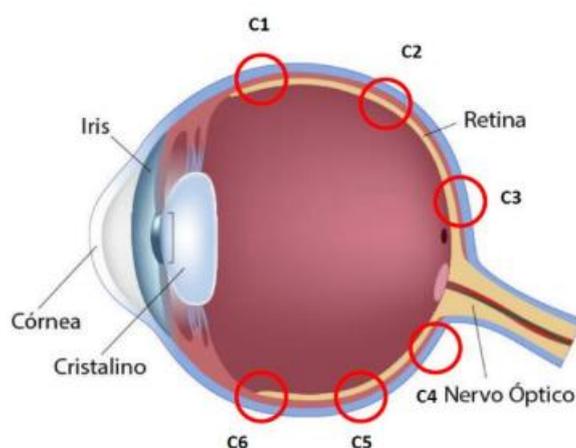
### **3.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA**

As lâminas com os cortes de retina foram submetidas aos mesmos procedimentos iniciais descritos no tópico imunohistoquímica. Sendo que após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (Ciclina D1 [1:100], ciclina A [1:100] ou p27<sup>KIP1</sup> [1:100]) a temperatura ambiente *overnight*. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-camundongo ou anti-coelho, por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, lavamos novamente, duas vezes com PBS por 5 minutos e incubamos com DAPI, durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram montadas com N-propil galato e vedadas com esmalte. Após a montagem, os cortes foram analisados, quantificados e fotografados utilizando microscópio fluorescente Leica.

### **3.7. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS**

As fotomicrografias foram obtidas no microscópio Leica SP5 através do programa LasV3.7, utilizando uma ampliação 400x para fluorescência com a área da foto de 151 x 113 µm. Para os experimentos com imunohistoquímica, foi utilizado microscópio Leica DM2500 para obtenção das fotomicrografias com o programa LasV 3.7. Com isso, utilizamos uma ampliação de 400x para campo claro com área da foto de 596 x 447 µm. Para cada corte de retina foram fotografados seis campos, seguindo uma orientação periferia-centro, no qual dois campos são referentes a periferia da retina, dois campos referentes ao centro da retina e dois campos referentes a região entre o centro e a periferia da retina. Ambos os olhos, direito e esquerdo, foram utilizados nas quantificações, gerando um total de doze campos analisados por tratamento. Uma média desses doze campos foi realizada, correspondendo a um ponto experimental da retina total (n=1). Para o gráfico da periferia da retina foi utilizado a média dos campos periféricos sendo no total quatro campos, dois campos do olho esquerdo e dois do olho

direito. Essa média correspondeu a um ponto experimental da periferia da retina (n=1). O gráfico do centro da retina foi feito do mesmo modo que o gráfico da periferia, mudando somente a região. Depois das fotos quantificadas, a área de cada campo fotografado foi estimada usando o programa Image J 1.50i. Nos experimentos de campo claro calculamos por mm<sup>2</sup> da retina enquanto nos experimentos os microscópios de fluorescência utilizamos mm<sup>2</sup> da camada neuroblástica. Nos experimentos de imunofluorescência foi feita a medição da intensidade de fluorescência com auxílio do programa Photoshop CS6, onde foi feita a média da intensidade dos pixels pela área da imagem selecionada (camada neuroblástica)



**Figura 7: Esquema mostrando a localização dos campos quantificados por retina.** Para cada retina foram utilizados seis campos, seguindo uma orientação centro-periferia. Considerando o nervo óptico como retina central, os campos C1 e C6 foram considerados periferia, os campos C2 e C5 intermediários entre centro e periferia e os campos C3 e C4, centrais. Esquema modificado de ALVES, E.F., 2015.

### 3.8. WESTERN BLOTTING

Ratos P4 tiveram suas retinas dissecadas em PBS após injeção intravítrea por 24 horas de 1 µl de ARL 67156 200 µM (inibidor das ectonucleotidases), 1 µl de MRS 2179 100 µM (antagonista seletivo do receptor P2Y<sub>1</sub>), ARL 67156 200 µM + MRS 2179 100 µM e 1µl de 0,01 M de salina tamponada com fosfato concentrada (PBS) nos animais controle. Em seguida foi adicionado, nas duas retinas, 70 µl do tampão de extração RIPA (NP-40 1%, Triton-X 100 1%, deoxicolato de sódio 1%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, PMSF 57,5 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, ortovanadato de sódio 10,2 mM e NaF 0,5mM). As retinas foram dissociadas com o auxílio de uma seringa de insulina

de 100 U enquanto mantidas em gelo. Para a dosagem do conteúdo proteico das amostras, utilizamos o método de Bradford, no qual foi empregado albumina sérica bovina (BSA 1 µg/ml) para a curva padrão nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 12 e 16 µg/mL. A curva padrão e as amostras foram medidas em um espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 595 nm. Após a dosagem adicionamos tampão de amostra (glicerol 40%, dodecilsulfato de sódio (SDS) 8%, Tris-HCl 200 mM, dithiothreitol (DTT) 400 mM, azul de bromofenol 5%) e as amostras proteicas foram fervidas por 5 minutos.

Para a eletroforese utilizamos o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% concentrado e em cada raia do gel foi aplicado 30 µg de proteína de cada amostra, sendo os volumes padronizados com tampão de extração RIPA. Para a corrida foi aplicada uma voltagem de 80mV até a saída das proteínas do gel stacking e entrada no gel running, em seguida a voltagem foi mantida a 100mV até o término da eletroforese. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando a transferência semi-seca a 25V. Para a imunodeteção, as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris-HCL (TBS, pH 7,6) contendo 0,1% Tween (TBS-T) e 5% de leite desnatado ou 5% de BSA, por uma hora e meia, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-Ciclina D1 [1:1000], anti- p27<sup>KIP1</sup> [1:1000] ou anti- $\alpha$ -tubulina [1:100.000] seguido da incubação com os respectivos anticorpos secundários. Para a revelação utilizamos o ensaio de quimioluminescência, utilizando ECL-*primer*.

### 3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Em todos os casos, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos os resultados apresentados com n igual ou superior a 3 passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os testes de análise de variância aplicados foram o One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, empregando o pós-teste de Tukey. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Todos os dados quantitativos são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de, no mínimo, três experimentos independentes realizados.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. INIBIÇÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES E ANTAGONISMO DO RECEPTOR P2Y<sub>1</sub> PARECE NÃO ALTERAR O CICLO CELULAR NA RETINA EM DESENVOLVIMENTO**

Já foi descrito extensamente na literatura como os nucleotídeos de adenina influenciam processos chave no desenvolvimento da retina (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017, 2018; SHOLL-FRANCO e cols., 2010). A partir dessa premissa, verificamos em dados previamente obtidos pelo grupo que, após o bloqueio das ectonucleotidases com o fármaco ARL 67156 na retina de ratos P4, houve um aumento inicial no número de células proliferantes, seguido de um declínio nessa proliferação. Além disso, o tratamento diminuiu inicialmente a taxa de morte celular na retina, seguido de um aumento. Nossa hipótese era de que o tratamento provocava um atraso na morte celular na retina e induzia as células a entrarem novamente no ciclo celular, aumentando a taxa proliferativa.

Além disso, também foi visto previamente que o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> com o fármaco MRS 2179 na retina de ratos P4 provocou uma diminuição duradoura no número de células proliferantes, sem apresentar alterações na taxa de morte celular. Não sabemos qual o destino dessas células após a diminuição da taxa de proliferação, visto que não houve um aumento no número de células apoptóticas. Nossa hipótese era que o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> estivesse impedindo a progressão no ciclo celular, talvez levando essas células para a diferenciação.

Considerando esses dados, tornou-se necessária a análise do ciclo celular após os tratamentos com inibidor das ectonucleotidases ou do receptor P2Y<sub>1</sub>. Para analisar isso, anticorpos específicos para cada etapa do ciclo celular foram utilizados para verificar possíveis alterações em pontos chave da proliferação celular.

Injeções intravítreas de ARL 67156 200 µM (inibidor das ectonucleotidases) ou MRS 2179 100 µM (antagonista seletivo do receptor P2Y<sub>1</sub>) foram realizadas em ratos P4. Os animais tiveram uma sobrevivência de 24, 48 ou 72 horas e depois foram eutanasiados para análise do ciclo celular. A análise foi realizada por imunohistoquímica, utilizando diferentes marcadores para etapas do ciclo celular: fosfo-histona H3, que marca células em processo de mitose; Ciclina D1

e p27<sup>KIP1</sup>, que analisam a progressão pela etapa G1; e Ciclina A, que marca células na fase S/G2.

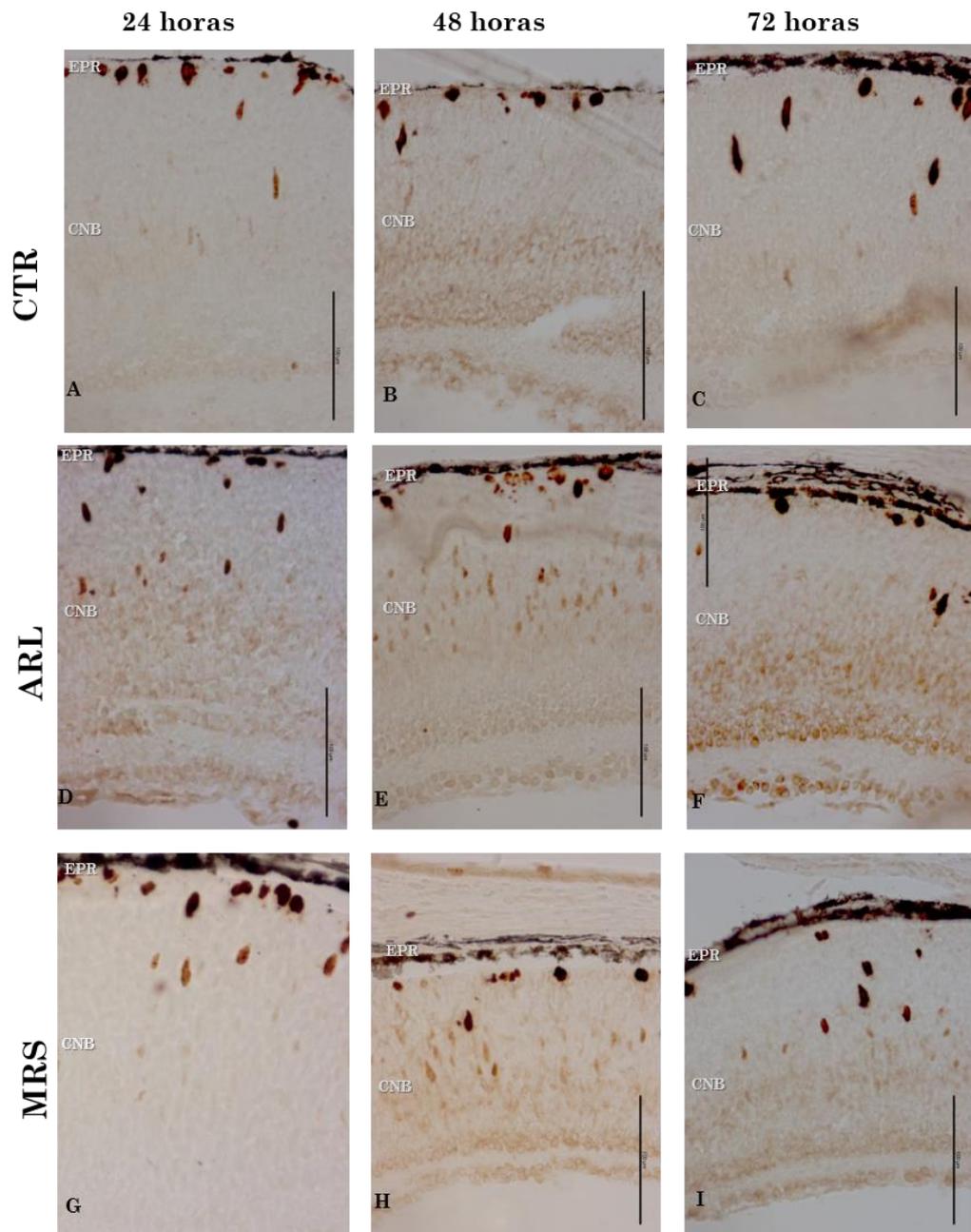
Analisando primeiramente a células em mitose, as fotomicrografias em campo claro (figuras 7 e 8) mostram as células fosfo-histona H3 positivas concentradas majoritariamente na porção apical da camada neuroblástica, condizente com o movimento nuclear intercinético, apesar de algumas células já expressarem essa proteína na transição da fase G2 para a mitose. A quantificação do número de células marcadas para fosfo-histona H3 foi realizada, não indicando alterações na taxa mitótica após os tratamentos, tanto no centro quando na periferia da retina (figura 9).

