VERA PASCHON

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CONEXINAS NA RETINA: UM ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOQUÍMICO E FUNCIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2009

VERA PASCHON

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CONEXINAS NA RETINA: UM ESTUDO MORFOLÓGICO, BIOQUÍMICO E FUNCIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara

São Paulo
2009

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

© reprodução total

Paschon, Vera.
Modulação da expressão de conexinas na retina: um estudo morfológico, bioquímico e funcional / Vera Paschon. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Alexandre Hiroaki Kihara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação Neuronal.

Versão do título para o inglês: Modulation of connexin expression in retina: a study using morphological, biochemical and functional approaches.

Descritores: 1. Retina 2. Conexinas 3. Desenvolvimento 4. Adaptação ao escuro 5. Junções comunicantes 6. Neurodegeneração I. Kihara, Alexandre Hiroaki II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica III. Título.

ICB/SBIB43/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Vera Paschon

Título da Dissertação: Modulação da expressão de conexinas na retina: um estudo morfológico, bioquímico e funcional

Orientador (a): Alexandre Hiroaki Kihara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **024** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Luiz Roberto Giorgetti de Britto** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Plasticidade de conexinas e proteínas ligantes de cálcio na neurodegeneração retiniana causada por trama mecânico***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Vera Paschon e a pesquisador Alexandre H. Kihara,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **22.10.2007.**

São Paulo, 23 de outubro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

DEDICATÓRIA

“Ao meu Deus, refúgio e fortaleza, por toda a paciência e sabedoria”.

“Aos meus pais Edna e Ailton, por acreditarem na minha capacidade e por incentivarem minhas escolhas profissionais”.

“Ao meu namorado Eduardo, pela força, carinho e amor. E por me ensinar a ser uma pessoa melhor, me incentivando a lutar incansavelmente pelos meus sonhos”.

AGRADECIMENTOS

Durante estes dois anos de preparação e execução deste trabalho tive o privilégio de caminhar lado a lado com pessoas que tiveram grande importância para minha formação acadêmica e para que eu cumprisse meus objetivos e metas traçados. Pessoas que não cruzaram simplesmente meu caminho, mas que entraram na minha vida para sempre e deixaram grandes marcas. Cada um teve uma participação pequena ou grande, mas de fundamental importância nesta caminhada. Esse apoio veio na forma de conselhos, discussões, críticas, colaborações, estudos, auxílios nos experimentos e muito mais. Assim, eu gostaria de agradecer de coração a todos que, de alguma forma, tiveram participação durante esta fase tão importante da minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus, meu refúgio e fortaleza, pela sabedoria e inteligência. Por ter me mostrado que com fé podemos atravessar as mais altas barreiras. Por ter me dado vitória em cada passo alçado e força para seguir adiante.

Ao Professor Alexandre H. Kihara que esteve sempre tão próximo nas horas mais importantes, me ensinando cada técnica com carinho e instigando meu raciocínio com discussões calorosas e empolgantes, fazendo crescer em mim a sede de buscar o conhecimento através da pesquisa.

Ao Professor Luiz R. G. Britto, pela oportunidade de trabalhar em um laboratório tão maravilhoso, por ter me incentivado a seguir essa carreira, pela paciência, pelos ensinamentos e por ser sempre tão solicito e ágil em resolver problemas.

Aos alunos de pós-graduação e graduação do grupo de estudo Conexinas. À Vivian Guedes pelo apoio intelectual, pelas discussões filosóficas, pelo humanismo e pelo carisma. À Caroline Margonato pela alegria, simplicidade e por toda a ajuda prática. Ao Guilherme por ser um bom e velho amigo do segundo grau que se empenhou em estudar nossos trabalhos a fundo, sempre discutindo e apresentando sugestões. À Thaís Barbosa por doar parte do seu tempo para me ajudar com os

experimentos mais difíceis, por compartilhar bons momentos juntas e por se divertir discutindo ciência. Ao Julian pelas contribuições científicas.

Ao técnico Adilson pela paciência, agilidade, capacidade de resolver problemas e principalmente pela alegria contagiante que torna o dia a dia das pessoas no laboratório mais agradáveis.

À Professora Andrea da Silva Torrão que teve grande importância na minha iniciação a pesquisa científica e sempre me apoiou com técnicas, equipamentos e sugestões.

A todos os colegas do laboratório de Neurobiologia Celular que sempre foram muito prestativos e solícitos: Mauro Leonelli, Daniel Martins, Caroline Real, Rafaela Pestana, Érika Kinjo, Rosana Pagano, Marucia Chacur, Marina Sorrentino, Kallene Vidal, Ana Ferreira, Daniela Varin, Milena, Gabriela Chaves, Taisa Santos e Caio.

À Professora Dânia Hamassaki e aos técnicos Leandro Montovani e Priscila Sayami pelas colaborações e auxílio técnico.

À Professora Jean Jiang da Universidade do Texas pelo apoio e colaboração internacional, enviando anticorpos e participando de parte dos nossos trabalhos.

Aos meus pais, verdadeiros educadores que sempre investiram no meu crescimento intelectual, por terem acreditado que eu poderia chegar onde estou e por todo apoio e amor.

Agradeço de forma especial ao meu namorado Eduardo Cordeiro, por ter se tornado um exemplo de vida para mim. Sempre estendeu a mão quando percebia que eu poderia tropeçar e esteve ao meu lado sempre que eu precisei, me incentivando e acreditando em mim. Obrigada por me ajudar a conquistar meus sonhos e juntos traçarmos nossa vida!!!

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Obrigada!!!

“Ame muitas coisas, porque em amar está a verdadeira força. Quem ama muito conquistará muito, e o que for feito com amor estará bem feito”.

(Vincent Van Gogh)

RESUMO

Paschon V. Modulação da expressão de conexinas na retina: um estudo morfológico, bioquímico e funcional [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A vida é um processo dinâmico no tempo e no espaço, resultante da interação entre o meio interno, regido pelos genes, e estímulos provenientes do meio ambiente. Em um organismo complexo formado por inúmeras células, uma forma importante de interação ocorre por meio do acoplamento provido pelas junções comunicantes (JCs), canais formados por conexinas (Cxs) que permitem a passagem de moléculas de até 1kDa, como o AMPc, o IP_3 e íons. O acoplamento celular participa de processos relacionados com o desenvolvimento, sinalização visual e apoptose. Em particular, a passagem de íons cálcio pelas JCs desempenha papel importante na determinação da sobrevivência/morte neuronal devido a citotoxicidade deste íon em altas concentrações. Entretanto, estudos utilizando bloqueadores farmacológicos de JC e modelos animais KO para Cxs têm apresentado resultados contraditórios com relação ao papel do acoplamento na neurodegeneração. Neste trabalho, observamos a modulação de Cxs durante o desenvolvimento, na adaptação ao escuro e após trauma mecânico na retina. Utilizando técnicas combinadas, como PCR em tempo real, w*estern blot* e imuno-histoquímica, avaliamos a expressão espaço-temporal de Cxs nas diferentes condições experimentais. Nossos resultados revelaram uma modulação significativa de Cxs durante a histogênese da retina, indicando papéis variados desses genes em processos como proliferação e diferenciação neuronal. A Cx43 apresentou alta expressão nos estágios iniciais do desenvolvimento e alterações do estado fosforilativo ao longo do desenvolvimento e no adulto; por outro lado, observamos altos níveis de expressão da Cx45 ao longo de todo o desenvolvimento; finalmente, as Cx50 e Cx36 estão virtualmente ausentes no início do desenvolvimento, mas apresentam alta expressão gênica e protéica no final do desenvolvimento e no adulto. Em experimentos de adaptação ao escuro detectamos regulação positiva da Cx36 após 24h, evidenciando um possível aumento do acoplamento de fotorreceptores. Observamos também a expressão das Cx36 e Cx43 durante a degeneração retiniana causada por trauma mecânico, modelo que permite a visualização do foco, penumbra e áreas adjacentes à lesão. A expressão da Cx36

variou moderadamente nos diferentes tempos pós-lesão, enquanto a Cx43 apresentou alterações do estado fosforilativo, aumento de expressão gênica e protéica. Funcionalmente, o papel do acoplamento foi estudado por meio de bloqueadores e abridores de JCs, combinados com métodos para avaliar a morte/viabilidade celular (TUNEL, Fluoro-Jade B e lactato desidrogenase, LDH). Observamos que mudanças no padrão de acoplamento têm efeito sobre a perda neuronal secundária. Concluindo, a expressão de Cxs na retina de pintos sofre modulação durante a histogênese, adaptação às condições de iluminação e em processos degenerativos. Além disso, alteração da permeabilidade dos canais de JCs pode constituir uma estratégia importante de neuroproteção.

Palavras–Chave: Retina; Conexinas; Junções Comunicantes; Desenvolvimento; Adaptação ao escuro; Neurodegeneração.

ABSTRACT

Paschon V. Modulation of connexin expression in retina: a study using morphological, biochemical and functional approaches [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Life is a dynamic process that takes place in time and space, resulting from intracellular (genetic coordination) and enviromental interactions. In complex multicellular organisms, an important form of interaction occurs by cell-cell coupling provided by gap junctions (GJs) channels. GJ channels are composed by proteins called connexins (Cxs), which permit the passage of small molecules up to 1kDa, like AMPc, IP_3 and ions. Cellular coupling is involved in development, neuronal and glial signaling and degeneration. In particular, the passage of calcium ions through the GJs plays an important role in neuronal survival/death, due to its cytoxicity in high concentrations. However, studies using GJ pharmacological blockers and KO animal models endowed apparently contradictory results in relation to the role of coupling in neuroprotection. In this work, we analyzed the expression of Cxs during development, dark adaptation and after mechanical trauma of the retina. Using techniques such as real time polymerase chain reaction, western blot and immuno-histochemistry, we assessed the spatiotemporal expression of Cxs in diverse experimental conditions. Our results revealed a significant modulation of different Cxs during retina histogenesis, indicating different functions of these genes in processes like neuronal proliferation and differentiation. We found that Cx43 is highly expressed at early embryonic development and shows different phosphorylative forms in the end of development and in adult chick retina; in the other hand, we observed high protein levels of Cx45 through development; finally Cx50 and Cx36 are virtually absent in the early development, but their expression increased over time. In dark-adaptation experiments, Cx36 gene expression was significantly up-regulated after 24 hours, suggesting an increase in photoreceptor coupling. Furthermore, we analyzed Cx36 and Cx43 expression pattern during retinal degeneration, caused by mechanical lesion, a model that permit to visualize the focus, penumbra and adjacent areas. Cx36 expression steady state levels mildly changed during the degenerative process, whereas Cx43 exhibited modifications in the phosphorylation status, protein levels and gene expression. The functional role of coupling was assessed by employing GJ blockers and openers, combined with methods for evaluating cellular

death/viability (TUNEL, Fluoro-Jade and lactate dehydrogenase, LDH). Indeed, changes in cell coupling affected secondary cell loss. To summarize, Cx expression in chick retina was modulated during histogenesis, dark adaptation and in degenerative processes. In addition, control of GJ channel permeability may take part in reliable neuroprotection strategies.

Keywords: Retina; Connexins; Gap Junction; Development; Dark adaptation; neurodegeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

JC - junção comunicante

Cx - conexina

SNC - sistema nervoso central

SN - sistema nervoso

KO - knockout

RPE - epitélio pigmentado retiniano

PL - camada de fotorreceptores

ONL - camada nuclear externa

OPL - camada plexiforme externa

INL - camada nuclear interna

IPL - camada plexiforme interna

GCL - camada de células ganglionares

NFL - camada de axônios retinianos

PFA - paraformaldeído

PB - tampão fosfato

BS - solução salina tamponada

PI - iodeto de propídio

CB - calbindina

GFAP - proteína fibrilar glial

PCR - reação em cadeia de polimerase

TUNEL - " *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end-labeling"*

LDH - lactato desidrogenase

CBX - carbenoxolone

TMA - trimetilamina

GAPDH - gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase

TRITC - tetrametil isotiocianato de rodamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo tri-dimensional de canais de JC..... 21

Figura 2: Gráfico de sensibilidade a voltagem de diferentes Cxs..... 22

Figura 3: Esquema da retina de vertebrados..... 25

Figura 4: Vias de sinalização dos bastonetes..... 28

Figura 5: Experimento com diferentes quantidades de cDNA..... 34

Figura 6: Curva de dissociação com e sem produtos inespecíficos..... 35

Figura 7: Detecção da expressão gênica de Cx36 na retina..... 41

Figura 8: Expressão gênica de Cxs durante a histogênese da retina..... 42

Figura 9: Expressão gênica de Cxs durante a histogênese da retina..... 43

Figura 10: Análise semi-quantitativa dos níveis protéicos de Cx36 durante a histogênese da retina..... 44

Figura 11: Análise semi-quantitativa dos níveis protéicos de Cxs durante a histogênese da retina..... 45

Figura 12: Co-localização de Cx36 e calbindina-D na camada plexiforme externa da retina..... 46

Figura 13: Expressão gênica de Cx36 após adaptação ao escuro..... 47

Figura 14: Mudanças na distribuição espacial de Cx36 após adaptação ao escuro..... 49

Figura 15: Caracterização do modelo de lesão mecânica na retina..... 50

Figura 16: Análise da expressão gênica de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração..... 51

Figura 17: Análise dos níveis protéicos de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração..... 52

