

Caracterização morfológica de cultura de células da retina de ratos neonatos da linhagem Wistar

Felício Stênio Schuenck Rozete¹; Maycon Bruno de Almeida¹; Simão Pedro Fernandes Pereira², biomedicina@faminas.edu.br

1. Acadêmicos do Curso de Bacharelado em Farmácia da Faculdade de Minas (FAMINAS), Muriaé, MG;
2. Doutor em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); coordenador do Curso de Biomedicina da Faculdade de Minas (FAMINAS), Muriaé, MG.

Artigo protocolado em 06/03/2009 e aprovado em 20/03/2009.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente culturas de células da retina de ratos neonatos *in vitro*. A diferenciação e o desenvolvimento celular é um evento que sofre amplas influências do meio externo mesmo em protocolos amplamente estabelecidos. Neste ensaio, analisamos as principais diferenças morfológicas, funcionais e caracterizar a manutenção da sobrevivência de culturas *in vitro*. Além disso, estabelecer um protocolo viável para as condições apresentadas. Concluímos que o protocolo atendeu às necessidades de manutenção de sobrevivência não interferindo nos aspectos morfológicos normais observados na literatura.

Palavras-chave: cultura de células, retina, sobrevivência neuronal, protocolo de cultura.

RESUMEN: La caracterización morfológica de cultura de células de la retina de ratones de Wistar recién nacidos. El trabajo presente tenía como el objetivo caracterizar morfológicamente la cultura de células de la retina de en el vitro recién nacidos ratones. La diferenciación y el desarrollo celular es un evento que sufre influencias anchas del ambiente externo en los protocolos establecidos. En esta prueba, nosotros analizamos differences morfológico, funcional y caracterizar el mantenimiento de la supervivencia de las culturas en vitro. Además, establecer un protocolo viable para las condiciones presentadas. Nosotros concluimos que el protocolo ayudaba a las necesidades de mantenimiento de supervivencia que no interfiere en los aspectos morfológicos normales observadas en la literatura.

Palabras llaves: células cultivan, retina, supervivencia neuronal, protocolo de la cultura.

ABSTRACT: Morphologic characterization of culture of retina cells of newborn Wistar mice. The present work had as objective to characterize morphologically the culture of retina cells of in vitro newborn mice. The differentiation and the cellular development is an event that suffers wide influences of the external environment even in protocols thoroughly established. In this try, we analyzed the main morphologic, functional differences and to characterize the maintenance of the survival of in vitro cultures. Besides, to establish a viable protocol for the presented conditions. We concluded that the protocol assisted to the needs of survival maintenance not interfering in the normal morphologic aspects observed in the literature.

Keywords: cells culture, retina, neuronal survival, culture protocol.

Introdução

O desenvolvimento de um organismo pluricelular é caracterizado por diferentes etapas que irão permitir a funcionalidade e a interação dos vários

sistemas que o compõem. As etapas que constituem o desenvolvimento do sistema nervoso apresentam uma seqüência temporal de eventos progressivos e regressivos que asseguram a sua perfeita estabilidade funcional. O sistema nervoso desempenha um importante papel no controle do funcionamento dos demais sistemas, bem como permite a interação do indivíduo com o meio que o cerca. Assim sendo, ele desempenha um importante papel integrador e controlador no organismo (PEREIRA; ARAÚJO, 2000).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso podemos observar diferentes etapas que foram divididas de forma didática por Cowan (1979) e Oppenheim (1991 e 1992) em: a) indução do ectoderma neural; b) proliferação localizada de grupamentos celulares; c) migração celular para locais distantes da região onde ocorre a proliferação d) agregação das células formando diferentes camadas do tecido nervoso; e) diferenciação neuronal; f) formação de contatos sinápticos; g) morte seletiva de células dentro de uma dada população e h) eliminação de conexões e estabelecimento de outras (PEREIRA, 2001).

I – Neurogênese

O desenvolvimento de células neuronais em vertebrados ocorre através de uma seleção natural visando à morte ou sobrevivência neuronal em um estágio que coincide com a formação de sinapses com seu tecido alvo. Tanto o número, como o tipo neuronal sobrevivente está relacionado proporcionalmente ao tamanho e à distância do alvo que será inervado (CEPKO, 1993).

Na maior parte das regiões do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, o surgimento de novos neurônios é um processo restrito à embriogênese, uma vez que após esta etapa o desenvolvimento neuronal aparentemente se finaliza. As células progenitoras originam os neurônios passando por um processo de diferenciação, tornando-se incapazes de divisão (RAKIC, 1995). No entanto, o processo de neurogênese no SNC de adultos tem sido estudado em muitas espécies, como crustáceos, répteis, anfíbios, aves, roedores, primatas e humanos (ERIKSSON et al., 1998; GOULD et al., 1998). Estudos recentes demonstram que em mamíferos, incluindo o homem, existem regiões onde se localizam células progenitoras mitoticamente ativas, capazes de gerar novos neurônios durante a fase adulta (SCORZA et al., 2005).

As células neuronais não estão sozinhas na atividade em busca da homeostase do sistema nervoso. As células gliais também participam ativamente dessas atividades coordenadas, sendo essenciais no ponto de vista estrutural e nutricional para a integridade deste sistema. Sabe-se hoje que as funções das células neurogliais vão muito além de conferir suporte estrutural e nutricional

aos neurônios. Isso tem sido demonstrado em diversos estudos que relacionam a comunicação e integração mútua dessas duas classes de células que compõem o sistema nervoso através de moléculas sinalizadoras e ativadoras (KAPLAN; STEPHENS, 1994; OPPENHEIN; SCHWARTZ; SHATZ, 1992).