Seguindo para análise da progressão pela fase G1 do ciclo celular, as fotomicrografias fluorescentes mostram as células Ciclina D1 positivas concentradas em uma região intermediária da CNB (figuras 10 e 11). A intensidade de fluorescência da marcação para Ciclina D1 foi realizada e, aparentemente, não houve diferença após os tratamentos, tanto no centro quando na periferia da retina (figura 12).

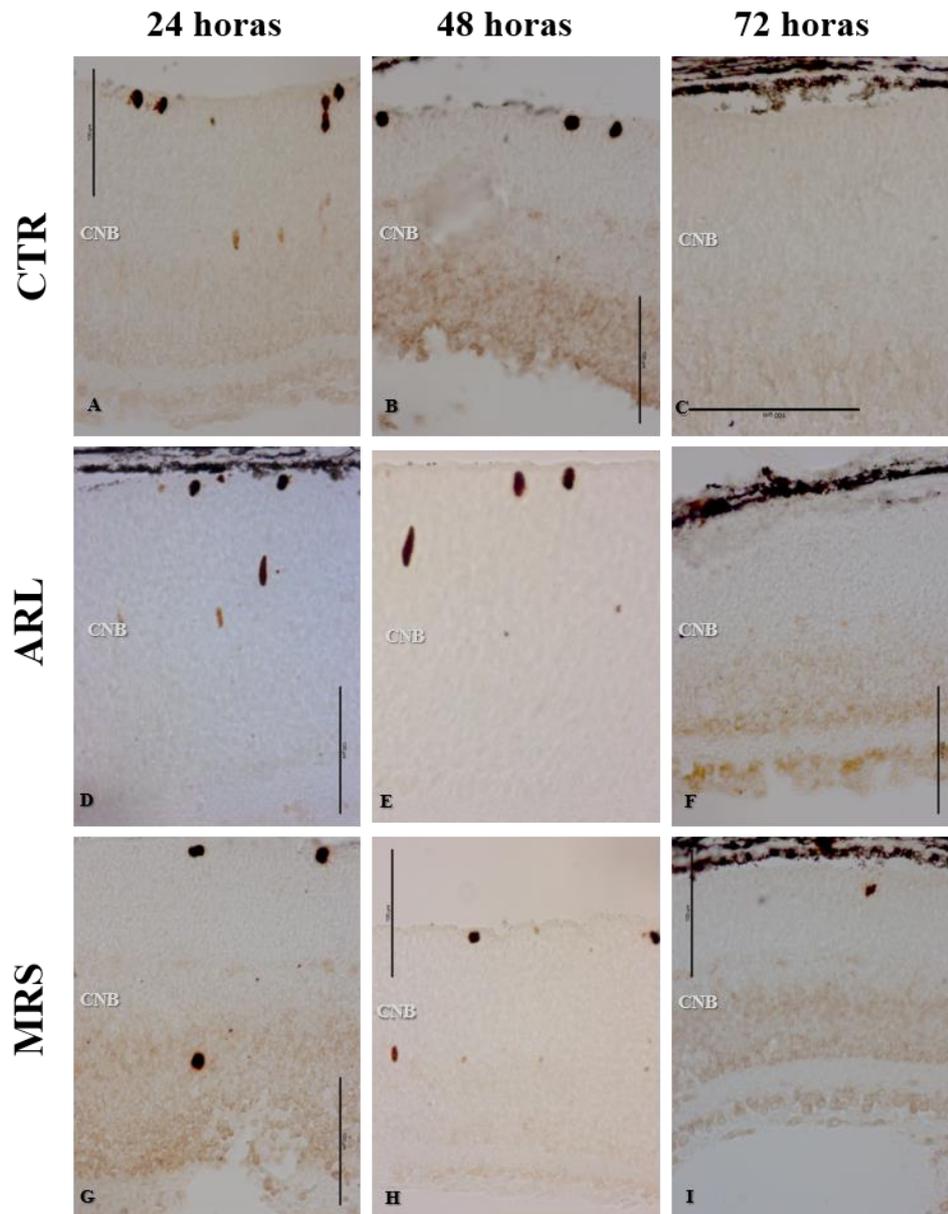
Em seguida, analisando novamente alterações na progressão pela fase G1 do ciclo celular, realizamos a imunofluorescência para a proteína p27<sup>KIP1</sup>. As fotomicrografias mostram as células p27<sup>KIP1</sup> positivas concentradas em uma região intermediária da CNB, condizente com a fase G1 (figuras 13 e 14). A intensidade de fluorescência da marcação para p27<sup>KIP1</sup> foi realizada e, aparentemente não indicando alterações na progressão pela fase G1 após os tratamentos, tanto no centro quando na periferia da retina (figura 15).

Por fim, analisando a progressão pelas fases S/G2, as fotomicrografias fluorescentes mostram as células Ciclina A positivas concentradas majoritariamente na porção basal da camada neuroblástica (figuras 16 e 17). A intensidade de fluorescência da marcação para Ciclina A foi realizada e, aparentemente não indicando alterações na progressão pela fase S/G2 após os tratamentos, tanto no centro quando na periferia da retina (figura 18).

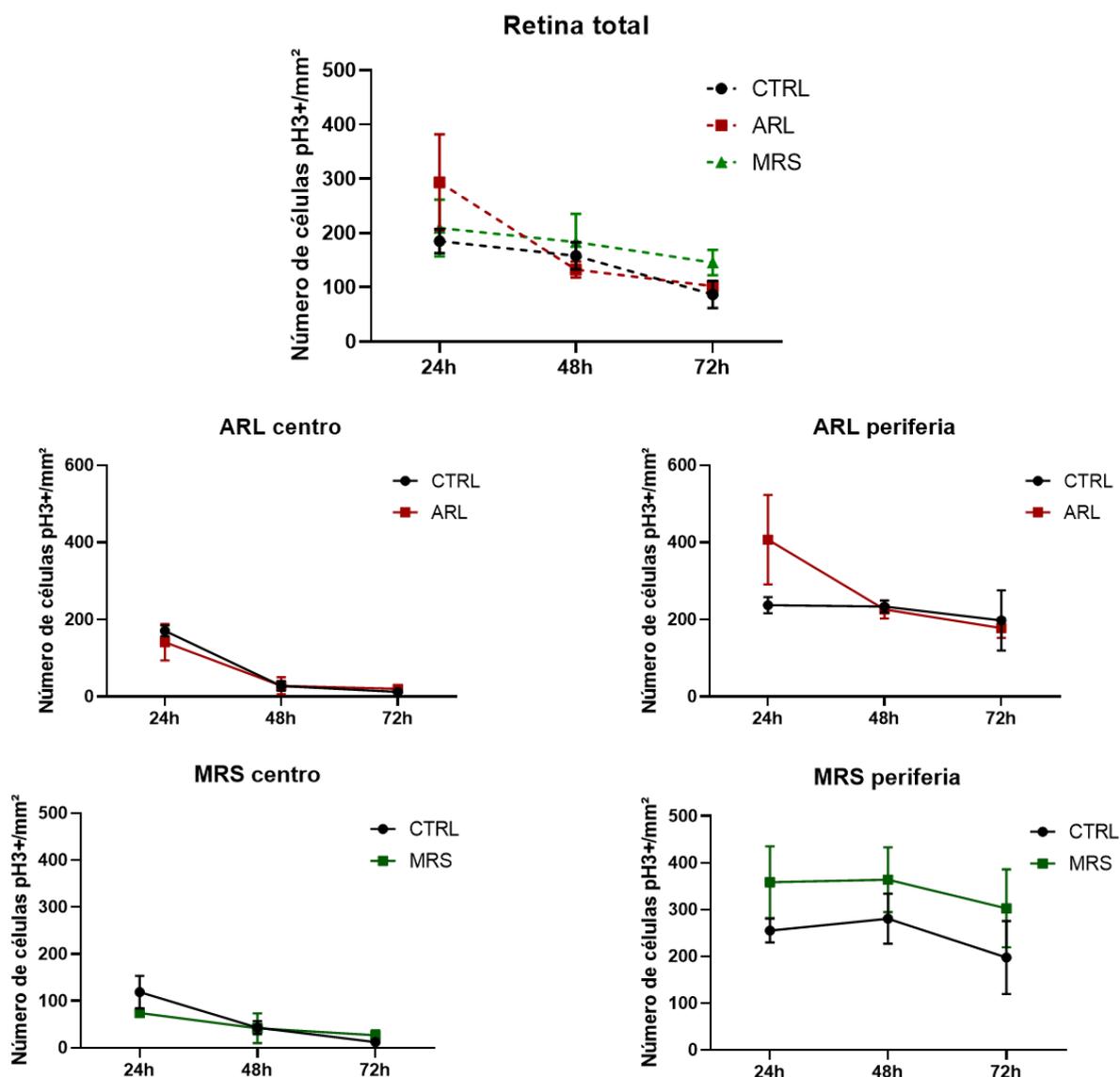
Até o momento não foi observada uma alteração significativa na etapa do ciclo celular em nenhuma das análises nas idades observadas. Apesar dos experimentos não estarem totalmente finalizados, os resultados obtidos sugerem que o tratamento com o fármaco inibidor das ectonucleotidases ou bloqueador do receptor P2Y<sub>1</sub> não alteram a expressam das proteínas relacionadas às etapas mitótica, G1 e S/G2 na retina de ratos recém-nascidos.