Figura 18: Análise da distribuição espacial de Cx36 na neurodegeneração..... 54

Figura 19: Análise da distribuição espacial de Cx43 na neurodegeneração..... 56

Figura 20: Histoquímica utilizando Fluoro-Jade B na neurodegeneração..... 57

Figura 21: Ensaio para TUNEL em retinas lesadas após 6 e 24 horas..... 58

Figura 22: Experimentos com TUNEL e Cx36..... 59

Figura 23: Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)..... 60

Figura 24: Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) utilizando bloqueadores e abridores de JCs..... 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
1.1 Junções Comunicantes e Conexinas..... 19
1.2 Acoplamento celular no Sistema Nervoso (SN) 23
1.3 A retina..... 24
1.4 Acoplamento celular no desenvolvimento..... 26
1.5 Acoplamento celular na função visual..... 27
1.6 Acoplamento celular na neurodegeneração..... 28
1.7 Justificativa para o estudo..... 29

2 OBJETIVOS..... 31
2.1 Gerais..... 31
2.2 Específicos..... 31

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 32
3.1 Experimentos de desenvolvimento embrionário..... 32
3.2 Experimentos de adaptação ao escuro..... 32
3.3 Experimentos de neurodegeneração por lesão mecânica..... 33
3.4 Quantificação da expressão gênica de Cxs por PCR em tempo real..... 33
3.5 Quantificação dos níveis protéicos de Cxs por *western blot*..... 35
3.6 Caracterização da distribuição de Cxs por imuno-histoquímica..... 36
3.7 Caracterização morfológica da retina em diferentes tempos pós-lesão..... 37
3.8 Caracterização de degeneração por Fluoro-Jade B..... 37
3.9 Caracterização de apoptose por TUNEL..... 37
3.10 Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) 38
3.11 Análise dos resultados..... 39

4 RESULTADOS..... 40
4.1 Desenhos de *primers* específicos para experimentos de PCR 40
4.2 Expressão gênica de Cx36 e Cx56 na retina..... 41
4.3 Expressão gênica de Cxs no desenvolvimento 42
4.4 Quantificação dos níveis protéicos de Cxs no desenvolvimento..... 44

4.5 Caracterização da distribuição de Cx36 na camada plexiforme externa 46
4.6 Alterações da expressão gênica de Cx36 na adaptação ao escuro..... 47
4.7 Alterações da expressão protéica de Cx36 na adaptação ao escuro..... 48
4.8 Caracterização do modelo de neurodegeneração por lesão mecânica..... 50
4.9 Alterações da expressão gênica de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração..... 51
4.10 Alterações da expressão protéica de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração... 52
4.11 Alterações na distribuição protéica de Cx36 na neurodegeneração..... 53
4.12 Alterações na distribuição protéica de Cx43 na neurodegeneração..... 55
4.13 Caracterização de degeneração por Fluoro-Jade B..... 57
4.14 Caracterização de apoptose por TUNEL..... 58
4.15 Ensaios de viabilidade celular por liberação de lactato desidrogenase..... 59

5 DISCUSSÃO..... 62
5.1 Cxs no desenvolvimento embrionário da retina de pintos..... 62
5.1.1 Cx36 na retina de pintos..... 62
5.1.2 Cx43 na retina de pintos..... 63
5.1.3 Cx45 na retina de pintos..... 63
5.1.4 Cx50 na retina de pintos..... 64
5.2 Cxs na adaptação ao escuro..... 65
5.3 Neurodegeneração retiniana causada por trauma mecânico..... 66
5.3.1 Cxs na neurodegeneração retiniana..... 66
5.3.2 Acoplamento celular na neurodegeneração retiniana..... 68

6 CONCLUSÕES..... 70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 71

ANEXO A..... 78
ANEXO B..... 90
ANEXO C..... 107

1 INTRODUÇÃO

A vida é um processo dinâmico no tempo e no espaço, resultante da interação entre o meio interno, regido pelos genes, e estímulos provenientes do meio ambiente. Em organismos unicelulares, essa interação acompanha a divisão entre o espaço intracelular e extracelular. Em organismos multicelulares, por outro lado, cada célula lida com seu próprio microambiente, que pode estar em contato com o meio externo ou com outras células do próprio organismo. Assim, o meio externo de uma célula é, ao menos parcialmente, o meio interno ao organismo. Ao executar suas informações genéticas, qualquer célula de um organismo complexo reage não diretamente ao seu meio ambiente, mas ao organismo como um todo e aos estímulos ambientais a que está exposto.

As condições do organismo regem cada célula individualmente. Para que isso ocorra, as células precisam estar em sincronia e constante comunicação, condição fundamental para qualquer organismo complexo. Essa comunicação e sincronização podem ocorrer por uma variada gama de sinais, incluindo mensagens químicas e elétricas. Essas mensagens podem ser provenientes de células adjacentes ou distantes e permitem à célula modular os seus padrões de expressão gênica e reações bioquímicas em função do contexto. Em animais, uma das formas mais universais desses sinais entre células vizinhas são as junções comunicantes (JCs), que permitem a propagação de sinais químicos e elétricos, influenciando o comportamento celular.

A comunicação entre as células do organismo é essencial para a manutenção de sua integridade espacial e temporal. Ao longo da vida, o organismo de todo animal passa por uma série de fases, que podem ser divididas de forma geral em três grandes etapas: desenvolvimento, maturidade e degeneração. Cada uma dessas etapas envolve uma série de mudanças no organismo, que são determinadas e executadas pelas células em todo o corpo e precisam ser realizadas de forma ordenada e sincronizada. A comunicação entre as células permite a estabilidade dinâmica do organismo, tanto na sua manutenção quanto nas suas mudanças temporalmente organizadas.

No presente projeto, serão enfatizadas as duas primeiras etapas, ou seja, desenvolvimento e maturidade, nas quais a atividade das células no organismo obedece a padrões distintos. Durante o desenvolvimento, ocorrem transformações

específicas que possibilitam a histogênese, organogênese e crescimento, que resultam em modificações permanentes do organismo em seus aspectos moleculares, morfológicos e anatômicos. Isso requer que as fases do ciclo celular sejam precisamente reguladas por ciclinas e cinases dependentes destas, e também que a proliferação e diferenciação celular aconteçam adequadamente.

Na fase adulta, o organismo pode exercer inúmeras funções com alto grau de complexidade que permitem sua adaptação a ambientes diversos. As células que compõem esses organismos estão maduras para produzir a maquinaria necessária e executar programas estabelecidos previamente. Desta forma podem responder aos estímulos ambientais e sofrerem adaptações se necessário. No sistema visual, a adaptação à luz ou ao escuro, por exemplo, pode requerer a expressão de genes e proteínas que favoreçam a operacionalidade do sistema e aumentem as chances de sobrevivência do indivíduo. A resposta a uma lesão pode envolver um processo degenerativo, e, em paralelo, modificações celulares relacionadas à tentativa de proteção tecidual, inclusive em tecidos neurais. De fato, diversos estudos sugerem que o acoplamento celular provido pelas JCs possui ampla participação em cada fase descrita anteriormente.

1.1 Junções Comunicantes e Conexinas

As JCs são especializações na membrana que permitem a comunicação celular direta, citoplasma - citoplasma. As proteínas que formam os canais de JCs são encontradas em praticamente todos os tecidos de organismos metazoários (Shestopalov e Panchin, 2008) e são muito antigas filogeneticamente, descritas desde *Hydra* e artrópodes até vertebrados em geral (Cruciani e Mikalsen, 2007).

Os canais de JCs são formados por dois hemicanais ou conexônios (ver Figura 1), situados nas membranas de células justapostas (Loewenstein, 1981). Cada conexônio é composto por seis subunidades protéicas da família das conexinas (Cxs) ou das panexinas (Px), que se arranjam formando um poro de 1,5 a 2,0 nm. Através desse poro, passam moléculas com massa de até 1 kDa ou com diâmetro de 10–14 nm (Bruzzone e Ressot, 1997; Kumar e Gilula, 1996). Essas moléculas podem ser metabólitos, como ATP, ADP, glicose, glutamato; segundos mensageiros como o AMPc e o inositol 1,4,5-trifosfato; além de antígenos. Proteínas

e ácidos nucléicos aparentemente não atravessam os canais de JCs (Sáez, et al., 1989).

As moléculas de Cxs atravessam toda a membrana citoplasmática quatro vezes, medindo aproximadamente 7,5 nm em seu eixo mais longo (Unwin e Zampighi, 1980). Elas possuem duas alças extracelulares (C1 e C2) contendo três cisteínas em cada, quatro domínios transmembrana hidrofóbicos (M1, M2, M3 e M4) e dois segmentos citoplasmáticos carboxi e amino terminais. Os segmentos carboxi e amino terminais estão envolvidos com a abertura e fechamento dos canais, conforme a variação do pH (Yeager e Nicholson, 1996; Rozental, et al., 2000).

Atualmente, aproximadamente 16 tipos de Cxs e 3 tipos de Pxs foram identificados no sistema nervoso de mamíferos (Becker, et al., 2002; Huang, et al., 2007). Grande parte das Cxs foi encontrada em células ou regiões específicas do SNC (Naus e Bani-Yaghoub, 1998).

Cada Cx recebe como nome o valor do seu peso molecular em kDa e são divididas em grupos conforme a estrutura protéica. O segmento da molécula entre M2 e M3 forma uma alça intracelular, cujo comprimento e homologia determinam o grupo ao qual cada uma pertence, além disso, o comprimento do segmento carboxi terminal também varia nos diferentes grupos de Cxs (Bennett, et al., 1991). Quando a alça intracelular e o seguimento carboxi terminal são curtos, a Cx é classificada no grupo I ou β e neste grupo estão inclusas as Cx26, Cx29, Cx30, Cx31, Cx31.1 e Cx32. As Cxs do grupo II ou α apresentam os seguimentos mais longos que as demais e incluem as Cx33, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx47, Cx50 e Cx57 (Bennett, et al., 1991). Em adição, a Cx36, que foi descrita recentemente, é classificada como a única Cx pertencente ao grupo III ou γ (Condorelli, et al., 1998).

Por outro lado, em aves, a expressão de Cxs ainda não foi bem determinada: estudos identificaram somente a expressão das Cx26, Cx32 e Cx43 na retina de pintos (Becker, et al., 2002).

Os hemicanais ou conexônios de cada célula justaposta possuem afinidades seletivas entre si, formando canais homotípicos, heterotípicos e heteroméricos. Os canais homotípicos são compostos de 12 subunidades de Cxs idênticas. Por outro lado, nos canais heterotípicos, porém homoméricos, todas as Cxs de um conexônio são iguais, mas são diferentes das Cxs que formam o conexônio da célula adjacente. Nos canais heteroméricos, as Cxs dentro de um conexônio são diferentes nas duas células adjacentes. Os canais também podem ser classificados quanto aos

tipos celulares acoplados. Canais homólogos são formados por hemicanais de duas células do mesmo tipo, canais heterólogos são formados por hemicanais de duas células de tipos variados (Rozental, et al., 2000).

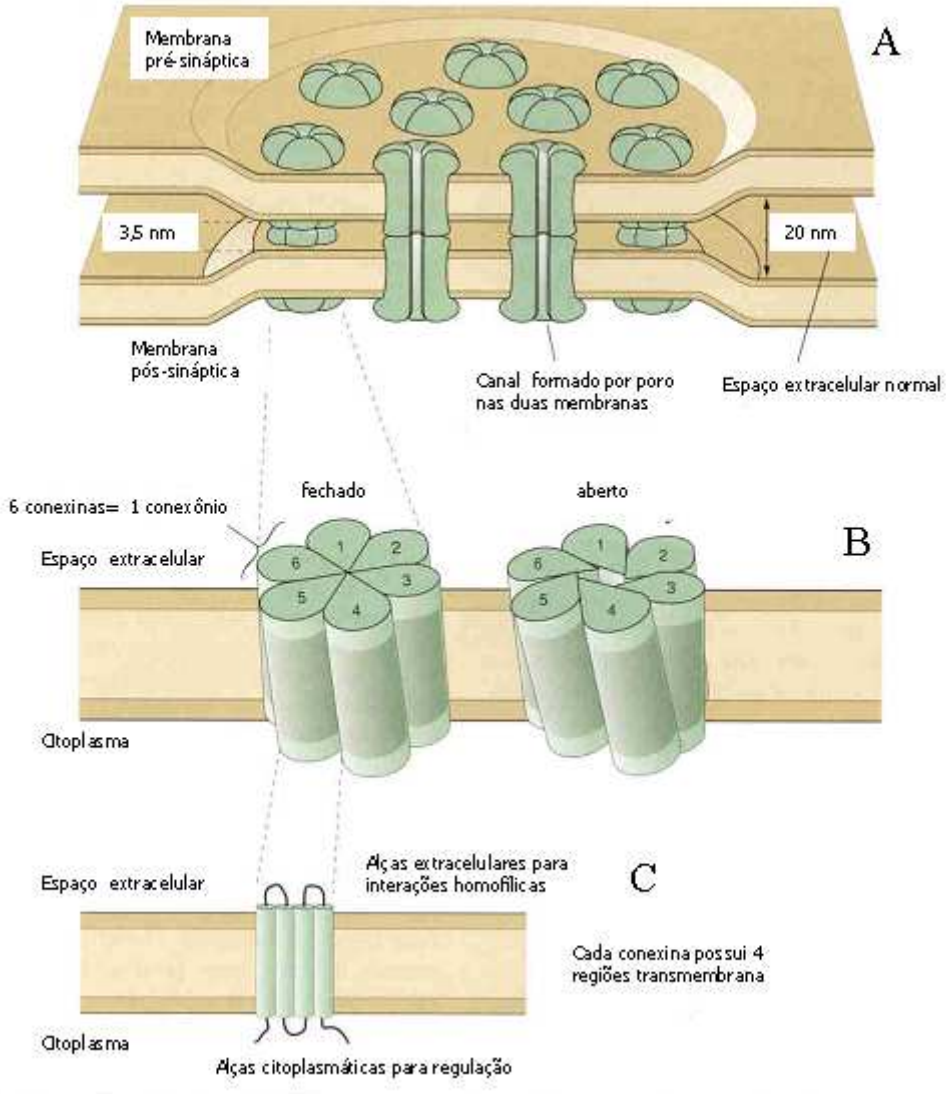

Figura 1- Modelo tri-dimensional de canais de JC, baseados em estudos de difração de raios X. Ultra-estrutura de (A) junção comunicante; (B) conexônio; (C) conexina (Kandel, 1999).