1.1 – Células gliais

O termo neuroglia foi descrito pela primeira vez pelo patologista alemão Rudolf Virchow, em 1846. Este patologista descreveu a neuroglia como um tecido que ocupa regiões entre os neurônios, sendo semelhante aos tecidos conectivos de outros organismos. Ainda no Século XIX, o citologista italiano Camilo Golgi desenvolveu técnicas de coloração baseadas na impregnação metálica, que possibilitaram a descoberta de classes distintas de células não neuronais. Mas foi Santiago Ramón y Cajal e Pio Del Río Hortega que desenvolveram, utilizando as técnicas de Golgi, um sistema de classificação das células gliais que persiste até hoje (KIMELBERG; NOREMBERG, 1989; RAKIC, 2003).

Os astrócitos apresentam o maior tamanho entre todas as glias, com núcleos esféricos e centrais. Em alguns ramos terminais, formam-se dilatações que envolvem os capilares, que são chamadas de pés vasculares da neuroglia, em que parecem desempenhar papel de transporte de substâncias entre o capilar e o neurônio, participando na formação da barreira hematoencefálica (DEL ZOPPO; HALLENBECK, 2000; ABBOTT, 2002). As células astrocíticas aparecem muito precocemente no SNC em desenvolvimento (LEVITT; RAKIC, 1980; RAFF; MILLER; NOBLE, 1983), juntamente com os neurônios, desde os primeiros estágios. Entre elas temos células da glia radial que constituem o melhor substrato para a migração dos neurônios (RAKIC, 1971). Após o desenvolvimento completo, suas principais funções são manter a homeostase neuronal, como equilíbrio iônico, através do tamponamento de potássio, suprimento energético e nutricional (DRINGEN; HAMPRECHT, 1992).

1.2 – Interações neurônio-glia

Nos últimos dez anos, tem sido demonstrada a existência no cérebro de um sistema de comunicação bidirecional entre neurônios e células gliais. Este modelo considera que o astrócito, juntamente com o terminal pré-sináptico e o neurônio pós-sináptico alvo, seja um elemento efetivo da sinapse e assim esteja correlacionado a diversas formas de comportamentos em modelos animais e humanos. Para exemplificar este modelo de integração, pode-se observar que na base filo-genética existe uma relação direta entre a complexidade de comportamentos executáveis, o número e a diferenciação das células gliais. As células da glia, também conhecidas como *glue cells* (células conectivas), assim

chamadas em razão de seu conhecido efeito de sustentação e compactação do sistema nervoso, também têm sido associadas a funções como captação e liberação de neurotransmissores, controle do metabolismo iônico e produção de fatores neurotróficos (VIEIRA; SOUZA; KAPECZINSKI, 2002). Fatores de crescimento e citocinas são regulados por células gliais, estas atuando diretamente na densidade glial no cérebro (DAVIES, 1996). Algumas citocinas têm sido associadas à proliferação e migração glial, tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e a interleucina-3 (IL-3) (ECLANCHER et al., 1996; GUILLEMIN et al., 1996; SUGITA et al., 1999).

Pesquisas recentes comprovam que as células gliais não são apenas provedoras de suporte estrutural e metabólico para o neurônio executar a transmissão sináptica. Foram descritos efeitos relacionados à modulação da fisiologia sináptica por meio de sua capacidade de regular a osmolaridade do líquido extracelular, metabolizar neurotransmissores e moléculas tróficas. Tais células são capazes de responder a neurotransmissores liberados em terminais sinápticos sob o controle dinâmico da atividade neuronal. Os astrócitos podem enviar retroativamente ao neurônio um mensageiro para que haja a liberação de vários neurotransmissores, por meio de oscilações nos níveis citosólicos de cálcio (LAMING et al., 2000). Além disso, as funções neurogliais a partir da integração com neurônios incluem a regulação neuronal dos níveis extracelulares de potássio, estando esta regulação diretamente associada à atividade sensorial, ao aprendizado e aos estados motivacionais (SYKOVA et al., 1990).

Sabe-se que a glia influencia diretamente a atividade neuronal por meio da liberação de inúmeros fatores neuroquímicos e pela modulação direta de alguns segundos mensageiros. Moléculas específicas, presentes na superfície dos astrócitos, ligam-se a receptores metabotrópicos neuronais, serotoninérgicos e glutamatérgicos. Esta ligação induz ao desacoplamento e à ativação de proteínas G existentes no interior da membrana plasmática dessas células, levando à propagação de diversos sinais intracelulares (DIB et al., 1994; GLOWINSKI et al., 1994).

1.3 – Neurotrofinas

Os fatores neurotróficos constituem grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis, que permitem sobrevivência, diferenciação, manutenção e, quando possível, a regeneração axonal nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP), agindo através de receptores específicos (HALEGOUA; ARMSTRONG; FREMER, 1991; DA SILVA; 1995; TERENCE, 1999). Esses fatores podem ser sintetizados tanto por neurônios como células efetadoras periféricas. Dessa forma, podem agir de forma parácrina e autócrina (BLOTTNER; BAUMGARTEN, 1994; ACHESON; LINDSAY, 1996; MENDELL, 1996).