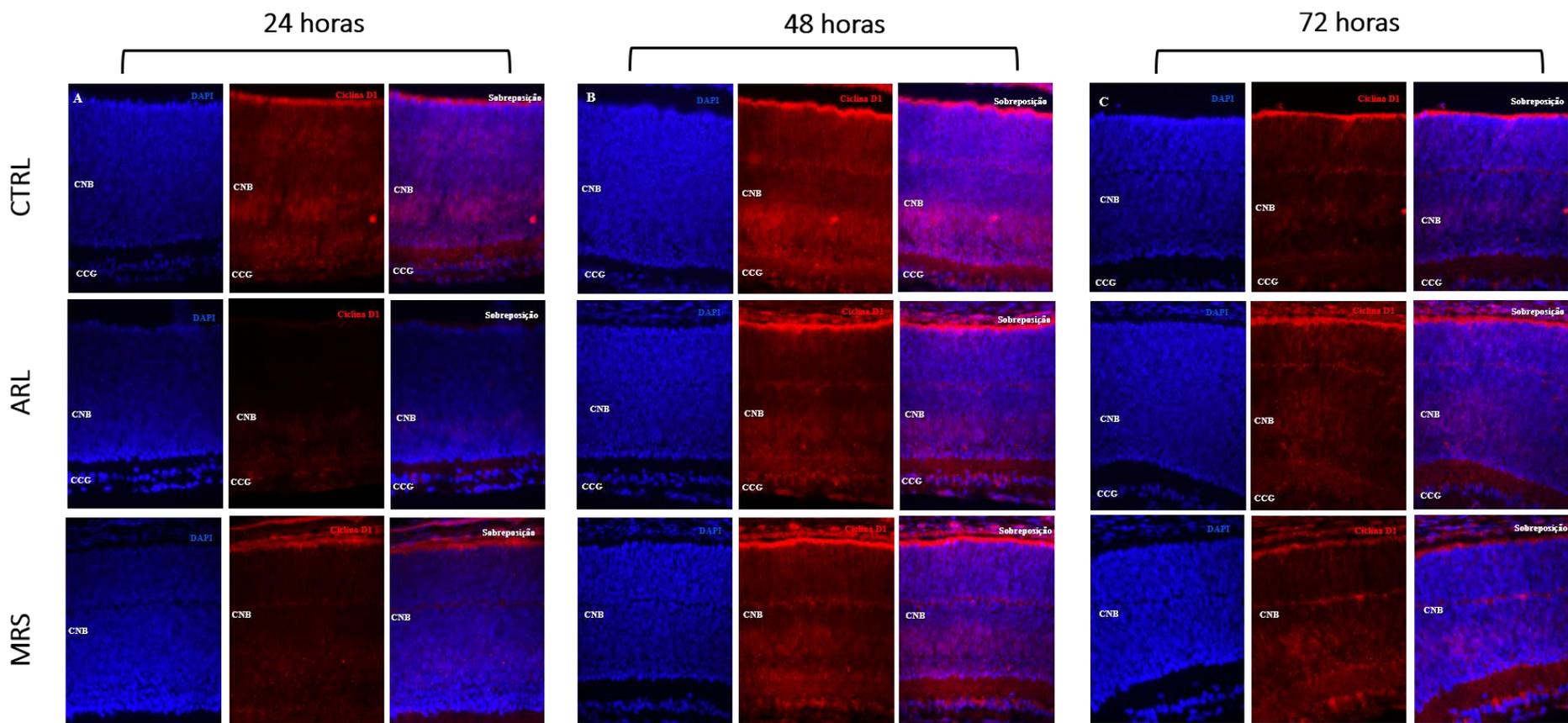
**Figura 8:** Fotomicrografia de imunohistoquímica para fosfo-histona H3 na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases ou do bloqueador do receptor P2Y<sub>1</sub>. A, B e C: retinas controle após 24, 48 e 72h de tratamento, respectivamente; D, E e F: retinas após 24, 48 e 72h de tratamento com ARL 67156, respectivamente; H, I e J: retinas após 24, 48 e 72h de tratamento com MRS 2179, respectivamente. CNB: camada neuroblástica; EPR: epitélio pigmentado da retina; CTR: controle. Barra de calibração = 100  $\mu$ M. Fotomicrografias em 400x.



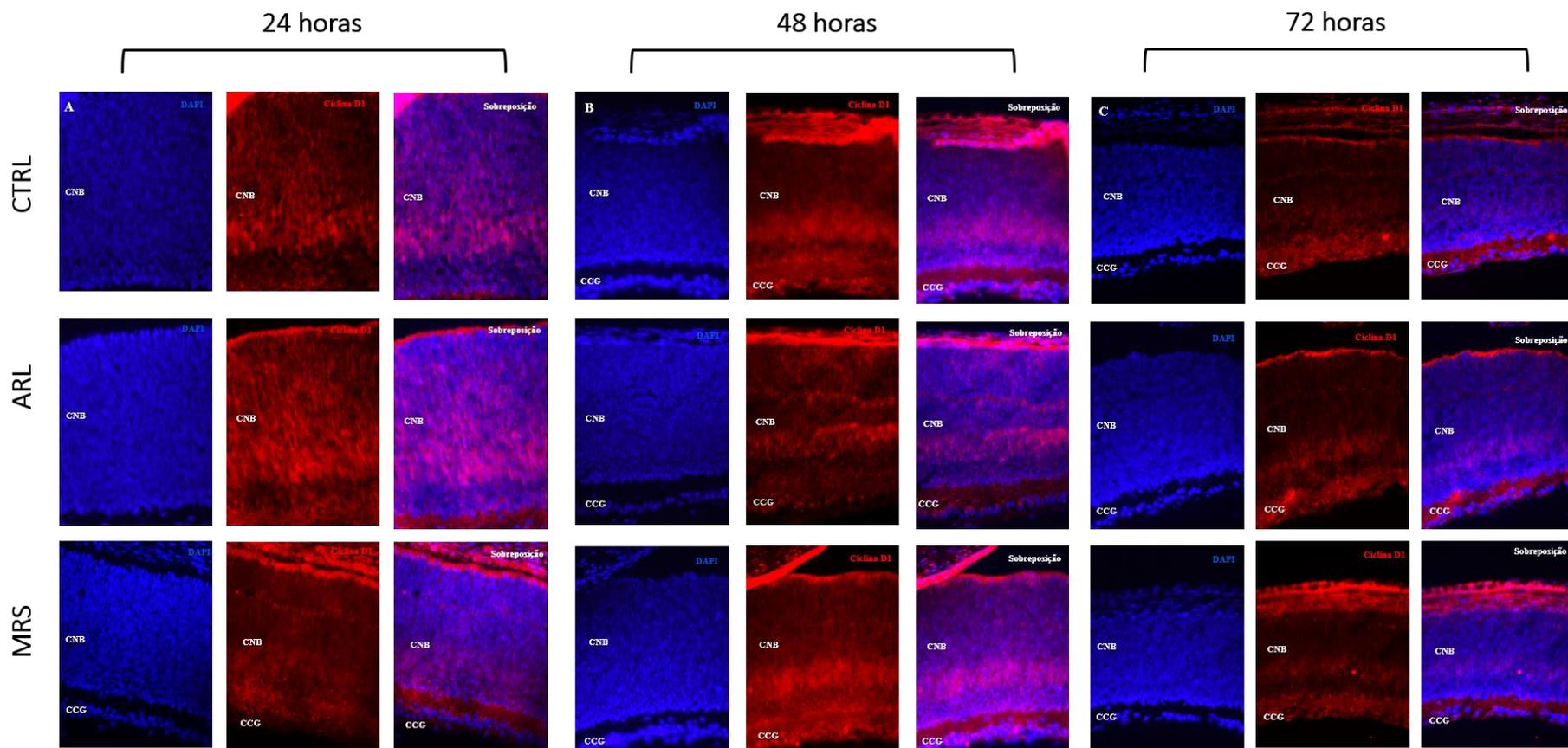
**Figura 9: Fotomicrografia de imunohistoquímica para fosfo-histona H3 no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases ou do bloqueador do receptor P2Y<sub>1</sub>. A, B e C: retinas controle após 24, 48 e 72h de tratamento, respectivamente; D, E e F: retinas após 24, 48 e 72h de tratamento com ARL 67156, respectivamente; H, I e J: retinas após 24, 48 e 72h de tratamento com MRS 2179, respectivamente. CNB: camada neuroblástica; EPR: epitélio pigmentado da retina; CTR: controle. Barra de calibração = 100 µM. Fotomicrografias em 400x.**



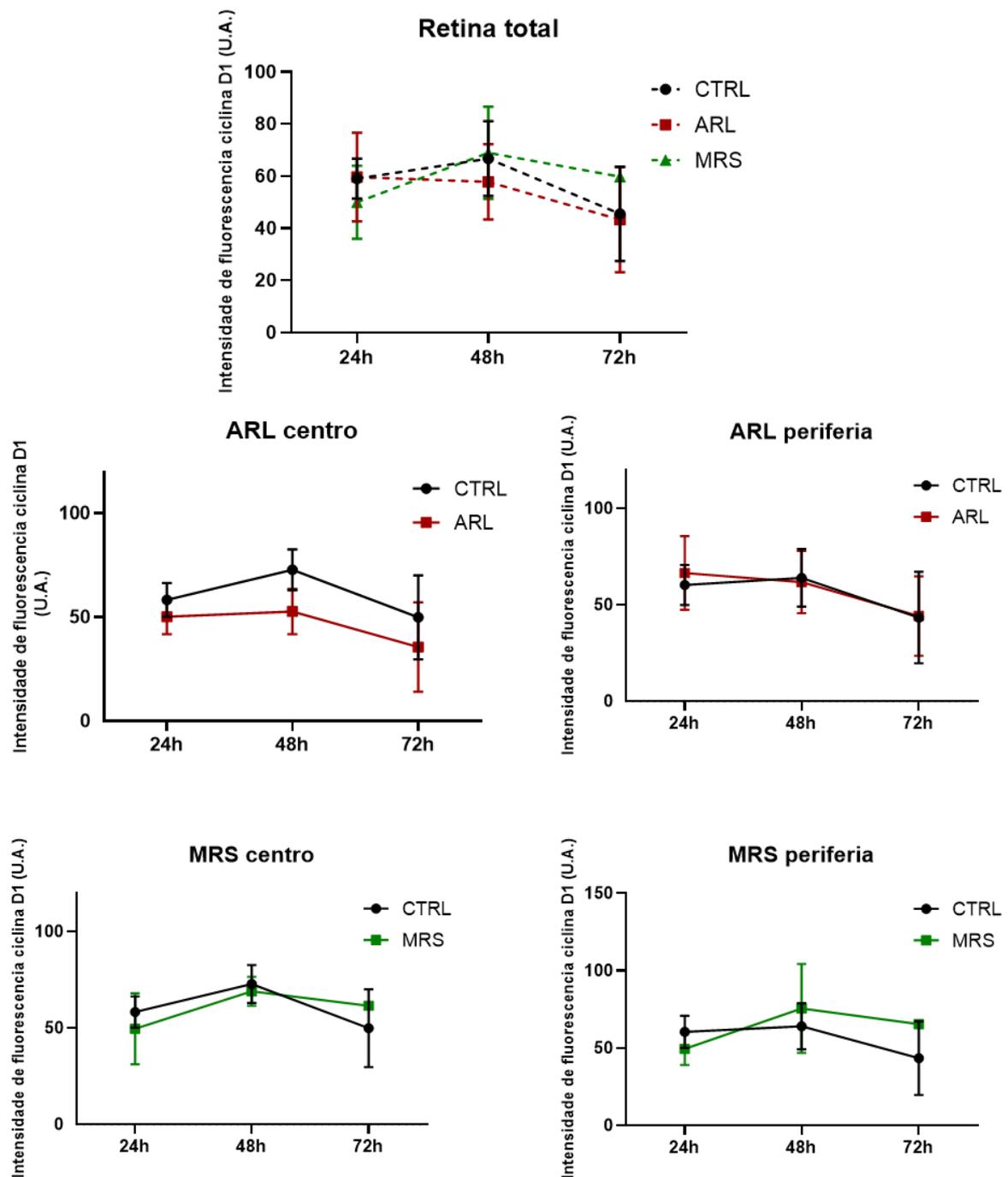
**Figura 10: O bloqueio das E-NTPDases e do receptor P2Y<sub>1</sub> aparentemente não altera o número de células mitóticas tanto no centro quanto na periferia da retina.** O tratamento com ARL 67156 200  $\mu$ M e MRS 2179 100  $\mu$ M, durante 24, 48 ou 72 horas, aparentemente não altera o número de células PH3 positivas, em relação ao controle. Tanto na retina total (A) quanto no centro (B, D) e na periferia (C, E) da retina. CTRL - 24h n=5; 48h n=5; 72h n=3; ARL - 24h n=3; 48h n=4; 72h n=3; MRS - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=3.