A transmissão via JC pode ser modulada por diversas moléculas e condições fisiológicas. Como exemplo, podemos citar variações na concentração de Ca^{2+}, pH, voltagem intercelular de 15 a 90 mV (Figura 2), ligação de calmodulina, presença de nucleotídeos cíclicos, neurotransmissores e hormônios (isoproteranol, dopamina, acetilcolina, ácido γ-aminobutírico e estrógenos). Os canais de JCs possuem sítios

para protonação e ligação de íons Ca^{2+} e Zn^{2+}, além de locais específicos para que ocorra fosforilação por proteínas quinases (Yeager e Nicholson, 1996). A transcrição de conexinas e o acoplamento também podem ser regulados pela ação de hormônios, matriz extracelular e condições do ciclo celular.

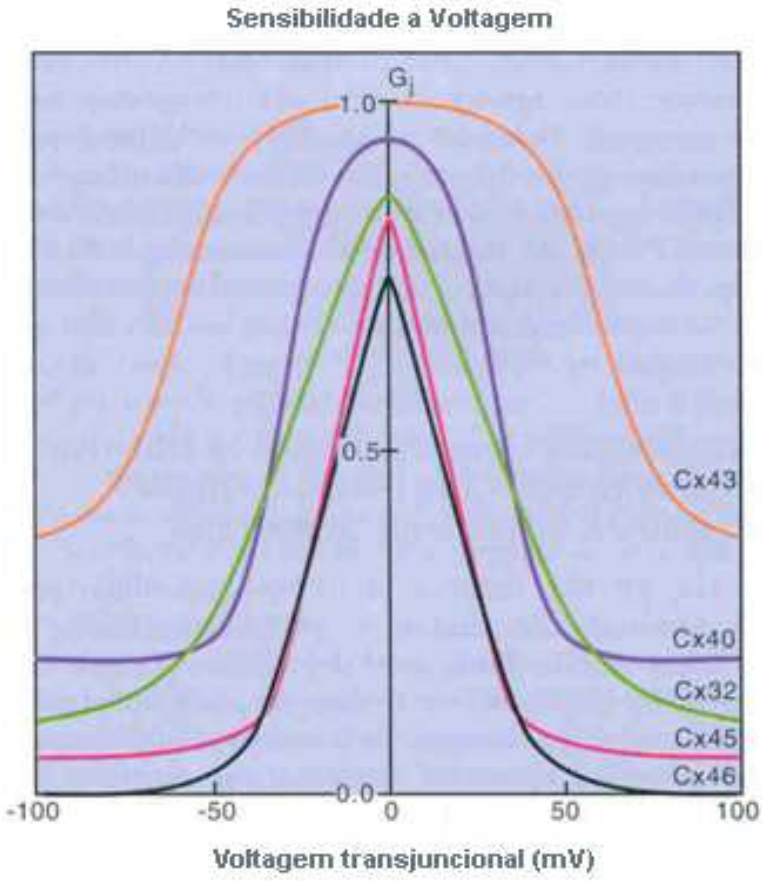

Figura 2- Gráfico de sensibilidade a voltagem de diferentes Cxs. Quando a diferença de voltagem é 0, ou seja, não há diferença de voltagem de uma célula para a outra, a permeabilidade dos canais é máxima (V=0 mV). Quando ocorre variação da voltagem entre as células, a permeabilidade dos canais tende a diminuir (Zigmond, 1999).

A condutância total das JCs, definida pela somação espaço – temporal da condutância de cada canal individualmente, é determinada pelo potencial transjuncional somado a todos os outros fatores descritos anteriormente (White, et al., 1994). Cxs específicas são expressas por diferentes tipos celulares e tecidos, e uma célula isolada pode expressar vários tipos de Cx. Diferenças entre as JCs podem ser resultantes das diferenças entre as Cxs que formam os canais ou das diferenças entre os tipos celulares acoplados (Bennett, et al., 1991).

A expressão diferenciada de Cxs resultando em canais funcionalmente distintos poderia influenciar na difusão de diversas moléculas sinalizadoras (Lo, 1996). Cada Cx possui propriedades específicas quanto à permeabilidade dos canais, à sensibilidade, à voltagem e à condutância unitária. Enquanto algumas JCs são mais permeáveis a ânions, outras têm preferência por cátions ou apresentam seletividade por carga (Orellana, et al., 2009). A expressão de diferentes Cxs em tipos celulares específicos e as regulações durante a histogênese são fundamentais para que os processos fisiológicos ocorram. Além do mais, alterações na expressão destas proteínas parecem estar relacionadas a uma variada gama de processos patológicos (Froes, et al., 1999).

1.2 Acoplamento celular no Sistema Nervoso (SN)

No sistema nervoso (SN), a comunicação celular geralmente se refere à sinapse química. Mas uma grande parte dessa comunicação ocorre através das JCs, também conhecidas como sinapses elétricas. Existem muitas diferenças entre os dois sistemas como, por exemplo, a distância entre as células pré e pós-sinápticas. Nas sinapses químicas, a distância varia entre 20 e 40 nanômetros (nm), enquanto nas elétricas essa distância é de 3,5 nm. O sentido da transmissão é particularmente diferente nos dois sistemas (unidirecional na química e normalmente bidirecional na elétrica). Os dois tipos de sinapses também apresentam diferenças morfológicas fundamentais: a transmissão química necessita de vesículas pré-sinápticas, zonas ativas e receptores pós-sinápticos, enquanto a sinapse elétrica ocorre por meio de canais inseridos na membrana em pontos específicos que formam as JCs (Zigmond, et al., 1999).

Embora as sinapses elétricas sejam caracterizadas pela passagem direta de íons entre as células, sua atividade elétrica pode ser sincronizada por potenciais de ação entre neurônios, deflagrados a partir de sinapses químicas (Rozental, et al., 2000).

Estudos recentes mostraram que as Cxs não possuem apenas funções dependentes de canais. Elas podem formar hemicanais sem formar acoplamento, permitindo a passagem de moléculas como o ATP ou ADP para o meio externo. As Cxs também podem agir na adesão celular promovendo interações entre proteínas (Orellana, et al., 2009), além de agir de outras formas independentes que ainda não

foram bem descritas na literatura. Estudos *in vitro* mostraram que a porção carboxi terminal da Cx43 atua no controle do crescimento celular e da expressão gênica através da interação entre moléculas, e não devido à formação de canais (Theis, et al., 2005). Experimentos com bloqueadores de JCs mostraram que o desacoplamento não interferiu na diferenciação celular do cristalino de pintos. Neste mesmo estudo, sugeriu-se que a porção carboxi terminal da Cx45.6 atua no controle do desenvolvimento independentemente da formação de canais (Jiang e Gu, 2005).

Estudos mostraram que as células gliais acopladas por JCs formam um sincício panglial envolvendo oligodendrócitos e astrócitos, permitindo a manutenção da homeostasia de íons durante a atividade axonal e na degeneração (Nagy e Rash, 2003; Theis, et al., 2005).

1.3 A retina

A retina é um tecido neural com origem ectodérmica, cuja arquitetura morfofuncional está bem caracterizada. Há muito se sabe que a retina é organizada em camadas formadas alternadamente de corpos celulares e processos de neurônios.

Muitos tipos celulares foram descritos na retina (Figura 3). Os fotorreceptores podem ser classificados morfologicamente em cones ou bastonetes. O conjunto dessas células forma a camada nuclear externa (*outer nuclear layer,* ONL), responsável por receber o estímulo luminoso e iniciar a transdução do estímulo eletromagnético em sinal elétrico, que é reconhecido pelo sistema nervoso central (SNC). As células bipolares, em conjunto com as horizontais, células amácrinas (mais de 30 subtipos diferentes) e algumas células ganglionares deslocadas, formam a camada nuclear interna (*inter nuclear layer*, INL) e dão prosseguimento à decodificação e interação das informações visuais. Entre essas duas camadas de núcleos citadas forma-se a camada plexiforme externa (*outer plexiform layer*, OPL) que concentra os processos de fotorreceptores, células bipolares e horizontais e possibilita as interações sinápticas entre elas. As células ganglionares e algumas células amácrinas deslocadas formam a camada de células ganglionares (*ganglion cell layer*, GCL). Entre a camada nuclear interna e a camada de células ganglionares se localiza a camada plexiforme interna *(inter plexiform layer*, IPL) onde se situam os processos de células bipolares, amácrinas e ganglionares. Os axônios das células

ganglionares se unem para formar a camada de axônios retinianos (*nerve fiber layer*, NFL) que posteriormente se direcionam ao nervo óptico transmitindo informações visuais para as estruturas superiores no SNC.

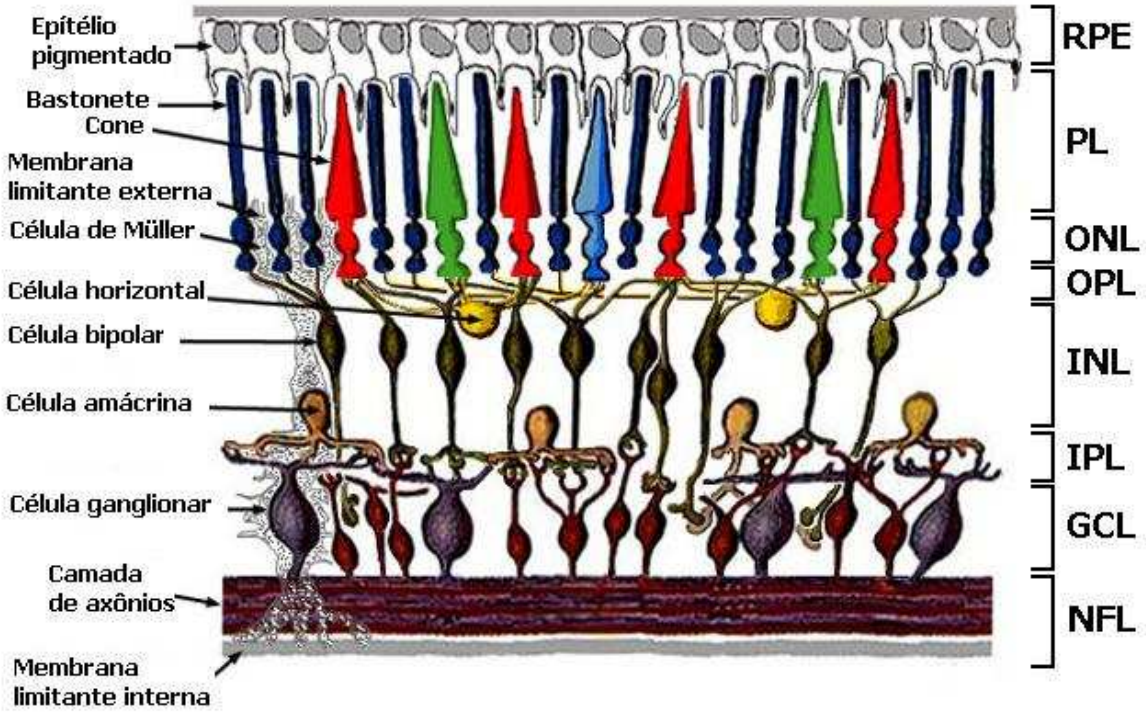

Figura 3- Esquema da retina de vertebrados com seus principais tipos celulares e camadas. RPE, epitélio pigmentado retiniano; PL, camada de fotorreceptores; ONL, camada nuclear externa; OPL, camada plexiforme externa, INL, camada nuclear interna; IPL, camada plexiforme interna; GCL, camada de células ganglionares; NFL, camada de axônios retinianos. Adaptado de: http://webvision.med.utah.edu.

As vias retinianas podem ser do tipo "*on*" ou "*off*" dependendo da resposta da célula bipolar. Existe apenas um tipo de célula bipolar de bastonete, mas existem mais de 10 tipos de células bipolares de cones, que diferem quanto ao tipo de receptor de glutamato, ionotrópico ou metabotrópico. Assim, as células bipolares da via "*on*" despolarizam quando diminui a liberação de glutamato pelos fotorreceptores (ativação pela luz), enquanto as células da via "*off*" hiperpolarizam na mesma situação. A interação das diferentes respostas promove uma resposta visual mais refinada, pois apenas algumas células específicas são ativadas pela luz enquanto outras, no centro ou na periferia, têm sua atividade diminuída. O conceito de campo receptivo concêntrico, com centro "*on*" e periferia "*off*", ou vice-versa, possibilita a

formação das imagens no sistema nervoso central com contrastes apropriados (Demb e Pugh, 2002).