Em processos de degeneração de fibras nervosas do SNC e SNP, os níveis dos fatores neurotróficos diferem dos encontrados no tecido não lesado (HEUMANN et al., 1987; MEYER et al., 1992; FUNAKOSHI et al., 1993). No SNC, apesar da riqueza em fatores neurotróficos, a capacidade de regeneração é considerada baixa por diferentes motivos, como ausência de matriz extracelular e fatores inibitórios ativos presentes no microambiente neuronal (FENRICH; GORDON, 2004). Por suas inúmeras ações, os fatores neurotróficos têm sido muito explorados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Várias estratégias experimentais também são norteadas para a compreensão detalhada de suas ações como agentes terapêuticos (ANAND et al., 1997; LINDSAY; THOENEN; BARDE, 1985; LEWIN; BARDE, 1996; TERENGHI, 1999, CHAO, 2003; AIRAKSTEIN; SAARMA, 2002).

Até o momento, são representadas por cinco proteínas de estruturas relacionadas que constituem a família das neurotrofinas, incluindo o fator de crescimento nervoso (NGF – Nerve Growth Factor), o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor), e as neurotrofinas 3, 4/ 5 e 6 (NT 3, NT 4/ 5 e NT 6 – Neurotrophic Factor) (AGUIAR JR.; PINHO, 2007). Outra família de neurotrofinas é a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), em que os componentes dessas duas principais famílias podem atuar em conjunto ou de forma individualizada nos processos de regeneração de fibras nervosas lesadas (RICHARDSON, 1991; CHAO, 2003; AIRAKSTEIN; SAARMA, 2002).

II – Culturas de células da retina

A retina é parte integrante do sistema nervoso central (SNC), pois é originada do neuroectoderma. As diferentes classes celulares presentes são provenientes de células progenitoras multipotentes situadas na lâmina interna, no nervo óptico e distribuídas para periferia a partir desse ponto (MARQUARDT; GRUSS, 2002).

Este modelo é muito utilizado em experimentos em que há estudos do desenvolvimento do sistema nervoso central, ação de fármacos e medicamentos, uma vez que sua localização periférica privilegiada permite fácil obtenção, livre de tecido conjuntivo adjacente e apresenta uma variedade de células neuronais e gliais.

2.1 – A retina

A retina apresenta número limitado de tipos celulares, sendo dotada de diferentes circuitos de neurotransmissores, tornando-a um excelente modelo

experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e manutenção de células do tecido nervoso central *in vitro* e *in vivo* (DOWLING, 1991). Em ratos, a neurogênese na retina se inicia pela formação de células ganglionares no período E_{14} e E_{20} , sendo prosseguida pela geração de células amácrinas e horizontais entre E_{14} e E_{22} ; os cones são gerados a seguir (E_{14} a P_0) e, por fim, as bipolares, bastonetes e as células de Müller (E_{20} a P_{13}) (CEPKO, 1993). Nota-se, na retina completamente desenvolvida, uma organização em diversas camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e de processos sinápticos (camadas plexiformes), conforme Figura 1. No tecido adulto, as células podem ser identificadas por sua posição, estrutura, propriedades bioquímicas e função (FARBER; ADLER, 1986).

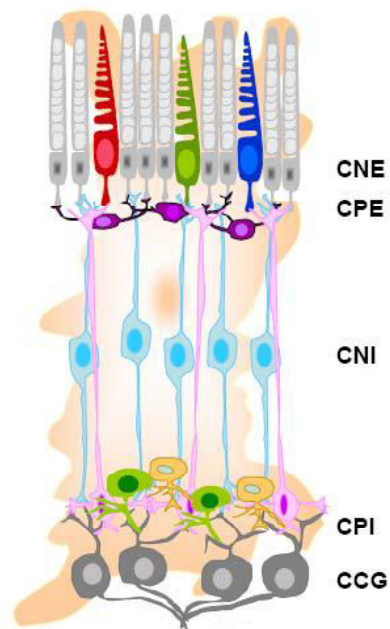
Para manutenção das diferenças existentes na retina, vários fatores secretados medeiam os fenômenos de proliferação e diferenciação celular na retina. O fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) favorecem a proliferação (DYER; CEPKO, 2001). Uma vez que a retina é parte integrante do SNC, ela é composta por diversos tipos celulares e inclusive células gliais, sendo mais predominante às células de Muller, cujos prolongamentos se estendem verticalmente por todas as camadas retinianas e seus corpos celulares se localizam preferencialmente na camada nuclear interna (KOLB, 1994; WÄSSLE; BOYCOT, 1991).

As células de Muller exercem diversas funções desempenhadas pelos oligodendrócitos e astrócitos em outras regiões do SNC. Expressam numerosos canais dependentes de voltagem e receptores para vários neurotransmissores, sendo capazes de reconhecer uma variedade de sinais neuronais levando à despolarização celular e gerando ondas intracelulares de Ca^{2+} . Dessa forma, modulam a atividade neuronal, regulando as concentrações extracelulares de substâncias neuroativas, incluindo íons K^+ , H^+ e aminoácidos como glutamato, glicina e GABA. A comunicação entre as células de Müller e neurônios retinianos indica que essas células gliais desempenham um papel ativo na função da retina (NEWMAN; REICHENBACH, 1996).

Em 2000, Pereira e Araújo avaliaram o papel das células da retina em culturas mista que incluem células de Muller na estimulação da sobrevivência das células ganglionares induzidas pela Veratridina. Os experimentos demonstraram que estas células têm participação importante no aumento da sobrevivência mediado pela veratridina. Este dado indica que, a exemplo do que ocorre em outros sistemas, as células de Muller podem estar sendo estimuladas a produzir e ou liberar fatores tróficos na presença de atividade elétrica induzida pela Veratridina.