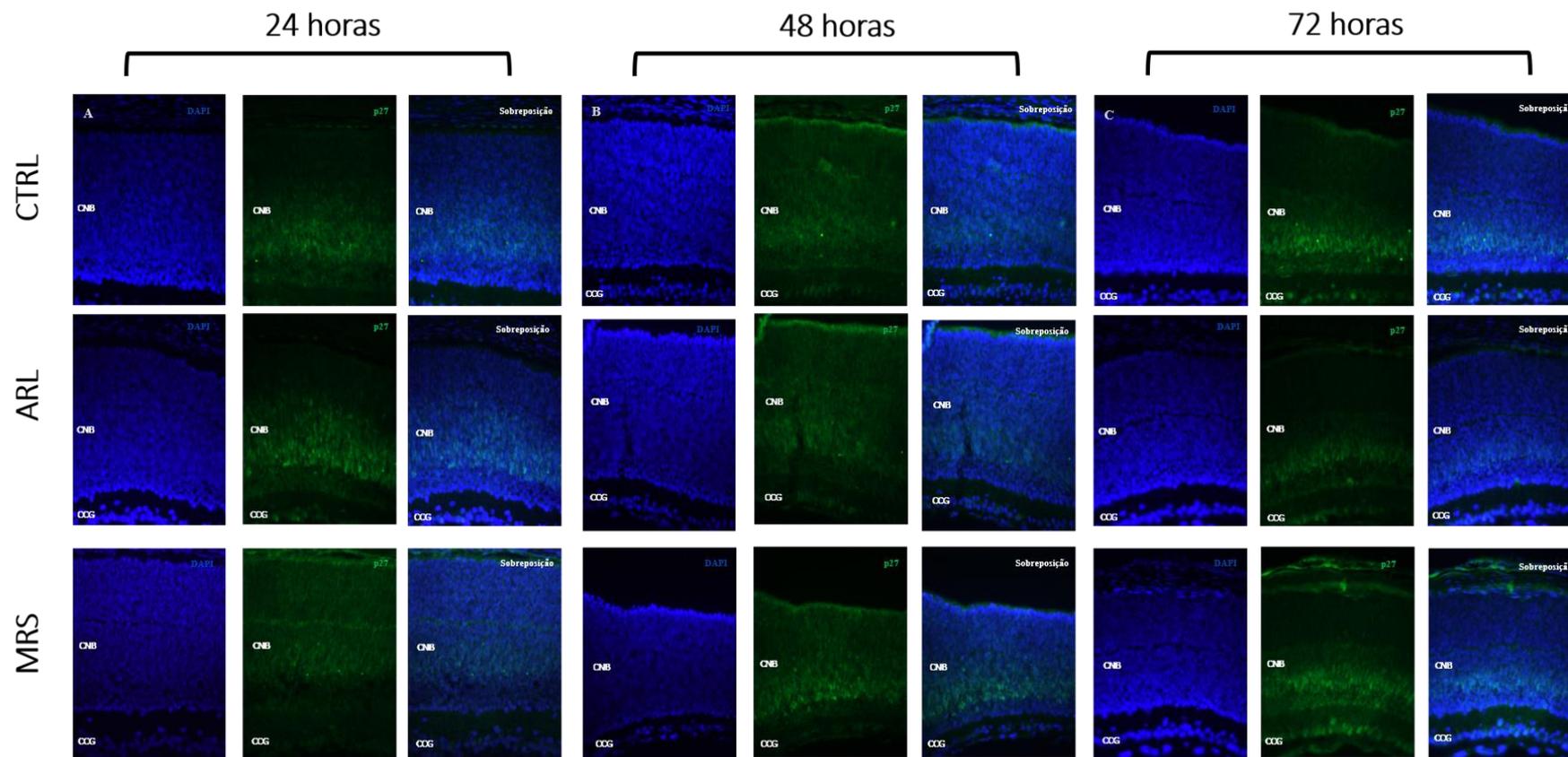
**Figura 11: Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina D1 no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases e bloqueador do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 µM ou MRS 2179 100 µM. B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 µM ou MRS 2179 100 µM; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 µM ou MRS 2179 100 µM. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100 µm. Fotomicrografias em 400x.



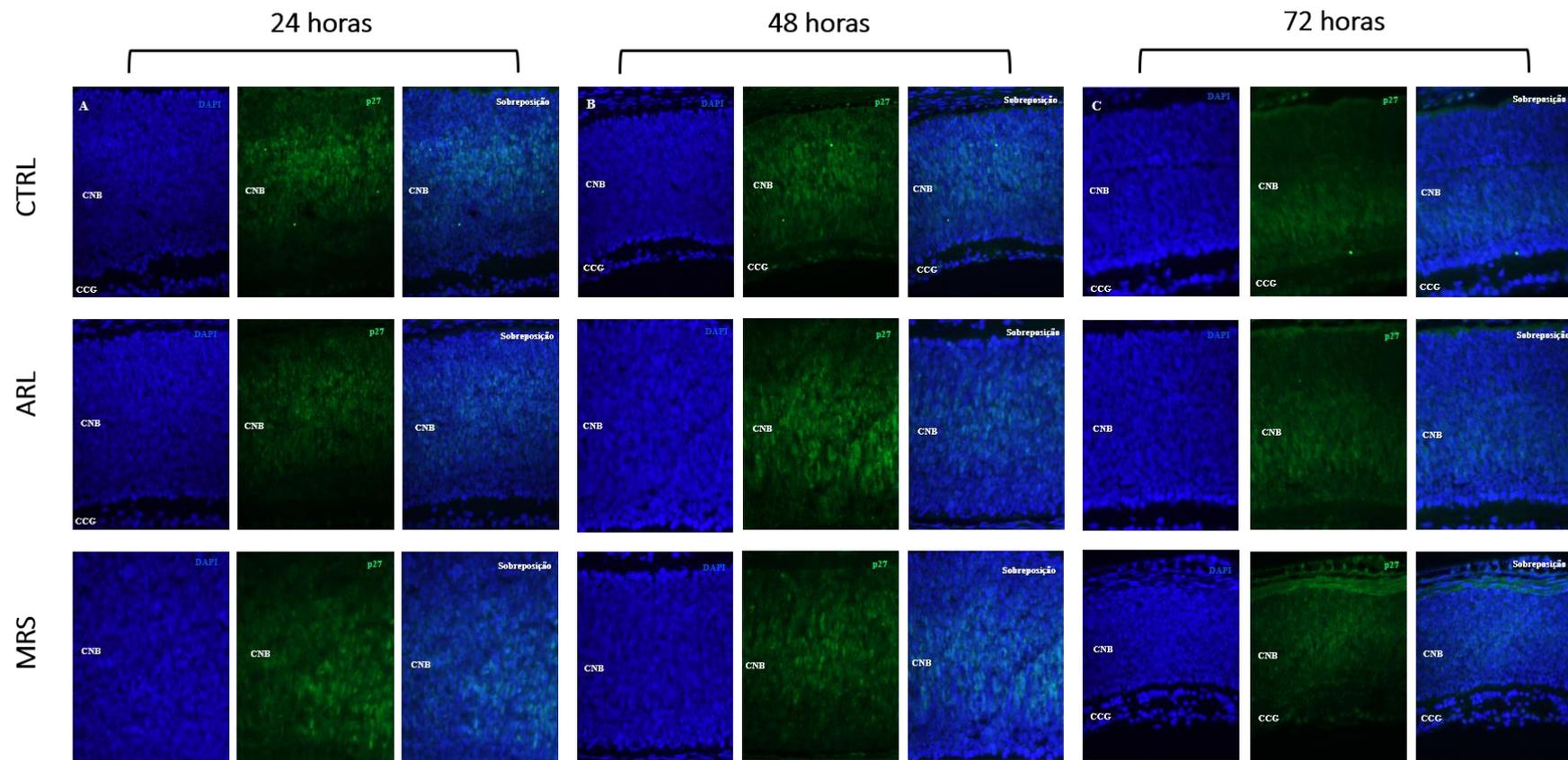
**Figura 12: Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina D1 na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases e bloqueador do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M; B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100  $\mu$ m. Fotomicrografias em 400x.



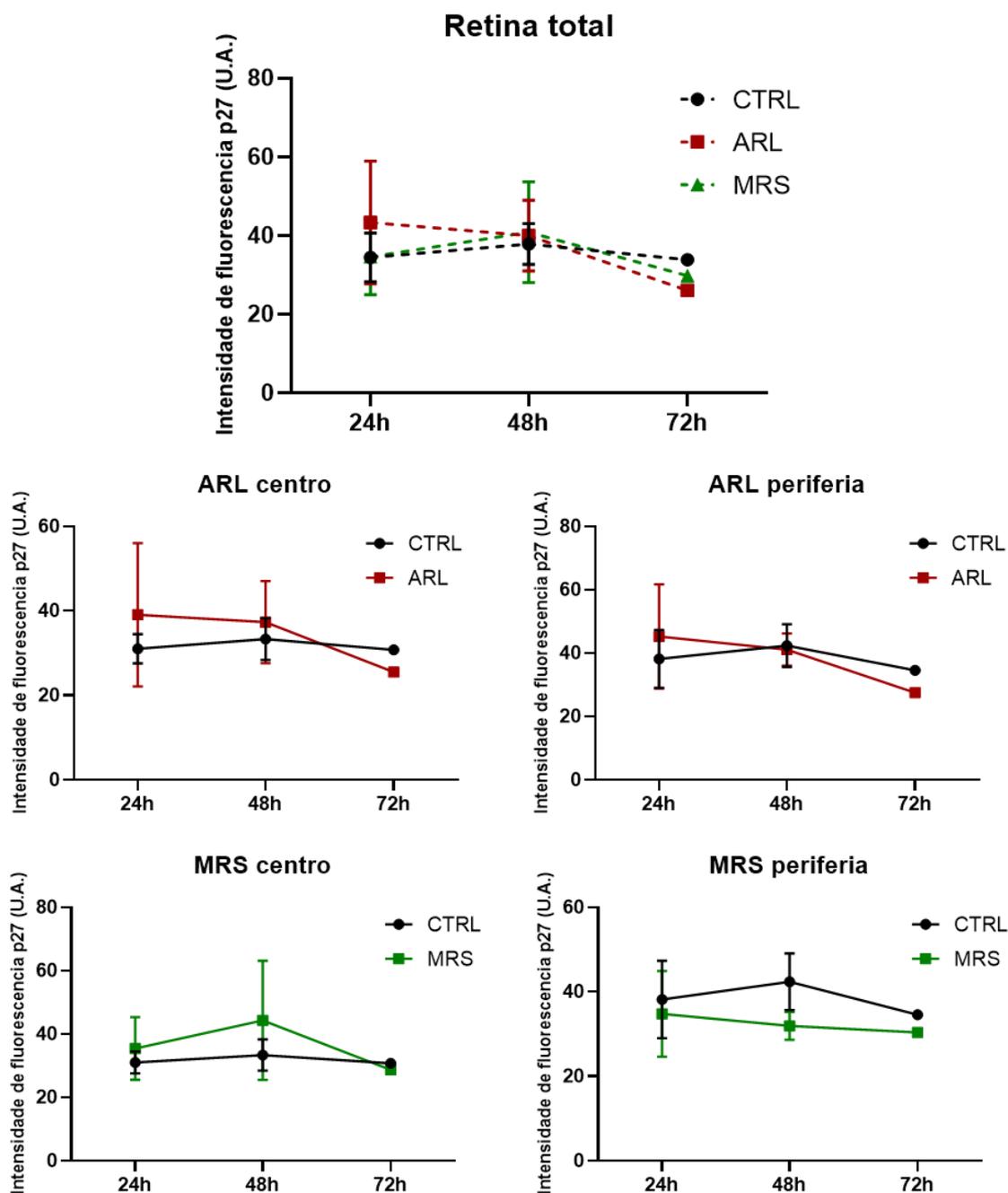
**Figura 23: O bloqueio das E-NTPDases ou do receptor P2Y<sub>1</sub> aparentemente não alterou a expressão de ciclina D1 na fase G1 tanto no centro quanto na periferia da retina. O tratamento com ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M, durante 24, 48 ou 72 horas, aparentemente não altera a intensidade de fluorescência para ciclina D1 positivas, em relação ao controle. Tanto na retina total (A) quanto no centro (B, D) e na periferia (C, E) da retina. CTR - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2; ARL - 24h n=2; 48h n=3; 72h n=2; MRS - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2;**