Além de neurônios, dois tipos de células da macroglia podem ser encontrados na retina, astrócitos e células de Müller. Enquanto os astrócitos se localizam na GCL, as células de Müller atravessam a retina da membrana limitante interna até a membrana limitante externa, contribuindo para a manutenção estrutural da retina (Figura 3). Outra função destas células é promover o tamponamento de íons K^+ provenientes da atividade neuronal (Dreher, et al., 1994). Finalmente, estas células também são responsáveis pelo metabolismo de neuromediadores no espaço extracelular (Thoreson e Witkovsky, 1999).

A comunicação intercelular e a sua modulação são fundamentais para o processamento neuronal de um modo geral e da informação visual em particular. A despeito de hipóteses mais recentes, como a atuação de gases difusíveis no meio intercelular, como o óxido nítrico (Cudeiro e Rivadulla, 1999), a comunicação neuronal ainda é classicamente descrita como resultado da função de sinapses químicas e elétricas. Enquanto aspectos específicos das sinapses químicas na retina têm sido amplamente estudados com várias metodologias, o estudo das sinapses elétricas, no entanto, tem recebido comparativamente menos atenção.

1.4 Acoplamento celular no desenvolvimento

Estudos relataram a presença de JCs em células proliferativas durante o desenvolvimento do SNC. De fato, acredita-se que mudanças no acoplamento constituem um passo essencial para que as células precursoras saiam do ciclo celular e iniciem a diferenciação neuronal (Rozental, et al., 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário ou pós-natal (em mamíferos), a comunicação entre neurônios via JCs tem um papel importante no desenvolvimento dos circuitos neuronais. As JCs têm sido descritas em uma série de processos, incluindo a proliferação, diferenciação celular (Naus e Bani-Yaghoub, 1998) e apoptose (Lin, et al., 1998; Cusato, et al., 2003).

Outro aspecto importante envolvendo o acoplamento celular na retina em desenvolvimento é a atividade espontânea que se propaga através da retina como ondas de potencial de ação, que elevam ritmicamente os níveis de cálcio intracelular em neurônios retinianos. Estas ondas de potencial de ação são mediadas por uma

combinação de sinapses químicas e elétricas, e o circuito responsável pela geração destas se modifica durante o desenvolvimento (Roerig e Feller, 2000), o que sugere uma participação de diferentes Cxs neste processo (Kihara, et al., 2006a). Além disso, foi proposto que o ATP liberado pelo epitélio pigmentar durante o desenvolvimento passa por hemicanais de Cx43 localizados próximos a zona ventricular neuroblástica (Pearson, et al., 2005), modulando a proliferação celular.

1.5 Acoplamento celular na função visual

Na retina adulta de mamíferos, o acoplamento celular é bem difundido e muito importante na composição de diversos circuitos neurais (Vaney, 2002). Estudos com camundongos demonstraram que a Cx36 é expressa tanto no encéfalo quanto na retina, sendo que, na retina, anticorpos dirigidos contra essa Cx marcam processos de neurônios localizados tanto na camada plexiforme externa (OPL) como na camada plexiforme interna (IPL) (Dang, et al., 2004).

Neste particular, a Cx36 parece ser essencial na via de sinalização dos bastonetes, acoplando cones e bastonetes, assim como células amácrinas do tipo AII e células bipolares ligadas a bastonetes (Figura 4). Estudos com injeção de neurobiotina em animais KO para Cx36 indicaram que houve uma interrupção elétrica entre células amácrinas AII e cones de células bipolares de centro ON. Em adição, registros eletrofisiológicos em animais KO indicaram a completa eliminação de respostas das células ganglionares de centro ON mediadas pela via dos bastonetes. Esses dados indicam que as sinapses elétricas são essenciais para a propagação da sinalização visual de bastonetes na retina de mamíferos (Deans, et al.,2002). Adicionalmente, o acoplamento pode ser modulado pelos níveis de iluminação ambiente. Essa plasticidade acontece em dois níveis diferentes, na expressão das proteínas que formam as JCs ou na modulação da condutância dos canais por processos fosforilativos (Becker, et al., 1998; Kihara, et al., 2006a).

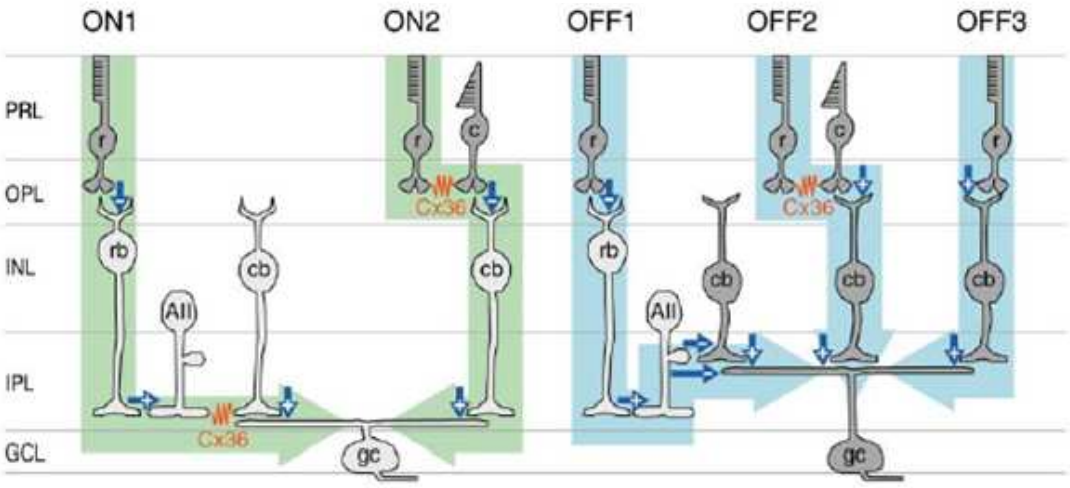

Figura 4- Vias de sinalização dos bastonetes. Em vermelho estão destacadas as posições da Cx36 tanto nas vias *"on"* como *"off"* (Demb e Pugh, 2002).

1.6 Acoplamento celular na neurodegeneração

Além de processos relacionados com o desenvolvimento e função visual, a regulação do acoplamento celular tem sido descrita em processos neurodegenerativos. No sistema nervoso, a presença de JCs é bem caracterizada entre células da glia, constituindo uma via de distribuição de metabólitos e sinalização por segundos mensageiros. A propagação de ondas de Ca^{2+} através de JCs de astrócitos em resposta à aplicação de glutamato ou estímulo mecânico foi observada tanto em cultura como em cortes de hipotálamo (Charles, 1998).

O papel do acoplamento celular em processos apoptóticos e neurodegenerativos permanece controverso. O bloqueio de JCs por agentes farmacológicos em cultura de astrócitos aumenta a vulnerabilidade neuronal ao glutamato (Ozog, et al., 2002). Em explantes de hipocampo, o bloqueio de JCs também causou o aumento do dano neuronal (Blanc, et al., 1998). "*In vivo*, o camundongo KO Cx43+/- mostra um significante aumento de área afetada em relação ao animal selvagem após oclusão da artéria cerebral média (Nakase, et al., 2003). Estes resultados sugerem que o acoplamento possui um papel neuroprotetor, apesar de alguns experimentos com bloqueadores, como octanol, indicarem o contrário (Rawanduzy, et al., 1997).

Estudos sobre a isquemia global perinatal revelaram aumento do acoplamento celular e aumento da expressão de caspase-3 em *slices* de hipocampo. Após tratar a cultura com bloqueador farmacológico de JC (carbenoxolone, CBX) antes, durante ou 60 minutos após a isquemia, ocorreu diminuição da apoptose e conseqüentemente, da morte neuronal secundária (de Pina-Benabou, et al., 2005). Estudos em modelo de epilepsia mostraram que o CBX diminui a atividade epiléptica assim como a amplitude e freqüência das ondas elétricas no eletroencefalograma (EEG). Esses resultados sugerem que a diminuição do acoplamento celular pode contribuir para a prevenção e amenização da epilepsia (Nemani e Binder, 2005; Bostanci e Bagirici, 2007).

Explantes de retinas lesadas por laser foram submetidos a tratamento com bloqueadores de JCs, resultando em aumento significativo da morte celular secundária. Comparando a incidência de células em apoptose marcadas por TUNEL entre animais selvagens e KO para, foi observado aumento significativo de células TUNEL-positivas nas retinas de ratos KO. Assim, esse estudo concluiu que a Cx36 contribui com a sobrevivência celular frente a injúrias na retina (Striedinger, et al., 2005).

7 Justificativa para o estudo

As JCs têm sido relacionadas com processos importantes durante o desenvolvimento, adaptação e degeneração de neurônios. Contudo, é necessária uma caracterização mais detalhada do acoplamento celular no sistema nervoso.

O estudo das proteínas que formam as JCs na retina de pintos, um excelente modelo experimental para o estudo do sistema nervoso, poderá contribuir com novas informações sobre a expressão espaço-temporal de cada Cx nos diferentes processos.

Essa ave é adaptada para a visão diurna apresentando similaridades com a visão humana que também é fotóptica, tornando assim este estudo de grande valia na comparação entre aves e mamíferos. Além disso, o tamanho avantajado do olho desses animais e sua acessibilidade facilitam o estudo processos neurodegenerativos e mecanismos compensatórios de reparo.

O modelo de lesão desenhado para este estudo se destaca por permitir a visualização e comparação da imunorreatividade no foco da lesão, penumbra, áreas

adjacentes e regiões controles em uma única lâmina. Este modelo pode ser útil no estudo de lesões, mimetizando uma situação de trauma mecânico localizado. Explantes de retina possibilitam também a manipulação do acoplamento com fármacos que possam modular os danos causados pela lesão, aumentando a quantidade de informações que possam auxiliar no desenvolvimento de terapias celulares.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Pintos são modelos animais muito utilizados para o estudo do desenvolvimento embrionário porque têm seu desenvolvimento dentro do ovo. Além disso, apresentam um sistema visual muito desenvolvido, com estruturas grandes e fáceis de identificar. Outra característica que nos leva a utilizar este modelo animal é o fato de sua visão ser adaptada a luz do dia (fotóptica), semelhante à visão humana.

Visto que a expressão funcional de Cxs na retina de aves ainda não é totalmente conhecida e que temos interesse em compreender as conseqüências de lesões neuronais e espalhamento de morte celular secundária, com o possível envolvimento das JCs, nossos objetivos são: 1) caracterizar a expressão ontogenética de Cxs na retina de pintos (*Gallus gallus*); 2) determinar a modulação da expressão de Cxs na adaptação visual; 3) avaliar o papel do acoplamento celular provido pelas JCs na neurodegeneração retiniana. Como a caracterização da expressão protéica de Cxs ficaria limitada aos poucos anticorpos que reconhecem os epítopos em pintos, este projeto conta com o apoio da Dr. Jean Jiang (University of Texas) que cedeu anticorpos especialmente gerados contra Cxs de pintos (Jiang, et al., 1995).

2.2 Específicos

1. Analisar a expressão de Cx36, Cx43, Cx45, Cx50 e Cx56 na retina de pintos (*Gallus gallus*) durante o desenvolvimento embrionário e adulto.
2. Descrever as alterações da expressão de Cx36 na retina de pintos em condição de adaptação ao escuro.
3. Analisar a expressão de Cx36 e Cx43 na retina de pintos submetidos à lesão mecânica.
4. Analisar a viabilidade celular após tratamento com bloqueadores e abridores farmacológicos de JCs em explantes de retina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos diversas metodologias para determinar a expressão de Cxs durante o desenvolvimento, adaptação e degeneração por trauma mecânico na retina de pintos. Os ovos e os pintos (*Gallus gallus*) foram obtidos de uma granja da região de Mogi das Cruzes. Os ovos foram mantidos em incubadora a 36 ℃ enquanto que os pintos foram mantidos em gaiolas em biotério. A sala do biotério possui condições de umidade e temperatura (32 ℃) controladas, com água e comida *ad libitum*, além de período de claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as regras da Comição de ética em experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas que aprovou este trabalho.

3.1 Experimentos de desenvolvimento embrionário

No estudo do desenvolvimento embrionário da retina utilizamos ovos fertilizados de pintos, com embriões de 4,5 dias (E4,5) até 15 dias após o nascimento. Foram selecionadas 5 idades embrionárias (E4,5, E7, E12, E15, E18) e uma pós-natal (P15) acompanhando assim os eventos relacionados ao desenvolvimento como, por exemplo, a diferenciação de tipos celulares específicos descritos na literatura. Os animais foram decapitados para diferentes metodologias com overdose de xilazina (2 mg/100 g, i.m., West Haven, CT, USA) e ketamina (30 mg/100 g do peso, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, MI, USA) de acordo com as regras da Comição de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Experimentos de adaptação ao escuro

Utilizamos pintos com aproximadamente 15 dias de vida. Os animais foram divididos em três grupos com n=3. O grupo controle foi mantido no ciclo claro/escuro normal (12/12h) e os grupos de 3 e 24 horas de adaptação ao escuro foram mantidos em uma capela isolada de luz. Essa capela foi privada de qualquer iluminação ambiente, mas possuía condições de umidade e temperatura controladas. Depois do período de adaptação, estes animais foram sacrificados para

diferentes metodologias com overdose de xilazina e ketamina, conforme as regras da Comição de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.3 Experimentos de neurodegeneração por lesão mecânica

Utilizamos pintos com 10-20 dias de vida. Após a aplicação de anestésico e relaxante muscular (ketamina e xilazina, 1:1), seis lesões foram feitas nos olhos dos animais por meio de uma agulha de insulina. Durante este procedimento, a agulha atravessou a córnea, humor vítreo, retina, epitélio pigmentado e esclera. Os animais foram sacrificados nos intervalos de 2 e 6 horas e 1, 3 e 7 dias pós-lesão. Para isso, injetamos overdose de ketamina e xilazina, conforme as regras da Comição de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e seus olhos foram retirados. As retinas foram dissecadas para diferentes metodologias.