A maturação e diferenciação de células neuronais da retina ocorrem de forma gradativa dias ou meses após o nascimento dependendo da espécie e

FIGURA 1 Retina desenvolvida, disposta em camadas de células. Camadas de células ganglionares (CCG); camada plexiforme interna (CPI); camada nuclear interna (CNI); camada plexiforme externa (CPE); camada nuclear externa (CNE) (SOUZA, 2006)



dos estímulos por ela recebida. A retina de ratos neonatos no primeiro dia pós-natal ainda é muito imatura, sendo formada por células denominadas retinoblastos. Apenas as células amácrinas e as células ganglionares já estão fora do ciclo mitótico e estão localizadas em suas respectivas camadas durante esse período (CEPKO, 1993). Veja Figura 2.

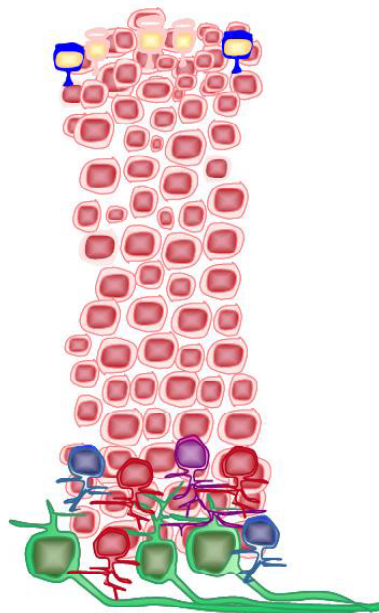
Logo após o nascimento, as células ganglionares se encontram em processo de morte celular natural. Na retina de ratos, este período degenerativo ocorre de P0 a P10, sendo que nos primeiros cinco dias a degeneração apresenta-se mais acentuada. Cerca de 50% das células ganglionares inicialmente geradas morrem em decorrência deste fenômeno regressivo (LINDEN; PERRY, 1982). Quando axotomizadas, aproximadamente 80% das células ganglionares de ratos neonatos morrem por apoptose nas primeiras 24 horas (RABACCHI et al., 1994). Vários experimentos *in vitro* comprovam a hipótese do efeito dos fatores tróficos no controle da sobrevivência das células ganglionares (ARMSON; BENNETT; RAJU, 1987).

2.1 – Morte celular

A morte celular natural parece controlar o número de células neuronais e gliais no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). No entanto, vários trabalhos apontam um papel importante da apoptose nas doenças neurodegenerativas e em processos de envelhecimento. A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos, que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células (KERR; WYLLIE; DURRIE, 1972). A morte celular por apoptose participa de vários eventos fisiológicos tais como o colapso endometrial durante a menstruação, a deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais expressas morfológicamente por condensação e fragmentação cromatínica e formação de protuberâncias na superfície celular (ANAZETTI; MELO, 2007).

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidos de mem-

FIGURA 2 Retina em desenvolvimento. Pode-se notar que nesta fase a retina é basicamente composta por retinoblastos, evidenciando apenas as células ganglionares (SOUZA, 2006)



brana plasmática (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (KERR, 1995; KERR, 2002).

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

A primeira vez que se descreveu o fenômeno de apoptose foi em 1906, e desde então este fenômeno continuou a ser estudado por inúmeros pesquisadores, havendo destaque para o estudo no sistema nervoso. Durante os períodos iniciais de desenvolvimento do sistema nervoso, cerca de metade dos neurônios gerados morrem. A teoria neurotrófica postula que os neurônios competem por quantidades limitadas de fatores tróficos liberados pelos seus alvos. As células que conseguem estabelecer os contatos sinápticos adequados sobrevivem, pois são capazes de obter os fatores tróficos em quantidades suficientes para sua sobrevivência (PURVES; LICHTMAN, 1985).

2.3 – Formação tecidual

A formação de um tecido orgânico é um evento fisiológico que envolve inúmeros mecanismos, que ocorrem em etapas responsáveis pela sua boa formação e funcionabilidade. A interação entre os vários tipos celulares garante a estabilidade de um sistema neuronal. Para que uma célula nervosa consiga se estabilizar definitivamente, em primeiro lugar, ela necessita encontrar seus alvos, de onde receberão fatores tróficos, dando início ao processo de estabilização sináptica com a população alvo (LEVI MONTALCINI; HAMBURGER, 1953). Entretanto, sabe-se que a ligação dos aferentes se faz necessária para que essa estabilidade neuronal continue (OKADO; OPPENHEIM, 1984). Após a conexão dos aferentes, uma corrente elétrica é gerada e por algum motivo é de fundamental para a sobrevivência (LINDEN, 1994). Provavelmente essa atividade elétrica contribui com a liberação de alguma molécula neurotransmissora ou neuromoduladora que sinalize a produção e/ou liberação de alguma molécula trófica. Pode também ocorrer a liberação de fatores tróficos produzidos por

astrócitos que continuariam a inibir o início do processo apoptótico e assim contribuir para a sobrevivência neuronal.

Em 1997, Pereira e Araújo confirmaram em seus experimentos a hipótese da interação celular incluindo eventos mediados por células astrocíticas, onde a possibilidade das células gliais interagirem juntamente com outros tipos celulares para manutenção da sobrevivência neuronal foi sustentada pelos experimentos que mostraram que a inibição da proliferação glial aboliu totalmente o efeito na manutenção da sobrevivência.

Devido à retina ser um excelente modelo, com várias vantagens quando comparado a outros modelos experimentais, ela tornou-se muito estudada. Isso nos leva a incluir a cultura de células da retina como rotina laboratorial para efetuar estudos com diversas substâncias, fármacos e drogas, relacionando seu efeito de forma comparativa com outros locais e modelos que utilizam o SNC.