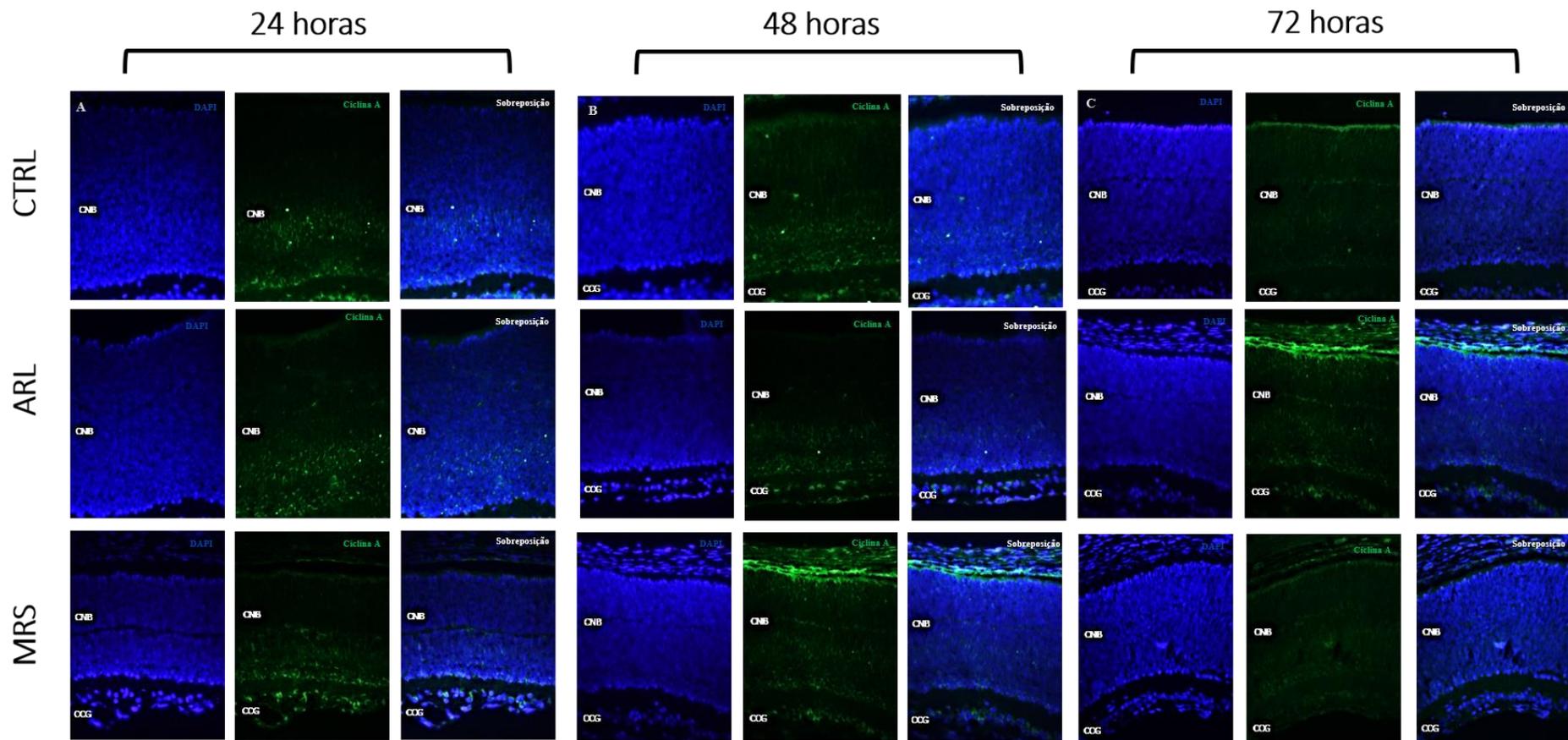
**Figura 14: Fotomicrografia de imunofluorescência para p27<sup>KIP1</sup> no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases e inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100 μm. Fotomicrografias em 400x.



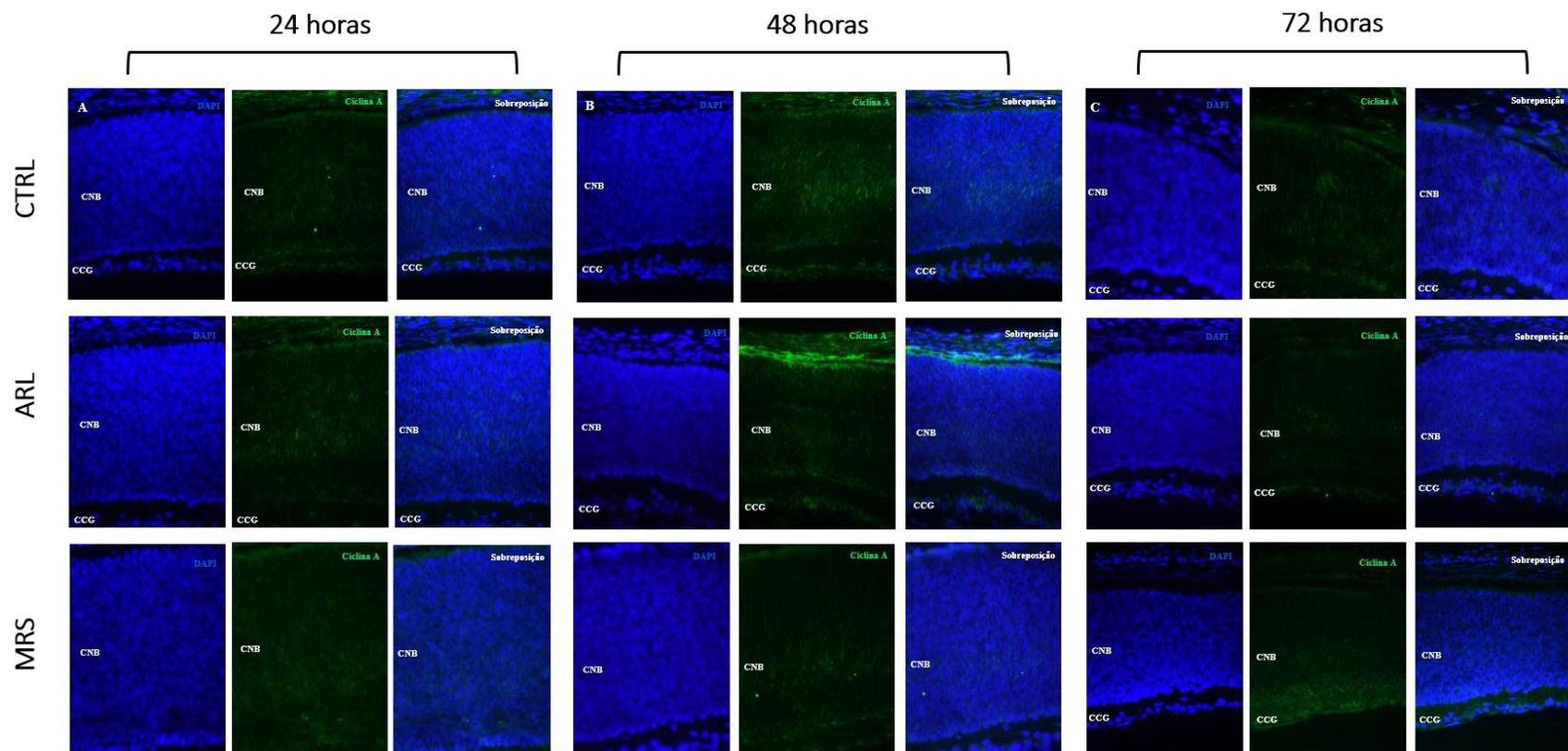
**Figura 15: Fotomicrografia de imunofluorescência para p27<sup>KIP1</sup> na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidases e inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100 μm. Fotomicrografias em 400x.



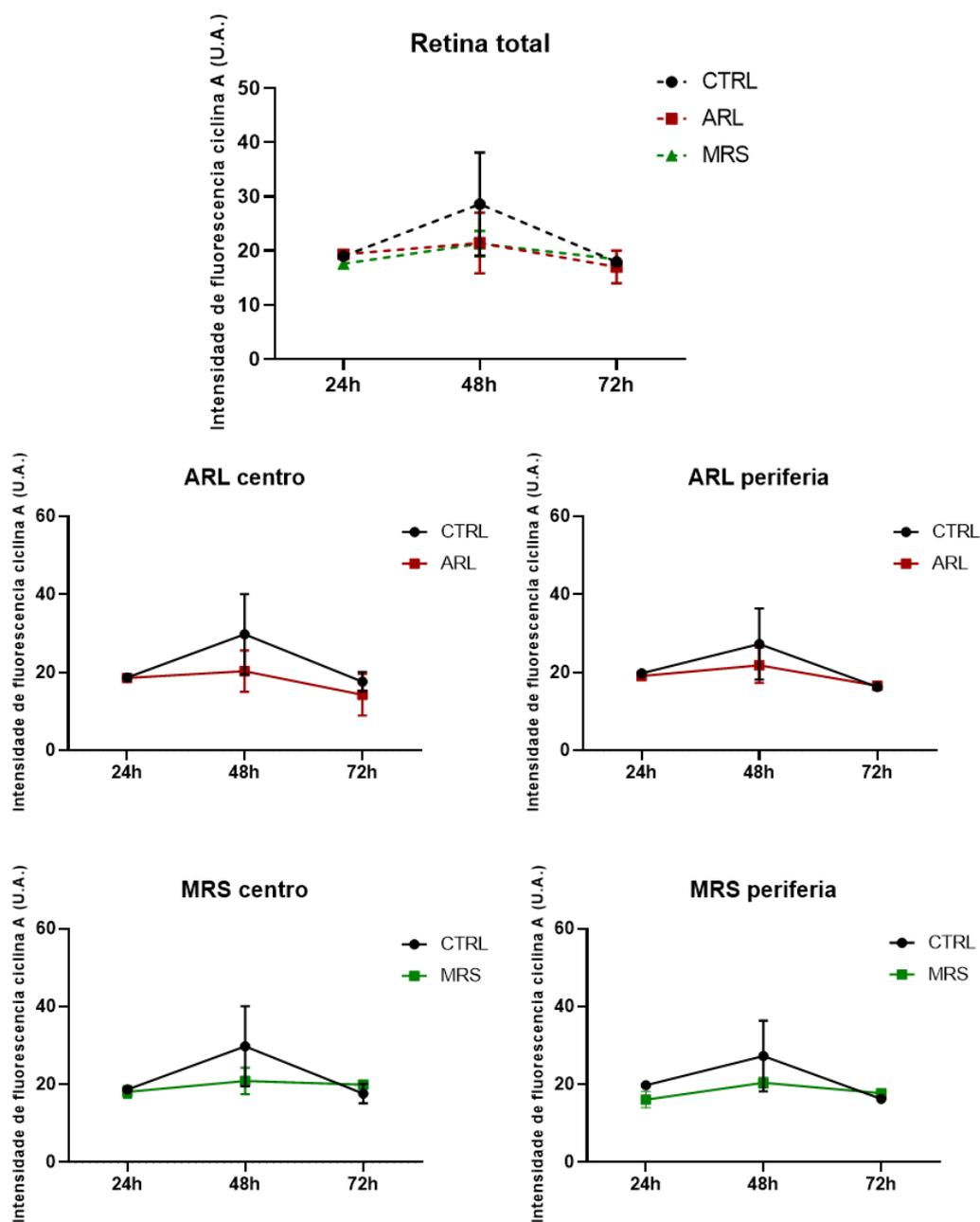
**Figura 16:** O bloqueio das E-NTPDases ou do receptor P2Y<sub>1</sub> aparentemente não alterou a expressão de p27<sup>KIP1</sup> na fase G1 tanto no centro quanto na periferia da retina. O tratamento com ARL 67156 200 μM e MRS 2179 100 μM, durante 24, 48 ou 72 horas, aparentemente não altera a intensidade de fluorescência para p27<sup>KIP1</sup> positivas, em relação ao controle. Tanto na retina total (A) quanto no centro (B, D) e na periferia (C, E) da retina. CTR - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2; ARL - 24h n=2; 48h n=3; 72h n=2; MRS - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2.