3.4 Quantificação da expressão gênica de Cxs por PCR em tempo real

A extração do RNA total das retinas foi realizada pelo método do TRIzol®, no qual, retinas dos diferentes modelos de estudo foram diretamente homogenizadas em 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo as instruções do fabricante. A seguir, efetuamos o protocolo padrão de transcrição reversa, utilizando a enzima SuperScript III. Extraímos o RNAm com clorofórmio, e o precipitamos com isoproteranol. O pelete formado foi lavado 2 vezes com álcool 70 %. O RNAm foi ressuspendido em água DEPEC e a concentração da amostra foi obtida através da medida do comprimento de luz a 260 nm em espectrofotômetro. O DNA residual foi removido pela adição de DNAse I conforme protocolo do fabricante. Para cada 20 μl da reação de transcrição reversa, 4 μg do RNA total foi misturado com 1 μl de oligo-dT (0.5 μg; Invitrogen), a mistura foi incubada por 10 minutos à 65 ℃. Posteriormente, foram acrescentados nucleotídeos e enzimas para a formação de DNAc, entre eles, 1 μl da enzima transcriptase reversa SuperScript III (200 U; Invitrogen) e as amostras foram incubadas por 60 minutos à 50 ℃. A reação foi inativada por 15 minutos na temperatura de 70 ℃.

Para os estudos de quantificação de expressão gênica realizamos experimentos utilizando o PCR em tempo real (Applied Biosystems-GeneAmp 5700). Neste sistema, a amplificação da seqüência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluoróforo, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de *primers*. A quantificação da amplificação é feita de acordo com a fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho (Figura 5). Pelas características do sistema, no PCR em tempo real é possível determinar todo perfil de amplificação, o que representa uma de suas vantagens metodológicas (Schmittgen, et al., 2000; Kihara, et al., 2005).

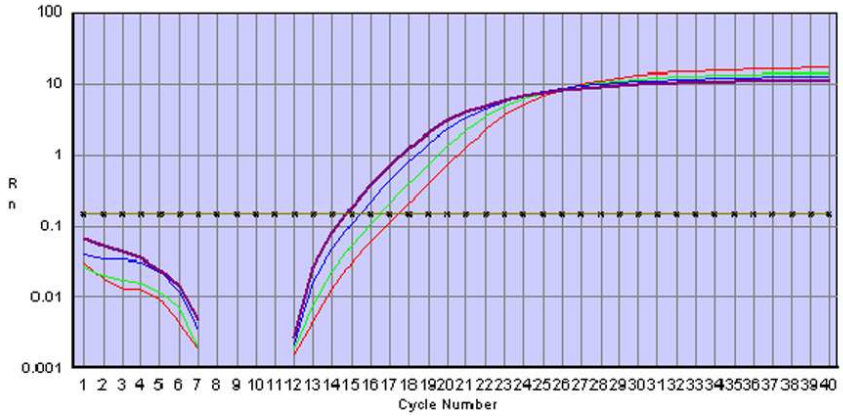

Figura 5- Experimento com diferentes quantidades de cDNA (5, 10, 20 e 40 ng) utilizando *primers* para Cx43. As curvas representam a fluorescência detectada pelo sistema (ordenada) em função do número de ciclos (abcissa). Quanto menor a quantidade inicial de cDNA maior o número de ciclos necessários para se atingir o mesmo nível de fluorescência normalizada, ou seja, o mesmo número de cópias do fragmento amplificado (*amplicon*).

O PCR em tempo real pode ser realizado por meio dos sistemas TaqMan ou SYBR Green. No sistema SYBR Green o fluoróforo se encontra no tampão do PCR e se intercala na dupla fita em cada fase de anelamento liberando a fluorescência que é proporcional ao número de cópias. Neste sistema, a validação do resultado passa por um processo chamado de curva de dissociação: o produto do PCR é aquecido de 60 ℃ até 90 ℃, o que leva à separação da dupla fita, com conseqüente diminuição da fluorescência. Com a curva de dissociação, é possível determinar a especificidade da amplificação (Figura 6).

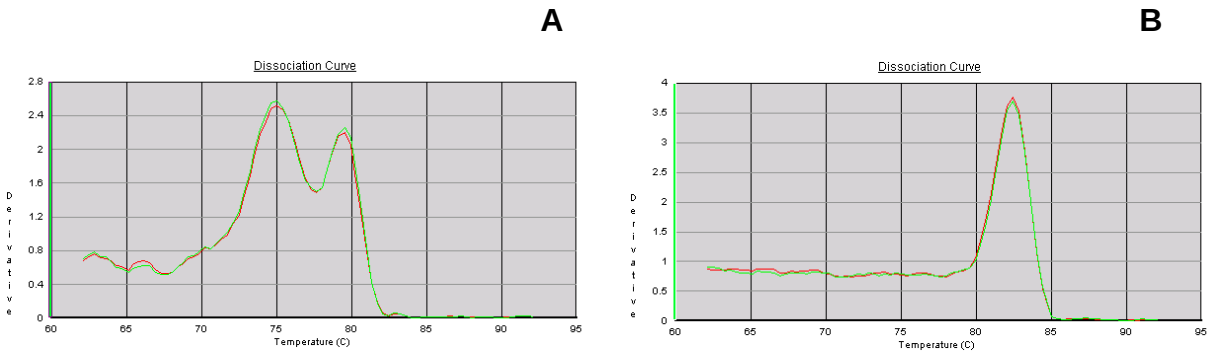

Figura 6- Curva de dissociação com (A) e sem (B) produtos inespecíficos. A ordenada corresponde à derivada da fluorescência detectada e a abscissa à temperatura. (A) Os picos em 2 temperaturas indicam que pelo menos 2 produtos foram gerados na amplificação do PCR. (B) O pico único indica a produção de apenas um produto, que coincide com o *Tm* teórico do *amplicon* esperado.

Os *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real foram desenhados por nosso grupo no início da pesquisa e estão descritos na Tabela 1 dos resultados. Como controle interno destes experimentos, analisamos o gene constitutivo GAPDH (gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase).

3.5 Quantificação dos níveis protéicos de Cxs por *western blot*

Retinas de pintos com diferentes idades, diferentes tempos de adaptação ao escuro ou diferentes tempos pós-lesão, foram homogeneizadas em solução Tris-HCL 25 mM contendo inibidores de protease (Calbiochem, La Jolla, CA). Após dosagem pelo método de Bradford, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida. As proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas para membrana. Estas foram coradas pelo método de *Ponceau* (0,1%) para verificação da transferência. Após lavagens em TTBS (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, *Tween* 20 0,1%), as membranas foram bloqueadas em uma solução de albumina 3% em PBS (Na_2HPO_4 0,08 M, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 50 mM e 0,1% de *Tween* 20). Depois, foram incubadas com anticorpo primário contra Cx36, Cx43, Cx45 e Cx45.6 por 12-14 horas (à 4°C) em PBS contendo leite 5%. Após lavagens em TTBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário marcado com peroxidase em TTBS contendo leite 5%, por 2 horas à temperatura ambiente. A revelação foi realizada em câmara escura utilizando o *kit* ECL (1:1, Amersham) e filme fotográfico. Utilizamos β-Actina, proteína constitutiva, como controle interno de cada grupo de

amostra. A densidade óptica das bandas foi quantificada pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MD). Densidades ópticas de bandas de três experimentos independentes foram normalizadas pelo valor do respectivo controle.

3.6 Caracterização da distribuição de Cxs por imuno-histoquímica

Os animais foram anestesiados e perfundidos com solução salina (0,9%) e paraformaldeído (PFA) 4%. Os olhos foram pós-fixados em PFA 1-4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB) por 30-60 minutos e crioprotegidos em sacarose 30% em PB por 30-60 minutos. Secções transversais (12 μm) da retina foram obtidas em criostato à -27 ℃, e coletadas diretamente em lâminas de vidro previamente gelatinizadas.

Para determinar se a expressão de Cxs co-localiza com células da glia e/ou subgrupos específicos de neurônios, alguns estudos de dupla marcação também foram realizados. Anticorpos contra GFAP (marcador para astrócitos e células de Müller), calbindina (proteína ligante de cálcio) e CHAT (acetilcolinesterase), foram utilizados em ensaios de imuno-fluorescência para a análise em microscópio confocal. Os anticorpos primários dirigidos contra Cxs, GFAP, CHAT e calbindina foram diluídos em 0,3% Triton X-100 em PB e a incubação foi feita por 12-24 horas em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpos secundários conjugados com Alexa488, tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC, Jackson Labs) ou Cy5 contra as IgG das espécies onde os anticorpos primários foram produzidos, diluídos 1:100 - 1:200 em PB com Triton X-100 por 1-2 horas em temperatura ambiente.

Controles para especificidade de marcação incluíram: omissão dos anticorpos primários; pré-adsorção com o peptídeo imunogênico usado para a produção do anticorpo. A marcação foi considerada específica se abolida nessas condições. Em nosso laboratório alguns dos anticorpos contra Cxs foram testados anteriormente em retinas de camundongo KO (Kihara, et al., 2006a).

3.7 Caracterização morfológica da retina em diferentes tempos pós-lesão

Como mencionado anteriormente, a retina madura é organizada em camadas formadas alternadamente de corpos celulares (camadas nucleares) e processos (camadas plexiformes). Entre as três camadas de corpos celulares situam-se duas camadas formadas majoritariamente por processos (Figura 3). Avaliamos as alterações histológicas destas camadas depois de diferentes intervalos pós-lesão, por meio de marcadores nucleares com afinidade por ácidos nucléicos, como o iodeto de propídio (PI). Utilizamos também marcadores gliais, como GFAP (proteína fibrilar glial) e vimentina, para caracterizar a gliose reativa decorrente da lesão comparando o foco, penumbra e áreas adjacentes a lesão.

3.8 Caracterização de degeneração por Fluoro-Jade B

Experimentos histoquímicos utilizando Fluoro-Jade B, modelo de fluorocromo que detecta degeneração neuronal, foram realizados para identificar e quantificar células em degeneração no modelo de lesão mecânica. Após a coleta dos cortes fixados no PFA 4% em lâminas gelatinizadas, foram realizadas incubações em série: etanol 100% durante 3 min; etanol 70% por 1 min; permanganato de potássio 0,06% por 15 min; lavagem em H_20 de 1 min; solução de Fluoro-Jade B 0,001% mais ácido acético 0,1% por 30 min; lavagem em H_20 3x de 1 min; secagem em temperatura ambiente; xilol 3x de 2 min. Após o término das incubações, as lâminas foram montadas utilizando meio de montagem DPX (*Electron Microscopy Sciences, Inc*.). Seqüencialmente o material foi analisado em microscópio de fluorescência.

3.9 Caracterização de apoptose por TUNEL

A reação de TUNEL (do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick end labeling*) é amplamente utilizada como um método de identificação e, em alguns casos, de quantificação de células apoptóticas. Nesse ensaio, a incorporação específica de indicadores nos terminais de nucleotídeos do DNA fragmentado proporciona a identificação de células que apresentam tal fenótipo.

Lâminas fixadas em PFA 4% foram lavadas 2 vezes de 10 minutos em PB 0,05 M (pH 7,4) no agitador orbital Kline, então foram incubadas em uma solução permeabilizante contendo 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio em PB 0,05 M por dois minutos no gelo. As lâminas foram lavadas 2 vezes de 5 minutos em PB 0,1 M e incubadas por 60 minutos a 37ºC com uma mistura do kit para TUNEL (*Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany*) contendo a enzima transferase (TdT) e os nucleotídeos marcados com fluoresceína na proporção de 1:5. Em seguida, o material foi lavado 2 vezes de 5 minutos em PB 0,1 M. As lâminas reagidas foram cobertas com meio de montagem (glicerol) e lamínulas seguido de uma fina camada de esmalte nas bordas para fixar. Finalmente, o material foi analisado em microscópio de fluorescência equipado com filtro para fluoresceína.

3.10 Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Lactato desidrogenase (LDH) é a enzima que catalisa a conversão de lactato em piruvato na presença de NAD reduzindo-o a NADH. Este ensaio enzimático é normalmente associado a estudos de lesões em músculo estriado cardíaco ou esquelético. No tecido nervoso, a quantificação de LDH liberado em meio de cultura é utilizada como indicador de viabilidade celular (Keilhoff e Wolf, 1993).

Explantes de retina controle e com 1 dia de lesão foram incubados em meio de cultura (BME) contendo soro fetal bovino 5% e glutamina 1% por quatro horas em temperatura ambiente. Esse meio de cultura foi coletado para quantificação colorimétrica do LDH liberado em função da estabilidade da membrana celular. Para isso, utilizamos um *kit* de lactato desidrogenase (Labtest) cujo substrato (INT) interage com o NADH produzindo “formazans” de cor vermelha. Os resultados foram obtidos através da medida da absorbância de luz com 500 nm em espectrofotômetro.