III – Materiais e métodos

Para a realização dos experimentos, utilizamos ratos neonatos da linhagem Wistar, de ambos os sexos, nas primeiras 72 horas após o nascimento (P0-P3). Os procedimentos realizados com estes animais seguem os padrões e normas da Sociedade de Neurociências.

Os animais foram sacrificados por decapitação e seus olhos foram removidos e colocados em solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF). A seguir, suas retinas foram dissecadas e dissociadas enzimaticamente com tripsina 0,1% por aproximadamente 30 minutos a 37°C. Logo depois, as células foram lavadas com CMF e trituradas mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta afilada e plaqueadas em lamínulas de vidro tratadas previamente com 50 µg/mL de poli-L-ornitina, num volume total de 2mL em meio de cultura completo (Meio 199, 5% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e glutamina 2mM).

As células permaneceram aderindo nas lamínulas por um período de 4 horas na estufa, a 37°C com 95% de ar e 5% CO₂. A seguir, as lamínulas foram fixadas em solução de glutaraldeído e paraformaldeído nos intervalos 4, 24, 48 horas e, posteriormente, montadas em lâminas com bálsamo do Canadá. A análise estrutural das células foi realizada em microscópio óptico.

IV – Resultados

A análise microscópica das culturas revela modificações morfológicas entre os intervalos experimentais. A cultura de quatro horas apresenta crescimento inicial de rede conectiva demonstrando a viabilidade da cultura (Figuras 3 e 4).

Após 24 horas, a cultura apresenta modificações quanto à sua morfologia, onde podemos observar a formação de processos axonais, translocação de células neuronais se posicionando sobre as células gliais, formando uma rede conectiva como se pode ver nas Figuras 5 e 6.

No intervalo de 48 horas, as culturas apresentaram redes intercelulares evidentes e uma camada de células neuronais sobrepondo células da glia, Figuras 7 e 8. Esta sobreposição de células neuronais na cultura de 48 horas é mais evidente em comparação com a cultura de 24 horas, confirmando a interação neurônio-glia para manutenção da sobrevivência neuronal.

V – Discussão

A cultura de células da retina de ratos como modelo experimental demonstrou ser bastante reprodutível, uma vez que o escopo do presente trabalho foi atingido, sendo obtidas culturas aparentemente sem contaminações, células bem dissociadas, sendo possível assim uma análise fiso/morfológica bem caracterizada.

Vemos, após 4 horas de plaqueamento, que as culturas mostravam um elevado índice de sobrevivência celular tanto de células neuronais como gliais. Uma das maiores dificuldades das culturas de células é uma boa dissociação celular e uma cultura sem contaminações de bactérias, fungos ou tipos celulares indesejáveis como, por exemplo, fibroblastos. Observamos que após o período de incubação de 4 horas as culturas apresentavam características evidentes de uma boa cultura de células.

Após 24 horas, a cultura mostrou toda a sua exuberância, em que observamos os neurônios gerando uma complexa e bem definida rede axonal e dendrítica, fazendo conexões entre os vários núcleos de células gliais. Uma das características das culturas de células neuronais é a formação de um arranjo celular que tenta mimetizar a formação de um sistema nervoso como ocorrido *in vivo*. Os neurônios vão se dirigindo para seu suporte natural (células da glia) se sobrepondo a elas, instalando e formando uma rede conectiva (KAPLAN; STEPHENS, 1994; OPPENHEIN; SCHWARTZ; SHATZ, 1992). Todo esse processo é observado e bem definido em toda evolução de nossas culturas.

Em culturas de 48 horas, já podemos observar o início do processo apoptótico. De modo geral, as culturas após 48 horas devem ser suplementadas com meio de cultura para manutenção da sobrevivência. Entretanto, por motivo ainda não bem estabelecido inicia-se o processo apoptótico, principalmente em células neuronais. Culturas mistas mantidas por períodos superiores a 48 horas apresentam uma perda de células neuronais e a formação de monocamada de células gliais que também é um excelente modelo para o estudo desse tipo

FIGURA 3 Podemos ver células bem dissociadas com aumento de 40X

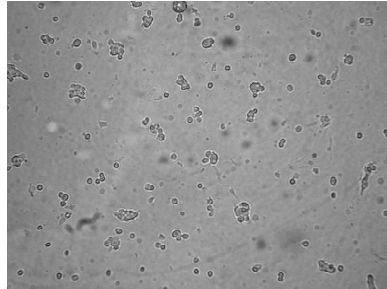


FIGURA 4 Em maior aumento (100X), observamos o início da formação dos primeiros terminais neuronais (seta)

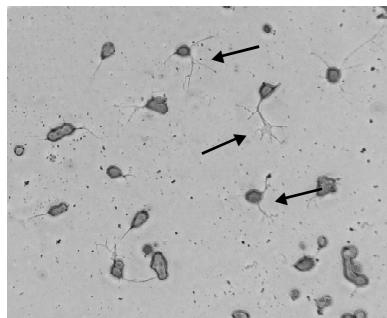


FIGURA 5 Notamos grandes diferenças morfológicas com formação de processos conectivos interligando grandes grumos, estes processos estão indicados pelas setas (40X)