**Figura 17: Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina A no centro da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200 μM ou MRS 2179 100 μM. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100 μm. Fotomicrografias em 400x.



**Figura 18: Fotomicrografia de imunofluorescência para Ciclina A na periferia da retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas ou inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>.** A: painel com micrografias de retinas após 24 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M. B: painel com micrografias de retinas após 48 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M; C: painel com micrografias de retinas após 72 horas de tratamento com PBS 0,01M, ARL 67156 200  $\mu$ M ou MRS 2179 100  $\mu$ M. CNB: camada neuroblástica; CCG: camada de células ganglionares; CTR: controle. Barra de calibração = 100  $\mu$ m. Fotomicrografias em 400x.

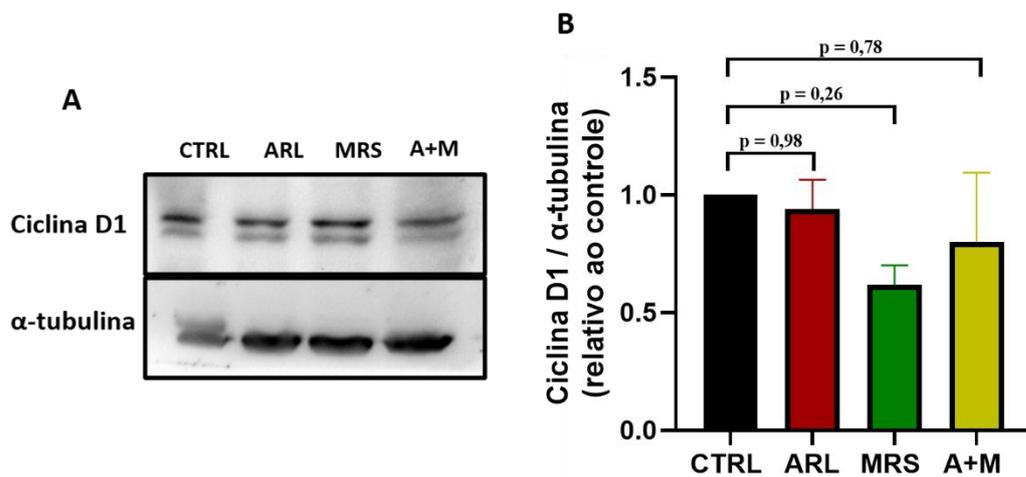


**Figura 19:** O bloqueio das E-NTPDases e do receptor P2Y<sub>1</sub> aparentemente não altera a expressão de ciclina A na fase S/G2 tanto no centro quanto na periferia da retina. O tratamento com ARL 67156 200  $\mu$ M e MRS 2179 100  $\mu$ M, durante 24, 48 ou 72 horas, aparentemente não altera a intensidade de fluorescência para ciclina A positivas, em relação ao controle. Tanto na retina total (A) quanto no centro (B, D) e na periferia (C, E) da retina. CTR - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2; ARL - 24h n=2; 48h n=3; 72h n=2; MRS - 24h n=3; 48h n=3; 72h n=2.

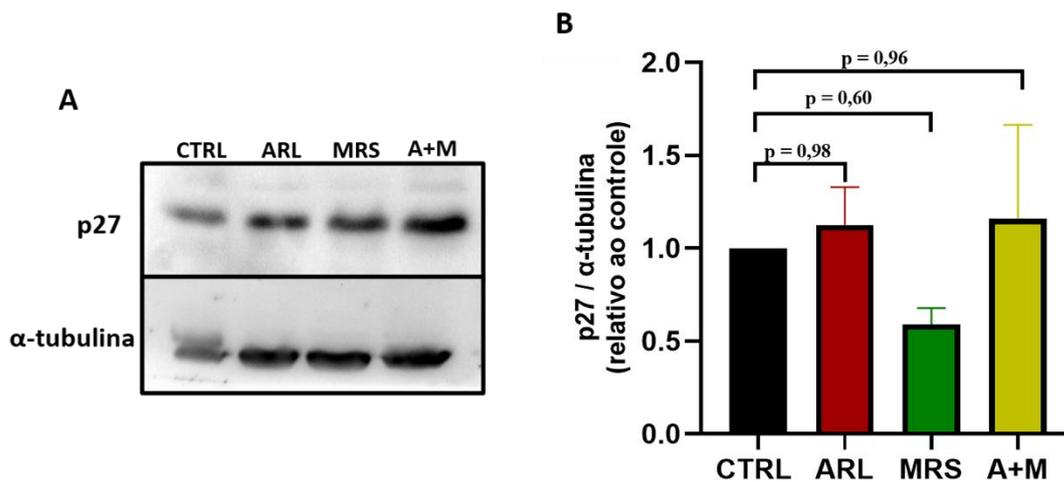
As análises por imunohistoquímica vistas anteriormente foram bem sucedidas em mostrar a posição das células na retina em desenvolvimento, porém a quantificação por intensidade de fluorescência possui uma confiabilidade questionável devido à grande flutuação nos valores obtidos. Assim, como forma de confirmar o que foi visto nos resultados anteriores sobre o ciclo celular, utilizamos a técnica de Western Blot para analisar a expressão das proteínas relacionadas ao ciclo celular após o tratamento com ARL 67156 200  $\mu$ M, MRS 2179 100  $\mu$ M ou os dois fármacos em conjunto.

Injeções intravítreas de ARL 67156 200  $\mu$ M (inibidor das ectonucleotidases) ou MRS 2179 100  $\mu$ M (antagonista seletivo do receptor P2Y<sub>1</sub>) foram realizadas em ratos P4. Os animais tiveram uma sobrevida de 24 horas, tempo suficiente para serem observadas possíveis alterações na expressão de proteínas. Depois, os animais foram eutanasiados para análise da expressão de proteínas do ciclo celular pela técnica de Western Blot. Analisamos inicialmente a expressão das proteínas Ciclina D1 e p27<sup>KIP1</sup>, relacionadas respectivamente à progressão ou impedimento da fase G1 do ciclo celular. Apesar do tratamento com MRS parecer diminuir a expressão tanto de ciclina D1 quanto p27<sup>KIP1</sup>, a análise estatística dos resultados obtidos não apontou para diferenças significativas provocadas pelos tratamentos (figuras 19 e 21).

Dados prévios do nosso grupo (Repossi, 2018) mostram que o tratamento da retina de ratos P4 com inibidor das ectonucleotidases (ARL) em conjunto com antagonista do receptor P2Y<sub>1</sub> (MRS) impede o efeito proliferativo na periferia dessas retinas. Sendo assim, também utilizamos a aplicação conjunta desses dois fármacos na análise da expressão das proteínas do ciclo celular por Western Blot. Assim como observado nos outros grupos, a análise estatística dos resultados obtidos não apontou para diferenças significativas na expressão tanto de ciclina D1 quanto p27<sup>KIP1</sup> entre o controle e o tratado com ARL + MRS (figuras 19 e 20).



**Figura 20: Expressão da proteína Ciclina D1 permanece inalterada após inibição das ectonucleotidases e/ou bloqueio de P2Y<sub>1</sub> em retina de rato com quatro dias pós-natais.** Após 24 h de tratamento com 100  $\mu$ M de MRS 2179 e/ou ARL 67156, o extrato proteico da retina foi obtido e as amostras foram analisadas por Western blotting. A: imagem representativas da expressão das proteínas Ciclina D1. B: Foi realizada análise densitométrica da proteína Ciclina D1, e os valores expressos em densidade óptica, utilizando  $\alpha$ -tubulina como controle de carregamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. B: n=5.



**Figura 21:** Expressão da proteína p27<sup>KIP1</sup> do ciclo celular permanece inalterada após inibição das ectonucleotidasas e/ou bloqueio de P2Y<sub>1</sub> em retina de rato com quatro dias pós-natais. Após 24 h de tratamento com 100  $\mu$ M de MRS 2179 e/ou ARL 67156, o extrato proteico da retina foi obtido e as amostras foram analisadas por Western blotting. A: imagem representativas da expressão das proteínas p27<sup>KIP1</sup>. B: Foi realizada análise densitométrica da proteína p27<sup>KIP1</sup>, e os valores expressos em densidade óptica, utilizando  $\alpha$ -tubulina como controle de carregamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. B: n=5.