Realizamos esse mesmo ensaio enzimático com explantes de retinas lesadas que receberam tratamento com bloqueadores e abridores de JCs, sempre em comparação com retinas lesadas controles incubadas em PBS (solução salina tamponada). Os bloqueadores utilizados foram a quinina (bloqueador específico de Cx36 e 50) na concentração de 100 µM e o carbenoxolone (CBX), também na concentração de 100 µM. Além disso, combinamos os dois bloqueadores na

tentativa de otimizar o efeito protetor. O abridor de JCs utilizado foi a trimetilamina (TMA) com a mesma concentração dos bloqueadores (100 μM). Foram feitas coletas do meio de cultura após 1, 2 e 4 horas para avaliar o gradiente de ação temporal de cada fármaco.

3.11 Análise dos resultados

Dados provenientes de análises quantitativas (por exemplo, PCR em tempo real e *western blot*) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, com valor de significância igual a 5%. Análises qualitativas (imuno-histoquímica, descrições morfológicas) foram efetuadas em teste cego, com examinadores isentos. Além disso, resultados foram considerados confiáveis apenas quando reprodutíveis em pelo menos três experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Desenhos de *primers* específicos para experimentos de PCR

No começo deste trabalho iniciamos o estudo dos genes que codificam as Cxs no genoma de pintos (Tabela 1). Neste período, por meio de programas e análises computacionais, determinamos *primers* específicos para diversas Cxs que foram utilizados em nossos estudos.

Tabela 1- Primers específicos desenhados para Cxs em pintos.

Gene (Código GenBank)	Primers	Amplicon (Tm)
Cx36	Up: 5'-TTGGTGTTCATGTTTGCTGTCA-3' 59 ℃	72 bp
(AF458098)	Down: 5'-CCAGCCCAAGTGGTTCAGTT-3' 59 ℃	(79 ℃)
Cx43	Up: 5'-CTGAGTGCCATCTACACCTGTGA-3' 59 ℃	70 bp
(M29003)	Down: 5'-TTGGACGGGACAGGAAACA-3' 58 ℃	(84 ℃)
Cx45	Up: 5'-CCCGATCAGATGCAATACACA-3' 58 ℃	72 bp
(NM205503)	Down: 5'-GGCGATGTTGGCTTTGTTCT-3' 59 ℃	(81 ℃)
Cx45.6	Up: 5'-CCGGCTCTGGGTCCTACAG -3' 59 ℃	68 bp
(L24799)	Up: 5'-GCACCGCATGCCCAAA-3' 60 ℃	(82 ℃)
Cx56	Up: 5'-CTGTTGCTCCACCAGTTCCA-3' 58 ℃	82 bp
(L02838)	Up: 5'- GGCGTTGGGATGGTGACA-3' 60 ℃	(85 ℃)

Durante a fase de preparação e padronização dos experimentos, avaliamos também a expressão gênica, por PCR em tempo real, de Cx36, Cx45 e Cx57, além de sinaptofisina e sinapsina na retina de camundongos Rd, animais transgênicos que perdem a camada de fotorreceptores durante o desenvolvimento da retina. Esses experimentos permitiram a avaliação da modulação sináptica nestes animais em relação aos animais selvagens. Embora sejam de outro modelo experimental, esses resultados contribuíram para o entendimento da plasticidade de Cxs na retina e geraram o artigo "*Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina*" de autoria de Kihara, Santos, Paschon, Matos, Britto (2007) (Anexo A).

4.2 Expressão gênica de Cx36 e Cx56 na retina

Nosso grupo foi o primeiro a detectar a expressão da Cx36 (Figura 7) no sistema nervoso de pintos (*Gallus gallus*), animal cujo desenvolvimento filogenético resultou em uma retina que essencialmente não possui bastonetes (Martins e Pearson, 2008; Prada, et al., 1991). Além disso, foi possível detectar a Cx56 no cristalino de pintos (Jiang, et al., 1995), mas não na retina.

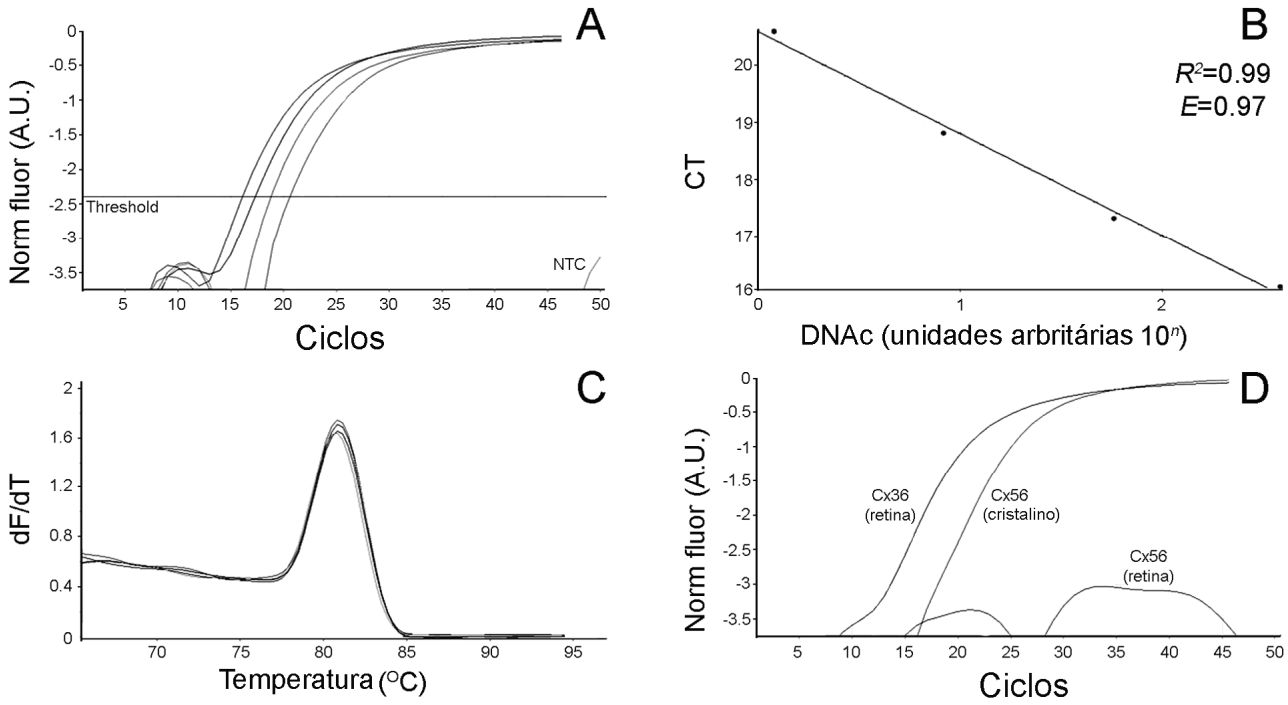

Figura 7- Detecção da expressão gênica de Cx36 na retina. (A) Detecção de RNAm de Cx36 a partir de concentrações diferentes de cDNA.. (B) Regressão linear a partir dos dados obtidos em (A). (C) Curva de dissociação do experimento mostrado em (A). O pico único sugere a especificidade dos primers utilizados. (D) Amplificação do RNAm de Cx36 e não detecção de Cx56 na retina de pintos.

4.3 Expressão gênica de Cxs no desenvolvimento

Utilizando *primers* específicos desenhados para Cxs de pintos, determinamos que esses genes (Cx43, Cx45 e Cx50) possuem padrões de expressão distintos durante a histogênese da retina. Para comparar os níveis relativos de expressão entre as diferentes Cxs, dividimos o eixo CT (ciclos) em quatro partes: 15-20 (muito alto), 20-25 (alto), 25-30 (intermediário) e 30-50 (pobre). Tendo em vista que quanto menor a quantidade de ciclos maior é a expressão do RNAm, observamos que as Cxs estudadas possuem diferentes níveis de expressão na retina de pintos adultos: muito alto (Cx36), alto (Cx45), e intermediário (Cx43 e Cx50). Como mencionado anteriormente, a expressão gênica da Cx56 não foi detectada na retina de pintos, mesmo após 50 ciclos no PCR em tempo real (Figura 8).

Nossos resultados indicaram que a expressão gênica da Cx36 sofreu regulação durante o desenvolvimento. Em comparação com a retina adulta (P15), foram encontrados baixos níveis de RNAm desta Cx em E5 (7%, P<0.01) e E8 (18%, P<0.01). Além disso, observamos um pico transiente da expressão gênica da Cx36 em E15 (259%, P<0.01) (Figura 8B).

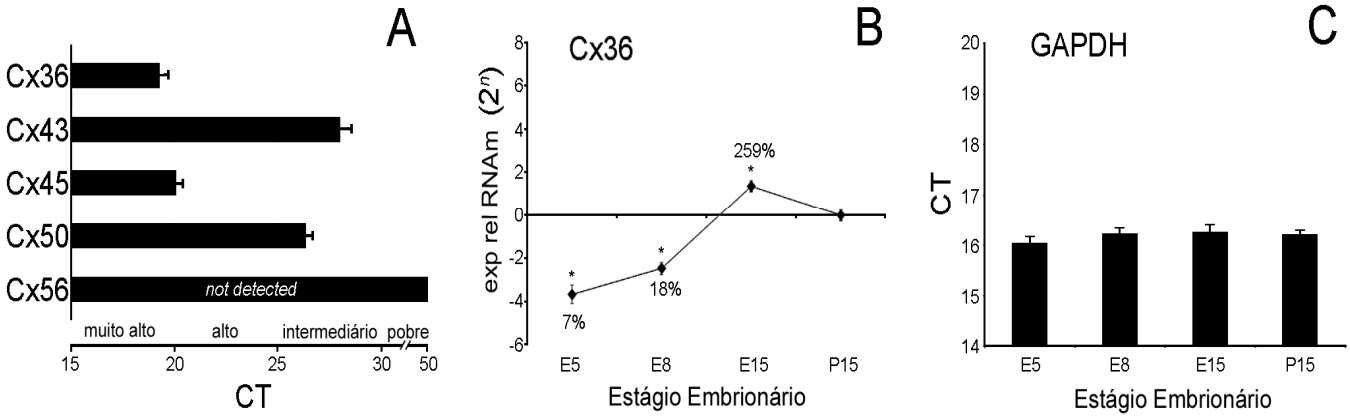

Figura 8- **Expressão gênica de Cxs durante a histogênese da retina.** (A) Comparação dos níveis de expressão da Cx36, Cx43, Cx45, e Cx50 pela quantidade de ciclos (CT). (B) Cx36; (C) A expressão do gene GAPDH foi usada como controle interno. Amostras de retinas de embriões de pintos (E4.5, E7, E15) foram normalizadas com base nos níveis de expressão gênica do adulto (P15). A expressão gênica da Cx36 era virtualmente ausente nas idades iniciais do desenvolvimento embrionário e apresentou um pico em 15 dias até atingir o padrão do adulto. As barras estão representando o erro padrão das amostras. *P<0.05 vs. P15.

Em outros experimentos com Cxs observamos que o gene da Cx43 estava altamente expresso nas retinas de E4.5 (67-fold, P<0.01) e E7 (64-fold, P<0.01) quando comparados ao adulto P15 (Figura 9A). Por outro lado, a expressão gênica da Cx45 mostrou-se elevada e constante durante todo o desenvolvimento (Figura 9B). Finalmente, a Cx50 é pouco expressa no início do desenvolvimento E4.5 (23%, P<0.01) e E7 (35%, P<0.01) quando comparado ao P15 (Figura 9C). Nesse experimento, a expressão gênica do GAPDH foi utilizada como controle interno (Figura 9D).