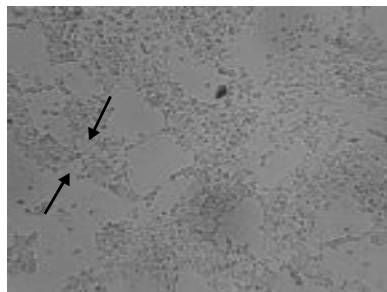


FIGURA 6

Observamos, nesta cultura, a presença de células gliais bem diferenciadas (seta) e conexões entre grupamentos devido à formação de rede (retângulo) (40X e zoom óptico 2X da câmera)

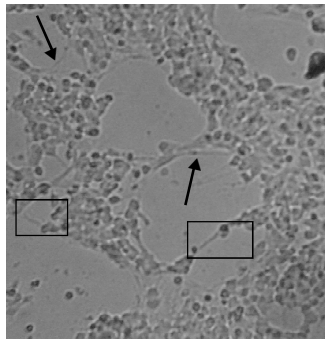


FIGURA 7

Notamos cultura bem desenvolvida iniciando a formação de monocamada de células gliais (seta) (40X)

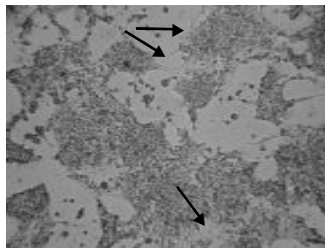
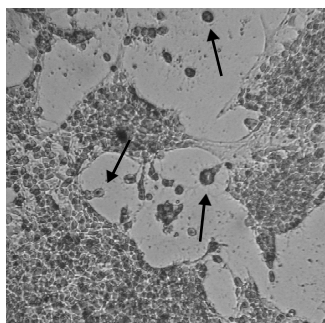


FIGURA 8

Observamos neurônios com núcleo apoptótico (seta) e debris celulares (círculo) demonstrando morte celular (40X e zoom óptico 2X da câmera)



celular. Podemos confirmar esta etapa do processo em nossas culturas devido à presença de núcleos apoptóticos em células neuronais e o surgimento de debris, pequenos pedaços de membranas de células que *in vivo* seriam fagocitadas. Através desse trabalho podemos confirmar a possibilidade de utilização de culturas de células mistas da retina como um modelo experimental a ser implantado como rotina laboratorial em nossa instituição.

A retina é um modelo amplamente utilizado em experimentos onde ocorrem estudos ligados ao desenvolvimento do sistema nervoso central, a utilização de drogas e fármacos, possibilitando trabalhos de biologia celular e molecular e o estudo de várias patologias que acometem o sistema nervoso.

VI – Conclusão

Após a ruptura do nervo óptico, neste estágio do desenvolvimento, a sobrevivência neuronal não depende apenas dos nutrientes encontrados no meio. Na verdade depende também, da interação entre os diferentes tipos celulares encontrados em nossas culturas gerando atividade elétrica através de neurotransmissores, assim como liberação de moléculas tróficas e citocinas que controlam a sobrevivência neuronal (VIEIRA; SOUZA; KAPECZINSKI, 2002). Essas moléculas são liberadas e sintetizadas pelos diferentes tipos celulares que compõem nossas culturas (ECLANCHER et al., 1996; GUILLEMIN et al., 1996; SUGITA et al., 1999). Amostras que apresentavam um elevado nível de interação celular no intervalo de 24 a 48 horas demonstram maior sobrevivência de neurônios e a proliferação de tipos celulares como células da glia. Trabalhos recentes vêm demonstrando que o processo apoptótico assim como processos oncogênicos dependem da ativação de moléculas ligadas à atividade inflamatória ativando cascatas intracelulares como Ras, Raf e MAP kinases que tem suas vias intracelulares ativadas por vários fatores como TNF e INF- α (EASTMAN, 1995). Essa ativação ou inibição do processo mitótico ou de morte celular ocorre devido a variados eventos já citados, como a atividade elétrica gerada pelas conexões entre células, que levam a liberação de neurotransmissores, moléculas tróficas, fatores de crescimento e citocinas, controlando a homeostase dos organismos vivos possibilitando o estudo desses eventos celulares (PEREIRA; ARAÚJO, 2001).

Por outro lado, sua localização periférica privilegiada permite fácil obtenção, livre de tecido conjuntivo adjacente e de outras populações neuronais. A retina apresenta número limitado de tipos celulares, sendo dotada de diferentes circuitos neurotransmissores, tornando-a um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e manutenção de células do tecido nervoso central *in vitro* e *in vivo* (DOWLING, 1991). Devido a isso, o

cultivo de células *in vitro* é uma ferramenta muito utilizada na pesquisa atual com importante ênfase nas áreas da saúde clínica e patológica, servindo como base para realização de estudos com drogas e substâncias que estabelecem influência sobre esses intrincados mecanismos fisiológicos (ANAND et al., 1997; LINDSAY; THOENEN; BARDE, 1985; LEWIN; BARDE, 1996; TERENCEHI, 1999, CHAO, 2003; AIRAKSTEIN; SAARMA, 2002).

Este trabalho faz parte de um projeto de implantação do modelo experimental com cultura de células que inclui células da retina de ratos e camundongos. Esse projeto vem sendo implantado na Faculdade de Minas (FAMINAS) e a partir do uso desta técnica como rotina experimental, iniciaremos experimentos testando várias drogas e fármacos voltados à pesquisa clínica e farmacológica em diversas patologias que acometem a população.

Referências bibliográficas

ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain permeability. **Journal of Anatomy**, Inglaterra, v. 200, p. 629-638, 2002.

ACHESON, A.; LINDSAY, R. M. Non-target-derived roles of the neurotrophins. **Philosophical Transactions Biological Sciences**, v. 351, p. 417-422, 1996.