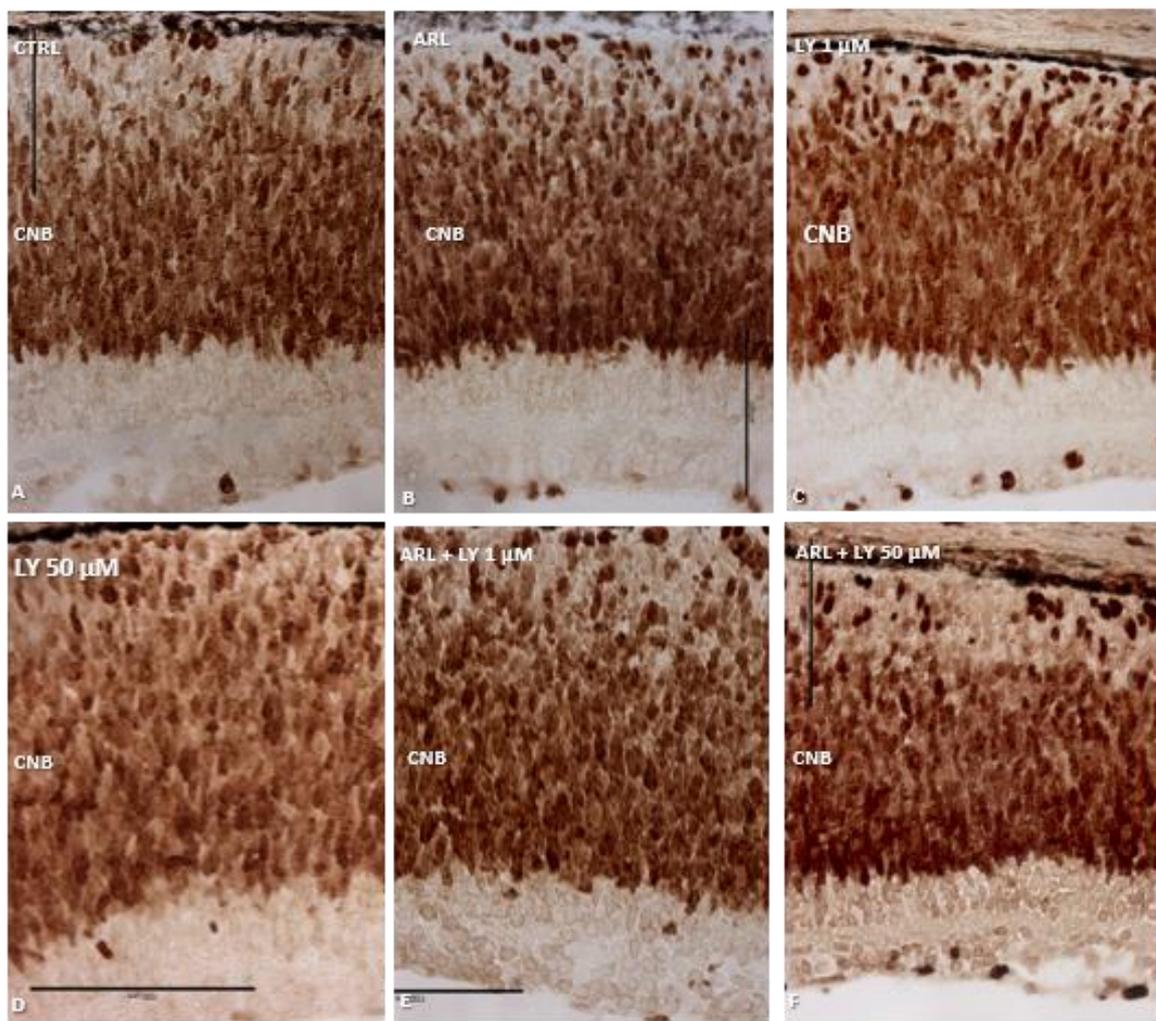
#### **4.2. A VIA DE SINALIZAÇÃO DA PI3K/AKT PODE ESTAR ENVOLVIDA NA PROLIFERAÇÃO INDUZIDA PELO BLOQUEIO DAS ECTONUCLEOTIDASES *IN VIVO***

Resultados prévios do grupo, realizados em culturas de explantes de retina, mostraram que a proliferação induzida pelo bloqueio das ectonucleotidases envolvia as vias de sinalização da PI3K/AKT e a via da ERK. Para confirmar o papel dessas vias de sinalização *in vivo*, foi realizado inicialmente o tratamento intravítreo com o fármaco Ly49002 (inibidor da via PI3K/AKT), em conjunto ou não com o fármaco ARL67156 (inibidor das ectonucleotidases).

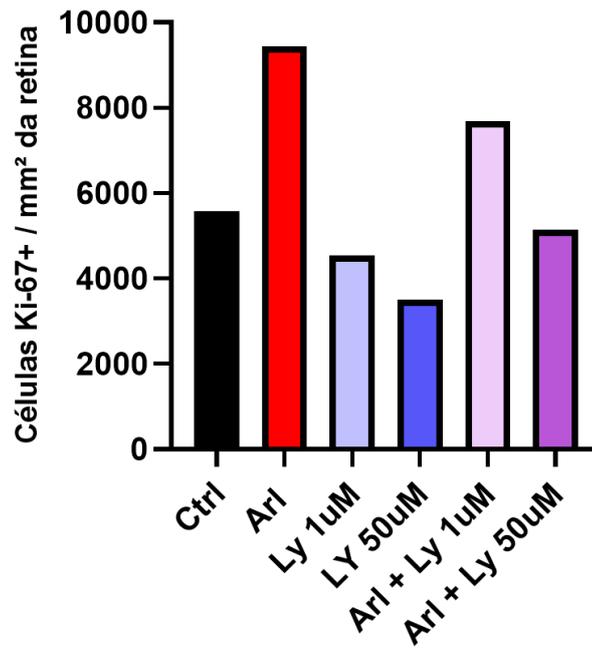
Como ainda não se haviam dados sobre a concentração ideal a ser utilizada do fármaco *in vivo*, foi necessária a execução de uma curva de concentração. Assim, foram realizadas injeções intravítreas de ARL 67156 200  $\mu\text{M}$  e Ly49002 em diferentes concentrações (1  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ). Após o tratamento, os animais tiveram uma sobrevida de 24 horas e depois foram eutanasiados para análise da proliferação celular por imunohistoquímica.

As fotomicrografias em campo claro mostram as células Ki-67 positivas, indicando as células proliferantes ao longo da camada neuroblástica (figura 21). A quantificação do número de células proliferantes foi realizada, aparentemente havendo um aumento na proliferação provocada pelo bloqueio das ectonucleotidases, que foi revertido pelo fármaco inibidor da via PI3K/AKT de uma forma dose dependente (figura 8)

Os resultados preliminares sugerem que o bloqueio da via de sinalização PI3K/AKT apresenta efeito sobre a proliferação induzida pelo ARL67156 nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , tendo um efeito mais acentuado na maior concentração, sugerindo um efeito dose dependente. A expectativa é de que uma resposta semelhante ocorrerá com na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e, após um número satisfatório de repetições do experimento, se consiga definir a concentração ideal para uso do Ly49002 *in vivo*.



**Figura 22: Fotomicrografia de imunohistoquímica para Ki-67 em retina de ratos após injeção intravítrea de inibidor das ectonucleotidasas e inibidor da via Pi3K em diferentes concentrações.** Fotos representativas da periferia da retina. ARL: ARL 67156 (inibidor das ectonucleotidasas); LY: LY294002 (inibidor da via da PI3K);CNB: camada neuroblástica. CTR: controle. Barra de calibração = 100  $\mu$ M. Fotomicrografias em 400x.



**Figura 23: O bloqueio da via Pi3k pode estar envolvida na proliferação induzida pela inibição das ectonucleotidasas.** Quantificação do número de células proliferantes marcadas para Ki-67 após 24 horas do bloqueio das ectonucleotidasas em retina de ratos P4. CTR: controle; ARL: ARL 67156 (inibidor das ectonucleotidasas); LY: LY294002 (inibidor da via da PI3K). N=1

## 5. DISCUSSÃO

Já foi extensamente descrito na literatura que nucleotídeos de adenina como o ATP e ADP estão envolvidos em processos de proliferação celular, mostrando a importância da modulação da sinalização purinérgica no desenvolvimento. Por exemplo, a indução da proliferação celular mediada por nucleotídeos é observada em células de Müller cultivadas de covaia (MILENKOVIC e cols., 2003), progenitores do embrião de galinha (PEARSON e cols., 2005; SANCHES; ALENCAR; VENTURA, 2002); e na retina em desenvolvimento de ratos (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017). Já foi visto em explantes de camundongos recém-nascidos, que o efeito proliferativo mediado pelo ADP exógeno está associado à entrada dos progenitores na fase S do ciclo celular sem qualquer alteração na dinâmica do ciclo celular através das fases G2 e M (SHOLL-FRANCO e cols., 2010; VENTURA e cols., 2019).

Considerando dados prévios do nosso grupo, especificamente na retina de ratos na idade de 4 dias pós-natal, onde a taxa proliferativa é considerada baixa, os nucleotídeos de adenina provocam uma proliferação transitória na camada de células neuroblásticas (Repossi, 2017). Esse sinal pode ser interpretado pelas células como estímulos para retorno ao ciclo celular, desviando de vias de morte e voltando a proliferar. Teve-se, então, a necessidade de analisar cada etapa do ciclo celular para testar essa hipótese, onde o aumento de células progredindo pelo ciclo celular poderia confirmá-la. Entretanto, não foi observada uma diferença no número de células marcadas para Fosfo-histona H3 (mitose), Ciclina D1 e p27<sup>KIP1</sup> (Fase G1) ou Ciclina A (Fase S/G2). De forma semelhante, a análise da expressão das proteínas Ciclina D1 e p27<sup>KIP1</sup> por Western Blot também não indicou qualquer diferença provocada pelo ARL 67156.

Apesar desses resultados, o papel dos nucleotídeos de adenina na proliferação depende de diversos fatores, e a dinâmica proliferativa sofre alterações dependendo do estágio do desenvolvimento do tecido. Na retina de embriões de galinha, por exemplo, os nucleotídeos de adenina induzem a liberação de cálcio de vesículas intracelulares, sinalizando a duplicação do DNA e progressão da célula no ciclo celular. Porém, no período tardio do desenvolvimento embrionário, há uma queda nessa liberação e os progenitores retinianos saem do ciclo celular, iniciando processo de diferenciação (YAMASHITA, 2013). Por isso, é necessário analisar outras proteínas do ciclo celular além das que já foram descritas, de forma a se ter um panorama completo sobre as alterações na dinâmica proliferativa desses progenitores retinianos tardios. Algumas dessas proteínas são a p57 e a p-Rb, proteínas cuja expressão estava aumentada e diminuída, respectivamente, com o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> na retina de ratos p2 (DE

ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017); além de outras proteínas do complexo Ciclina/CDK, como Ciclina E, Ciclina B, CDK 2 e CDK 4/6; e proteínas inibitórias (CKIs), como p15, p16, p19 e p21.

Além da resposta celular observada, é interessante observar através de qual receptor ocorre a resposta induzida pelos nucleotídeos de adenina. Já foi visto que, em retinas de embrião de galinha, a ativação dos receptores P2Y<sub>2/4</sub> por ATP exógeno ou UTP induz a proliferação de progenitores retinianos que irão gerar fotorreceptores, células amácrinas, ganglionares e horizontais (PEARSON e cols., 2005; SUGIOKA e cols., 1999; SUGIOKA; FUKUDA; YAMASHITA, 1996).

Uma aposta para o receptor purinérgico envolvido no aumento de proliferação celular induzido pela inibição das ectonucleotidases é o receptor P2Y<sub>1</sub>, já que diversos trabalhos mostram que esse receptor está envolvido na progressão do ciclo celular (HEO; HAN, 2006; JACOBSON; MÜLLER, 2016; ORNELAS; VENTURA, 2010). Nunes e colaboradores demonstraram que a estimulação de explantes de retina de galinha E7 por ATP e ADP induzia o aumento de ERK fosforilada via PKC e PLC, além de sugerir o envolvimento do receptor P2Y<sub>1</sub> na proliferação (NUNES e cols., 2007). Sholl e colaboradores mostraram em 2010 que mais do que 80% dos progenitores gliais da retina de camundongos recém-nascidos expressam o receptor P2Y<sub>1</sub>. Ademais, o tratamento de explantes de retina de camundongos recém-nascidos (p0) com ATP induz progenitores retinianos tardios a prosseguir da fase G1 para a fase S do ciclo celular por um mecanismo que combina um aumento na expressão da ciclina D1 com uma diminuição na expressão de p27<sup>kip1</sup>, envolvendo um aumento na expressão de P2Y<sub>1</sub> (SHOLL-FRANCO e cols., 2010). Em um estudo mais recente, Almeida-Pereira e colaboradores revelaram que os nucleotídeos de adenina controlam a proliferação de células progenitores retinianos *in vivo* em ratos P2. Foi mostrado que o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> aumenta as expressões das proteínas Ciclina D1 e p57, além de diminuir a expressão de p-Rb, indicando que esse receptor modula a transição da fase G1 para S (DE ALMEIDA-PEREIRA e cols., 2017).