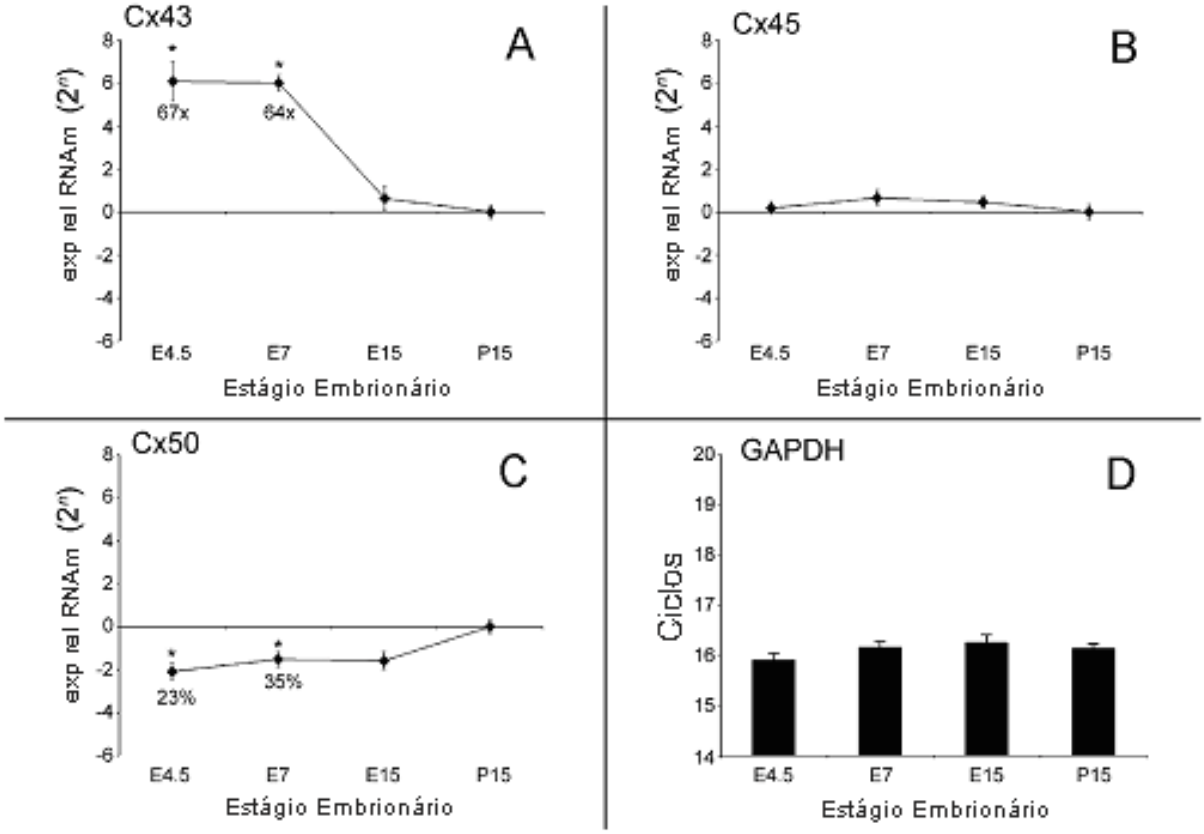

Figura 9- **Expressão gênica de Cxs durante a histogênese da retina.** (A) Cx43; (B) Cx45; (C) Cx50. (D) A expressão do gene GAPDH foi utilizada como controle interno. Amostras de retinas de embriões de pintos (E4.5, E7, E15) foram normalizadas com base nos níveis de expressão gênica do adulto (P15). Enquanto a expressão gênica da Cx45 não variou durante o desenvolvimento, a Cx43 foi altamente expressa no início do desenvolvimento, em E4.5 (67-fold) e E7 (64-fold) quando comparada ao P15 e a Cx50 estava pouco expressa no desenvolvimento inicial E4.5 e E7 (23% e 35%, respectivamente) e aumentou muito no adulto. As barras estão representando o erro padrão das amostras. *P<0.05 vs. P15.

4.4 Quantificação dos níveis protéicos de Cxs no desenvolvimento

Western blots foram realizados para caracterizar os níveis protéicos das Cxs estudadas durante a histogênese da retina de pintos. Análises de densitometria óptica das bandas de três experimentos diferentes revelaram que a Cx36 (Figura 10A) estava virtualmente ausente nas retinas em E5 (9%, P<0.01) e expressa em baixos níveis em E8 (24%, P<0.01) quando normalizados com os valores obtidos para o adulto (P15). Em E15 observamos níveis protéicos próximos aos encontrados para o adulto. Beta-actina foi utilizado como controle interno nesses experimentos (Figura 10B).

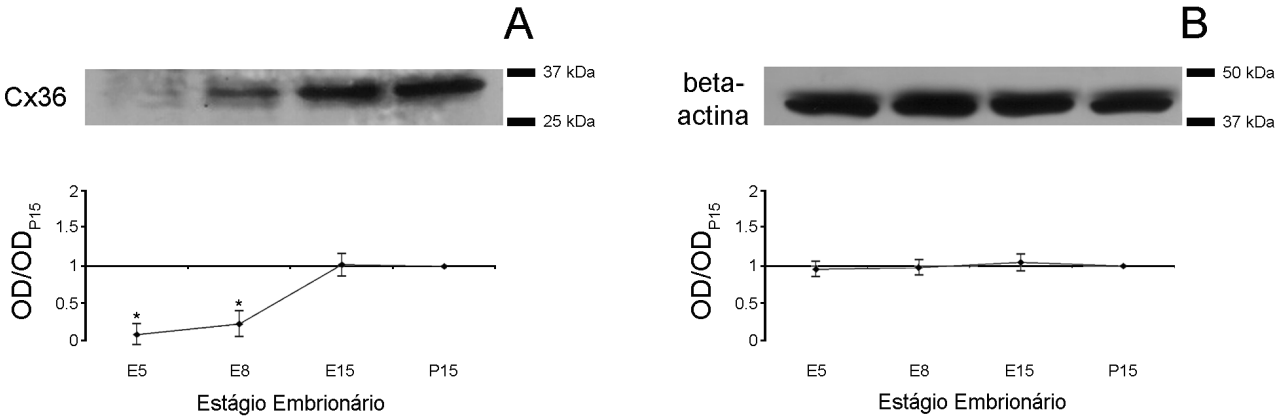

Figura 10- Análise semi-quantitativa dos níveis protéicos de Cx36 durante a histogênese da retina de pintos. (A) anti-Cx36 feito em coelho; (B) Beta-actina foi utilizado como controle interno dos experimentos. Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica (OD) das bandas que foram normalizadas com os valores encontrados nos adultos de cada experimento. (G). As barras representam o erro padrão. *P<0.05 vs. P15.

A Cx43 possui altos níveis protéicos em E5 (255%, P<0.01) quando comparados ao P15, sem diferenças significativas nas outras idades embrionárias (Figura 11B). Durante parte do desenvolvimento e no adulto ocorreram alterações no estado de fosforilação. A partir de E7 observamos o aparecimento de bandas duplas indicando mudança no padrão de fosforilação (Figura 11A). Utilizando um anti-Cx43 feito em camundongo, anticorpo monoclonal que reconhece somente uma forma específica desfosforilada da Cx43 (Li, et al., 1998), observamos que os níveis protéicos desta forma específica em retinas de embriões E4.5 (35%, P<0.01), E7 (25%, P<0.01) e E15 (29%, P<0.01) são muito baixos em comparação com a retina madura (Figura 11C).

A quantificação das bandas da Cx45 indicou que os níveis desta proteína não variaram nas idades estudadas, embora tenhamos observado bandas simples em E4.5-E15, e banda dupla em P15 (Figura 11D). Finalmente, a Cx50 mostrou-se virtualmente ausente nas retinas de embriões E4,5 (4%, $P<0.01$) e E7 (9%, $P<0.01$), e com baixos níveis protéicos em E15 (29%, $P<0.01$) quando comparadas a retina madura (Figura 11E). Na retina madura observamos diversas bandas, indicando que esta Cx também pode ser detectada em diferentes estados fosforilativos.

Tantos os experimentos de expressão gênica, como de quantificação de proteína das Cx43, Cx45 e Cx50 durante a histogênese da retina de pintos foram publicados no artigo "*Differential expression of connexins during histogenesis of the chick retina*" de autoria de Kihara, Paschon, Akamine, Saito, Leonelli, Jiang, Hamassaki, Britto (2008) (ANEXO B).

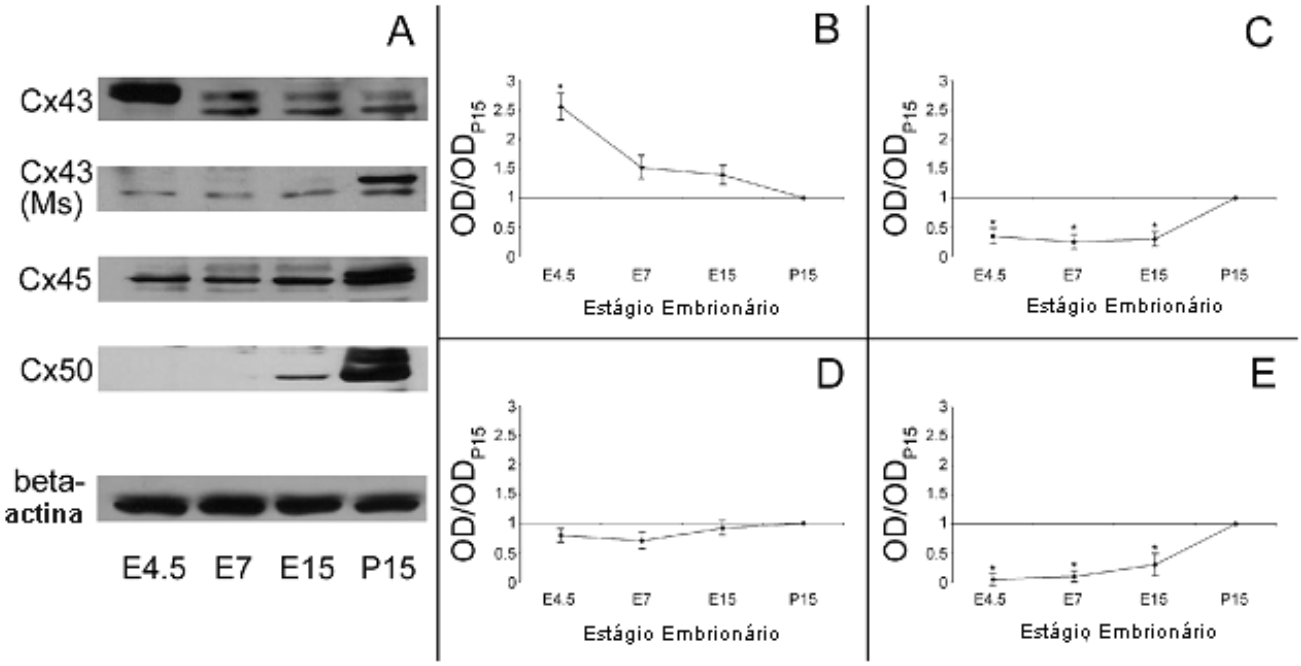

Figura 11- Análise semi-quantitativa dos níveis protéicos de Cxs durante a histogênese da retina. (A) Western blots de níveis protéicos de Cxs utilizando diferentes anticorpos; (B) anti-Cx43 feito em coelho; (C) anti-Cx43 feito em camundongo; (D) anti-Cx45 feito em coelho; (E) anti-Cx50 feito em coelho. Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica (OD) das bandas que foram normalizadas com os valores encontrados nos adultos. Beta-actina foi utilizado como controle interno dos experimentos (E). As barras representam o erro padrão. *$P<0.05$ vs. P15.

4.5 Caracterização da distribuição de Cx36 na camada plexiforme externa

Tendo em vista que a Cx36 é largamente descrita na via de sinalização de fotorreceptores como participante da sinalização visual em mamíferos (Tsukamoto, et al., 2001) e por ser mais expressa na retina adulta do que em desenvolvimento, decidimos analisar a modulação deste gene durante a adaptação ao escuro. Para isso, foi necessário identificarmos os tipos celulares que expressam essa proteína, principalmente na ONL. Realizamos experimentos de dupla-marcação utilizando Cx36 e anti-calbindina-D (CB), marcador que possibilitou a visualização de cones, padrão descrito também em estudos anteriores (Fischer, et al., 2007). Como mostrado na figura 12, projeções de planos ortogonais no eixo Z revelaram co-localização de Cx36 e CB, indicando que essa proteína é expressa por cones na retina de pintos. Observamos a marcação da Cx36 especificamente dentro e entre terminais sinápticos de cones.

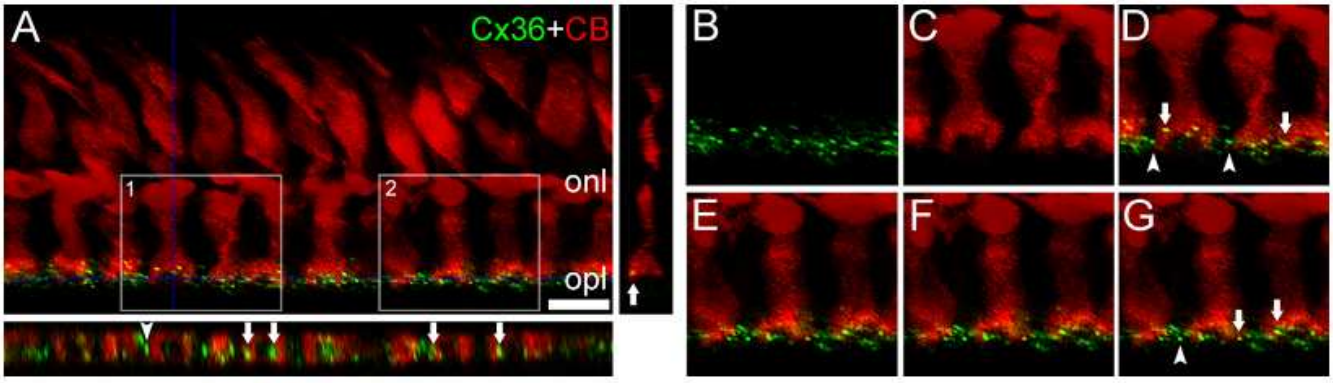

Figura 12- Co-localização de Conexina 36 (Cx36, verde) e calbindina-D (CB, vermelho) na camada plexiforme externa (OPL) da retina. (A) Marcação da Cx36 na OPL. Nesta camada, anticorpos dirigidos contra CB marcam cones e seus terminais sinápticos. A superposição dos canais verde e vermelho em microscópio confocal indicou a presença de Cx36 em células CB-positivas. Projeções de planos ortogonais no eixo Z revelaram colocalização de Cx36 e CB. Duas áreas foram selecionadas para uma análise mais detalhada. Nas áreas 1(B–D) e 2(E–G), podemos observar a relação espacial entre a Cx36 e os terminais sinápticos marcados por CB. A marcação puntiforme característica de Cx36 pode ser vista dentro (setas) e entre (cabeças de setas) terminais sinápticos de cones. Barra de escala: 15 µm.