AGUIAR JR., Aderbal S.; PINHO, Ricardo A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 13, n. 5, 2007.

AIRAKSTEIN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF Family: Signaling, biological functions and therapeutic value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 383-394, 2002.

ANAND, P.; TERENCEHI, G.; BIRCH, R.; WELLMER, A.; CEBARDAUM, J. M.; LINDSAY, R. M.; WILIANS-CHESNUT, R. E.; SINCROPI, D. V. Endogenous NGF and CTNF levels in human peripheral nerve injury. **Neuroreport**, v. 8, p. 1935-1938, 1997.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, SP, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ARMSON, P. F.; BENNETT, M. R.; RAJU, T. R. Retinal ganglion cell survival and neurite regeneration requirements: the changes from Muller cell dependence to superior colliculli dependence during development. **Dev. Brain Res.**, v. 32, p. 207-216, 198.

BLOTTNER, D; BAUMGARTEN, H. G. Neurotrophs and regeneration *in vivo*. **Acta Anatomica**, v. 150, p. 235-245, 1994.

CEPKO, C. L. Retinal cell fate determination Prog. In: Progress in neural research. Pergamon Press, **Retinal Res.**, v. 12, p. 1-12, 1993.

CHAO, V. M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. **Nature Reviews**, v. 4, p. 299-309, 2003.

COWAN, W. M. Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system. In: M. Rockstein (Ed.). Development and aging in the nervous system. New York: **Academic Press.**, Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system, p. 19-23, 1979

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, Holanda, n. 265, p. 49-72, 2002.

DA SILVA, C. Fatores Neurotróficos: estrutura, funções e aplicações clínicas. **Atual. Neuroc.**, v. 1, p. 1-19, 1995.

DAVIES, A. M. The Neurotrophic Hypothesis: Where Does it Stand? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 351, p. 389-394, 1996.

DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thromb . Res.**, Estados Unidos, v. 98, p. 73-81, 2000.

DIB, K.; EL JAMALI, A.; JACQUEMIN, C.; CORREZE, C. Cyclic AMP Regulation of Messenger RNA Level of the Stimulatory GTPBinding Protein Gs alpha. Isoproterenol, Forskolin and 8- Bromoadenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Increase the Level of Gs Alpha mRNA in Cultured Astroglial Cells. **Eur J Biochem.**, v. 219, p. 529-37, 1994.

DOWLING, J. E. Retina. **Enc. Human Biol.**, v. 6, p. 615-631, 1991.

DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B. Glucose, insulin and insulin like growth factor I regulate the glycogen content in astroglial-rich primary cultures. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 511-517, 1992.

DYER, M. A.; CEPKO, C. L. Regulating proliferation during retinal devepolment. **Nat. Rev. Neurosci.**, Inglaterra, v. 2, p. 333-342, 2001.

EASTMAN, A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis. **Semin. Cancer Biol.**, Inglaterra, v. 6, p. 45-52, 1995.

ECLANCHER, F.; KEHRLI, P.; LABOURDETTE, G.; SENSENBRENNER, M. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Injection Activates the Glial Reaction in the Injured Adult Rat Brain. **Brain Res.**, v. 737, p. 201- 214, 1996.

ERIKSSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A. M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D. A. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Med.**, Estados Unidos, v. 4, n. 11, p. 1313-1320, 1998.

FARBER, D.; ADLER, R. Issues and questions in cell biology of the retina. In Farber, D. and Adler, R. (eds): The Retina. a model for Cell Biology Studies. Part I. **Academic Press Inc. (London) Ltd.**, Inglaterra, p. 2-16, 1986.

FENRICH, K; GORDON, T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems; current, issues and advances. **Can.J.Neurol. Sci**, v. 31, p. 142-156, 2004.

FUNAKOSHI, H.; FRISEN, J.; BARBANY, G.; TIMMUSKY, T.; ZACHRISSON, O.; VERGE, V. M. K.; PERSSON, H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 455-465, 1993.

GLOWINSKI, J.; MARIN, P; TENCE, M.; STELLA, N.; GIAUME C.; PREMONT, J. Glial Receptors and their Intervention in Astrocytoastrocytic and Astrocyto-neuronal Interactions. **Glia.**, v. 1, p. 201-8, 1994.

GOULD, E.; TANAPAT, P; MCEWEN, B. S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Proliferation of granule cells precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proc Natl Acad Sci.**, Estados Unidos, v. 95, n. 6, p. 3168-71, 1998.

GUILLEMIN, G.; BOUSSIN, F.D.; L E GRAND, R.; CROITORU, J.; COFFIGNY, H.; DORMONT, D. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Stimulates *in vitro* Proliferation of Astrocytes Derived from Simian Mature Brains. **Glia.**, v.16, p. 71-80, 1996.

HALEGOUA, S; ARMSTRONG, R. C.; FREMER, N. E. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Inglaterra, v. 165, p. 119-170, 1991.

HEUMANN, R.; ILNDHOLM, D.; BANDTLKOW, C.; MEYER, M; RADEKE, M. J.; MISKO, T. P.; SHOOTER, E.; THOENEN, H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Estados Unidos, v. 84, p. 8735-8739, 1987.

KAPLAN, D. R. A.; STEPHENS, R. M. Neurotrophin signal transduction by the TrK receptor. **Neurobiol.**, Estados Unidos, v. 25, p. 1404-1417, 1994.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, Inglaterra, n. 26, p. 239-257, 1972.

KERR, J. F. R. Neglected opportunities in apoptosis research. **Trends Cell Biol.**, n. 5, p. 55-57, 1995.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, Irlanda, n. 182, p. 471-474, 2002.