Foi visto em resultados prévios do grupo que o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub>, utilizando o fármaco MRS2179, diminui a proliferação na retina de ratos recém-nascidos e impede a resposta proliferativa induzida pelo bloqueio das ectonucleotidases na periferia da retina (Repossi, 2018). Com justificativa semelhante ao que foi feita com o tratamento com ARL 67156 foi realizada a análise do ciclo celular para observar alterações na progressão pelas

diferentes fases após o tratamento. Não foram observadas alterações no número de células marcadas para Fosfo-histona H3 (mitose), Ciclina D1 e p27<sup>KIP1</sup> (Fase G1) ou Ciclina A (Fase S/G2), e a análise por Western Blot também não indicou divergências. Aqui também se torna necessário analisar outras proteínas do ciclo celular além das que já foram descritas, de forma a se ter um panorama completo sobre as alterações na dinâmica proliferativa dessas células.

Outros dados do grupo mostram que o bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> não altera a morte celular na retina de ratos recém-nascidos, apesar de diminuir o número de células proliferantes. Sabendo disso e considerando os resultados obtidos, uma hipótese seria que o bloqueio desse receptor estaria levando as células a se diferenciarem. De acordo com a neurogênese dos diferentes tipos celulares da retina (LIVESEY; CEPKO, 2001), na idade de 4 dias pós-natal, os tipos celulares que restam serem formados são as células da glia de Muller, células bipolares e bastonetes. Assim, para testar essa hipótese, é necessária a realização de experimentos para a detecção dessas células na retina de ratos recém-nascidos através de marcadores fenotípicos após o tratamento com inibidor do receptor P2Y<sub>1</sub>.

Além da resposta celular proliferativa e o receptor ativado, também é interessante saber qual a via ativada pelo receptor P2Y<sub>1</sub> que leva a tal resposta. A via fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase / proteína quinase B (PI3K/Akt) é uma via de sinalização envolvida na proliferação induzida por nucleotídeos de progenitores da retina. No desenvolvimento de células da retina em cultura, tanto o ADP quanto o ATP podem induzir a fosforilação da Akt, efeito que é prevenido pelos inibidores da PI3K e que provoca o aumento da ciclina D1, componente d que regula a progressão da fase G1 do ciclo celular dos progenitores (Ornelas e Ventura, 2010). A Akt fosforilada também está presente durante a mitose dos progenitores da retina e é necessária para a expressão de CDK1, uma enzima que controla a transição celular da fase G2 para a mitose (ORNELAS e cols., 2013).

Já foi visto em trabalhos prévios do grupo realizados em explantes de retina, que as vias da PI3K/AKT e da ERK estão envolvidas na sinalização induzida pelo bloqueio das ectonucleotidases. Nesse trabalho investigamos qual via de sinalização estaria envolvida no controle da proliferação celular causado pelo ARL67156 *in vivo*. Os resultados até o momento podem seguir o mesmo caminho que foi observado *in vitro*, indicando que a via da PI3K/AKT pode estar envolvida na resposta celular.

## 6. CONCLUSÕES

- A proliferação celular estimulada pelo bloqueio das E-NTPDases parece não envolver as proteínas Fosfo-histona H3, Ciclina D1, p27<sup>KIP1</sup> e Ciclina A;
- A redução da proliferação celular após bloqueio do receptor P2Y<sub>1</sub> também parece não envolver nenhuma das proteínas analisadas;
- A via de sinalização da PI3K/AKT pode estar envolvida na proliferação induzida pelo bloqueio das ectonucleotidases in vivo

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATHOCLEOUS, M.; HARRIS, W. A. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, p. 45–69, 2009.
- AGRANOFF, B. W. e cols. The retina as a biochemical model of central nervous system regeneration. **Neurochemistry International**, v. 1, n. C, p. 487–500, 1980.
- AL-RASHIDA, M. e cols. Ectonucleotidase inhibitors: a patent review (2011-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 12, p. 1291–1304, 2017a.
- AL-RASHIDA, M. e cols. Ectonucleotidase inhibitors: a patent review (2011-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 12, p. 1291–1304, 2017b.
- AO, J. e cols. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 46, n. 6, p. 670–686, 2018.
- APPLEBURY, M. L. e cols. The murine cone photoreceptor: A single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. **Neuron**, v. 27, n. 3, p. 513–523, 2000.
- BARTON, K. M.; LEVINE, E. M. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 3, p. 672–682, 2008.
- BELLE, M. e cols. PlexinA2 and Sema6A are required for retinal progenitor cell migration. **Development Growth and Differentiation**, v. 58, n. 5, p. 492–502, 2016.
- BILITOU, A.; OHNUMA, S. I. The role of cell cycle in retinal development: Cyclin-dependent kinase inhibitors co-ordinate cell-cycle inhibition, cell-fate determination and differentiation in the developing retina. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 3, p. 727–736, 2010.
- BOEYNAEMS, J. M. e cols. Overview of the P2 receptors. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 2, p. 139–149, 2005.
- BOLLEN, M. e cols. **Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move**. [s.l.: s.n.]. v. 35
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 3, p. 364–373, 2002.
- CEPKO, C.; DYER, M. A. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury - Nature Neuroscience. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 873–880, 2000.
- DALTON, S. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 10, p. 592–600, 2015.
- DE ALMEIDA-PEREIRA, L. e cols. Adenine Nucleotides Control Proliferation In Vivo of Rat Retinal Progenitors by P2Y<sub>1</sub> Receptor. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5142–5155, 2017.

- DE ALMEIDA-PEREIRA, L. e cols. P2Y<sub>12</sub> but not P2Y<sub>13</sub> Purinergic Receptor Controls Postnatal Rat Retinogenesis In Vivo. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8612–8624, 2018.
- DEMB, J. B.; SINGER, J. H. Functional Circuitry of the Retina. **Annual Review of Vision Science**, v. 1, n. 1, p. 263–289, 2015.
- FISCHER, A. J.; REH, T. A. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. **Developmental Biology**, v. 251, n. 2, p. 367–379, 2002.
- GAO, S. WEI; LIU, F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 20, n. 6, p. 467–475, 2019.
- GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1638, n. 1, p. 1–19, 2003.
- GRIGORYAN, E. N. Self-Organization of the Retina during Eye Development, Retinal Regeneration In Vivo, and in Retinal 3D Organoids In Vitro. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, 2022.
- HAVERKAMP, S. e cols. The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 22, p. 5438–5445, 2005.
- HEO, J. S.; HAN, H. J. ATP Stimulates Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation via Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt, and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. **Stem Cells**, v. 24, n. 12, p. 2637–2648, 2006.
- HOLT, C. E. e cols. Cellular determination in the xenopus retina is independent of lineage and birth date. **Neuron**, v. 1, n. 1, p. 15–26, 1988.
- HOON, M. e cols. Functional architecture of the retina: Development and disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 42, p. 44–84, 2014.
- JACOBSON, K. A.; MÜLLER, C. E. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 31–49, 2016.
- KAEBISCH, C. e cols. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 75–84, 2015a.
- KAEBISCH, C. e cols. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 75–84, 2015b.
- KAR, R. e cols. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, n. 1, p. 2–15, 2012.
- KAWANO, A. e cols. Involvement of P2X<sub>4</sub> receptor in P2X<sub>7</sub> receptor-dependent cell death of mouse macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, n. 2, p. 374–380, 2012.
- KEELEY, P. W. e cols. Development and plasticity of outer retinal circuitry following genetic removal of horizontal cells. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 45, p. 17847–17862, 2013.
- KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C.; DWYER, K. M. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 2, p. 109–120, 2018.

- LANG, C. & EARLY EYE DEVELOPMENT IN VERTEBRATES. v. 2, 2001.
- LIU, X. e cols. The effect of A2A receptor antagonist on microglial activation in experimental glaucoma. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 57, n. 3, p. 776–786, 2016.
- LIVESEY, F. J.; CEPKO, C. L. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 109–118, 2001.
- LONDON, A.; BENHAR, I.; SCHWARTZ, M. The retina as a window to the brain - From eye research to CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, p. 44–53, 2013.
- MANSOOR, S. E. e cols. X-ray structures define human P2X 3 receptor gating cycle and antagonist action. **Nature**, v. 538, n. 7623, p. 66–71, 14 set. 2016.
- MILENKOVIC, I. e cols. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: Dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 3, p. 1211–1220, 2003.
- MOORE, B. A. e cols. **Structure and Function of Regional Specializations in the Vertebrate Retina**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 1–4
- MÜHLEDER, S. e cols. Purinergic P2Y2 receptors modulate endothelial sprouting. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 5, p. 885–901, 2020.
- NIKONOV, S. S. e cols. Physiological features of the S- and M-cone photoreceptors of wild-type mice from single-cell recordings. **Journal of General Physiology**, v. 127, n. 4, p. 359–374, 2006.
- NUNES, P. H. C. e cols. Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 499–508, 2007.
- ORNELAS, I. M. e cols. Inhibition of PI3K/Akt Pathway Impairs G2/M Transition of Cell Cycle in Late Developing Progenitors of the Avian Embryo Retina. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- ORNELAS, I. M.; VENTURA, A. L. M. Involvement of the PI3K/AKT pathway in ATP-induced proliferation of developing retinal cells in culture. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 503–511, 2010.
- PEARSON, R. A. e cols. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 731–744, 2005.
- PERRON, M.; HARRIS, W. A. Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 2, p. 215–223, 2000.
- RÖHLICH, P.; VAN VEEN, T.; SZÉL, Á. Two different visual pigments in one retinal cone cell. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1159–1166, 1994.

- SANCHES, G.; ALENCAR, L. S. D.; VENTURA, A. L. M. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 21–27, 2002.
- SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1998.
- SELHORST, J. B.; CHEN, Y. The optic nerve. **Seminars in Neurology**, v. 29, n. 1, p. 29–35, 2009.
- SHOLL-FRANCO, A. e cols. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 63–73, 2010.
- SILVERMAN, J. Hypothermia as anesthesia. **Lab Animal**, v. 37, n. 3, p. 105, 2008.
- STENKAMP, D. L. **Development of the Vertebrate Eye and Retina**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 134
- STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 845–881, 2005.
- SUGIOKA, M. e cols. Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 135–144, 1999.
- SUGIOKA, M.; FUKUDA, Y.; YAMASHITA, M. Ca<sup>2+</sup> responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. **Journal of Physiology**, v. 493, n. 3, p. 855–863, 1996.
- TURNER, D. L.; SNYDER, E. Y.; CEPKO, C. L. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. **Neuron**, v. 4, n. 6, p. 833–845, 1990.
- VENTURA, A. L. M. e cols. Purinergic signaling in the retina: From development to disease. **Brain Research Bulletin**, v. 151, p. 92–108, 2019.
- VINBERG, F.; CHEN, J.; KEFALOV, V. J. Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 67, p. 87–101, 2018a.
- VINBERG, F.; CHEN, J.; KEFALOV, V. J. Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 67, p. 87–101, 2018b.
- VON KÜGELGEN, I. Pharmacology of P2Y receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 151, p. 12–24, 2019.
- WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 747–757, 2004.
- WEWERS, M. D.; SARKAR, A. P2X7 receptor and macrophage function. **Purinergic Signalling**, v. 5, n. 2, p. 189–195, 2009.

YAMASHITA, M. From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 534, n. 1–2, p. 64–70, 2013.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.