KIMELBERG, H. K.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes. **Scient. Amer.**, v. 260, p. 44-52, 1989.

KOLB, H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina – The proctor lecture. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Estados Unidos, v. 35, p. 2385-2404, 1994.

LAMING, P. R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.; MULLER, C.; ROOTS, B. – Neuronal–glial Interactions and Behaviour. **Neurosc Biobehav Rev.**, Estados Unidos, v. 24, p. 295-340, 2000.

LEVITT, S. P.; RAKIC, P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. **J. Comp. Neurol.**, Estados Unidos, v. 193, p. 815-840, 1980.

LEWIN, G. R.; BARDE, Y. A. Physiology of neurotrophins. **Annu. Rev. Neuroscience**, v. 19, p. 289-317, 1996.

LINDEN, R. The survival of developing neurons: A review of afferent control. **Neuroscience**, Estados Unidos, v. 58, p. 671-682, 1994.

LINDEN, R.; PERRY, V.H. Ganglion cell death within the developing retina: a regulatory role for retina dendrites? **Neuroscience**, Estados Unidos, v. 11, p. 2813-2827, 1982.

LINDSAY, R. M.; THOENEN, H; BARDE, Y. A. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. **Dev. Biol.**, v. 122, p. 319-328, 1985.

MARQUARDT, T.; GRUSS, P. Generating neuronal diversity in the retina: on for nearly all. **TRENDS. Neuroscience**, Estados Unidos, v. 25, p. 32-38, 2002.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, Houston, n. 99, p. 157-168, 1998.

MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal**, n. 36, p. 539-543, 2000.

MENDELL, L. M. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. **Journ. Physiol.**, v. 533, p. 91-97, 2001.

MEYER, M.; MATSUOKA, I.; WETMORE, C.; OLSON, L.; THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for regulation of BDNF and NGF mRNA. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 45-54, 1992.

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

OKADO, N.; OPPENHEIM, R. W. Cell death of motoneurons in chick embryo spinal cord. IX. The loss of motoneurons following removal of afferent inputs. **J. Neuroscience**, Estados Unidos, v. 4, p. 1639-1652, 1984.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Ann. Neuroscience**, Estados Unidos, v. 14, p. 453-501, 1991.

OPPENHEIM, R. W.; SCHWARTZ, M. L.; SHATZ, C. J. Neuronal death, a tradition of dying. **J. of Neurobiol.**, Estados Unidos, v. 23, p. 1111-1115, 1992.

PEREIRA, S. P. F.; ARAÚJO, E. G. Veratridine increase the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, Brasil, v. 30, n. 12, p. 1467-1470, 1997.

PEREIRA, S. P. F.; ARAÚJO, E. G. Chronic depolarization induced by veratridine increase the survival of retinal ganglion cells after 48 hours *in vitro*. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Estados Unidos, v. 207, p. 773 – 780, 2000.

PEREIRA, S. P. F.; ARAÚJO, E. G. Cholinergic activity modulates the survival of retinal ganglion cells in culture: The role of M₁ muscarinic receptors. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Estados Unidos, v. 19, p. 559-567, 2001.

PURVES, D.; LICHTMAN, J. W. Principles of Neural Development. **Sinauer Associ. Inc.**, Sunderland, p. 131-153.

RABACCHI, S. A.; ENSINI, M.; BONFANTI, L.; GRAVINA, A.; MAFFEI, L. Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. **Neuroscience**, Estados Unidos, v. 63, p. 969-973, 1994.

RAFF, M. C.; MILLER, R. H.; NOBLE, M. A glia progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or oligodendrocyte depending on culture medium. **Nature**, Estados Unidos, v. 303, p. 390-396, 1983.

RAKIC, P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. **J. Comp. Neurol.**, Estados Unidos, v. 141, p. 283-312, 1971.

- RAKIC, P. Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci.**, Estados Unidos, v. 92, n. 25, p. 11323-11327, 1995.
- RAKIC, P. Elusive Radial Glial Cells: Historical and Evolutionary Perspective. **Glia.**, Estados Unidos, v. 43, p. 19-32, 2003.
- RICHARDSON, P. M. Neurotrophic factors in regeneration. **Curr. Op. Neurob.**, v. 1, p. 401-406, 1991.
- SCORZA, F. A. et al. Neurogênese e depressão: etiologia ou nova ilusão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 249-253, 2005.
- SOUZA, A. R. FGFb e o crescimento de processos das células da retina. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2006.
- SUGITA, Y.; ZHAO, B.; SHANKAR, P.; DUNBAR, C. E.; DOREN, S.; YOUNG, H. A.; SCHWARTZ, J. P. CNS Interleukin-3 (IL-3) Expression and Neurological Syndrome in Antisense-IL-3 Transgenic Mice. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 58, p. 480-488, 1999.
- SYKOVA, E.; JANDELOVA, P.; SVOBODA, J.; SEDMAN, G.; NG, K.T. – Activity-Related Rise in Extracellular Potassium Concentration in the Brain of 1–3-day-old Chicks. **Brain Res Bull.**, Estados Unidos, v. 24, p. 569-75, 1990.
- TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat.**, Inglaterra, v. 194, p. 1-14, 1999.
- VIEIRA, R. M.; SOUZA, D. O.; KAPECZINSKI, F.; Neuropatologia de células gliais em modelo de integração neurônio-glia no transtorno de humor bipolar. **Revista de Psiquiatria. Clínica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 197-203, 2002.
- WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, Estados Unidos, n. 68, p. 251-305, 1980.