4.6 Alterações da expressão gênica de Cx36 na adaptação ao escuro

Após descrever a expressão da Cx36 em fotorreceptores na ONL da retina de pintos e sabendo que ela também é expressa por outros tipos celulares como as células amácrinas, realizamos experimentos de adaptação ao escuro para avaliar a modulação da expressão deste gene. Como mostrado na figura 13, experimentos de PCR em tempo real foram realizados para determinar a regulação dos níveis de expressão desta Cx após a adaptação ao escuro. Após 3 horas de adaptação ao escuro, observamos uma tendência no aumento da expressão quando comparado ao controle (43%). Depois de 24 horas de adaptação ao escuro, a expressão gênica da Cx36 foi regulada positivamente de forma significativa quando comparada ao controle (115%, P<0.05).

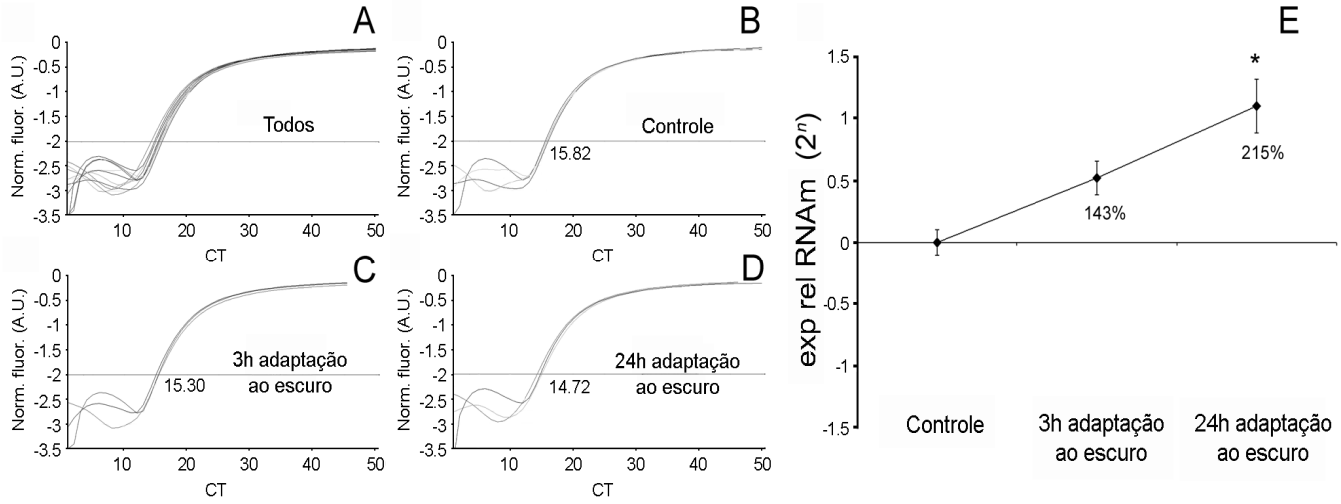

Figura 13- Expressão gênica de Cx36 após adaptação ao escuro. Analisamos os efeitos da adaptação ao escuro sobre a expressão gênica de Cx36, usando PCR em tempo real. (A) Todas as plotagens amplificadas foram mostradas separadamente (B, C, D) de acordo com a condição experimental (controle, 3 horas, e 24 horas de adaptação ao escuro, respectivamente). (E) As condições experimentais foram normalizadas baseadas no nível de expressão da condição controle, e foram apresentadas no eixo y conforme a expressão gênica (2^n). As barras representam o erro padrão da média. *P<0.05 vs. Controle.

4.7 Alterações da distribuição de Cx36 na adaptação ao escuro

Uma vez determinado que a adaptação ao escuro regula a expressão gênica de Cx36 na retina, investigamos como a distribuição da proteína é afetada. Como um resultado geral, observamos um aumento da imunorreatividade desta Cx em toda a retina. Como podemos observar na figura 14. A marcação da Cx36 foi mais intensa após 24 horas de adaptação ao escuro, principalmente na camada plexiforme externa.

Analises pixel/pixel revelaram diferenças importantes na distribuição da Cx36 após adaptação ao escuro, como evidenciado por alterações na proporção entre a marcação encontrada nas camadas plexiformes externa e interna. Por outro lado, a adaptação ao escuro não causou mudanças detectáveis na relação da marcação da sublâmina “*off*” sobre a marcação da sublâmina "*on”* da camada plexiforme interna (IPL).

Os resultados descrevendo alterações da Cx36 na retina de pintos submetidos ao escuro, somados aos experimentos mostrados anteriormente sobre a expressão gênica e protéica da Cx36 no desenvolvimento da retina foram publicados no artigo “*Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in an essentially rodless retina*” de autoria de Kihara, Paschon, Cardoso, Higa, Castro, Hamassaki, Britto (2009) (ANEXO C).

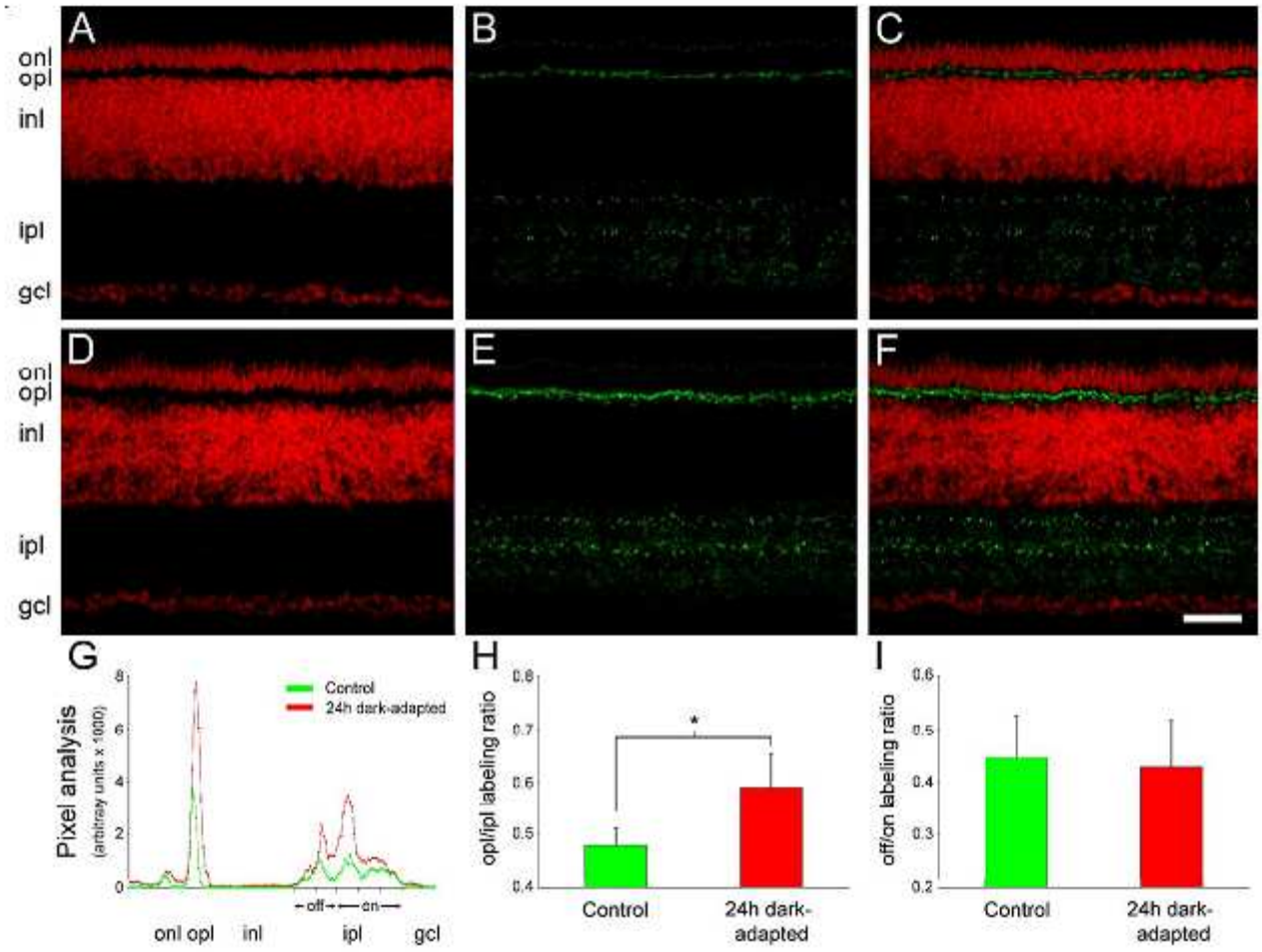

Figura 14- Mudanças na distribuição espacial de Cx36 após adaptação ao escuro. Comparando aos controles (A, B, C), observamos um aumento da imunorreatividade da Cx36 em retinas adaptadas ao escuro (D, E, F). A marcação da Cx36 foi mais intensa após 24 horas de adaptação ao escuro, principalmente na camada plexiforme externa. (G) Análises pixel/pixel das imagens mostradas em B (verde) e E (vermelho). (H) A quantificação (n=3) da distribuição da Cx36 na camada plexiforme externa e interna indicou alterações quando a condição controle (verde) foi comparada à condição experimental (vermelho). (I) Quantificação (n=3) da distribuição de Cx36 nas sublâminas OFF e ON, no controle (verde) e no adaptado ao escuro (vermelho). Não houve mudanças significativas na distribuição desta Cx quando analisamos a relação sublâmina OFF/ON. *P<0.05. Camada nuclear externa (onl), camada plexiforme externa (opl), camada nuclear interna (inl), camada plexiforme interna (ipl), e camada de células ganglionares (gcl). Barra de escala: 50 µm.

4.8 Caracterização do modelo de neurodegeneração por lesão mecânica

Foram realizados experimentos para caracterizar o modelo de lesão proposto. Foi possível observar uma gliose reativa pronunciada no foco da lesão (Figura 15). Na região controle da retina (mais distal em relação ao foco da lesão), observamos marcação nos processos internos de células de Muller.

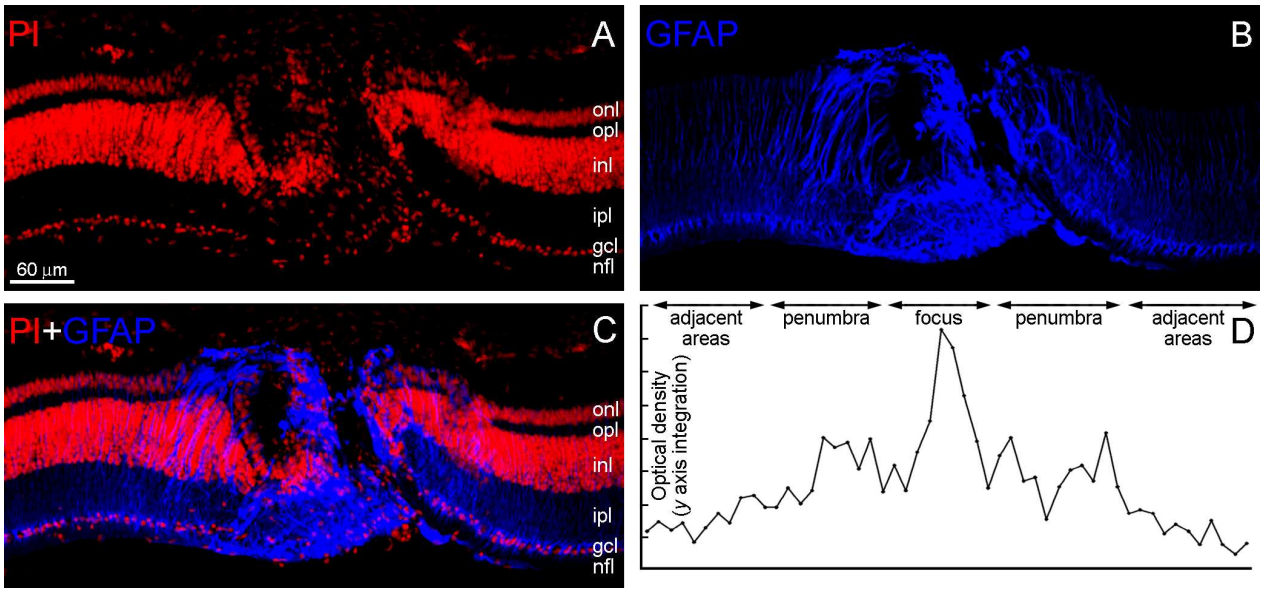

Figura 15- Caracterização do modelo de lesão mecânica na retina. (A) Contra coloração das camadas nucleares da retina por iodeto de propídio. A área central interrompida corresponde ao centro da lesão. (B) Caracterização da expressão de GFAP (marcador de células de Müller na retina de pintos) no modelo de lesão. O padrão normal de expressão de GFAP é uma marcação de processos na GCL e NFL. (C) Sobreposição das imagens em A e B. No foco da lesão a marcação foi observada em processos verticais cruzando a INL, OPL e ONL. (D) Gráfico representando a densidade óptica da imagem mostrada em B. A análise *pixel/pixel* da densidade óptica foi integrada no eixo *y*, evidenciando a gliose reativa decorrente da lesão. Barra de escala: 60 µm.

4.9 Alterações da expressão gênica de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração

A expressão gênica das Cx36 e Cx43 no modelo de lesão mecânica foram avaliadas com a técnica de PCR em tempo real nos diferentes tempos após lesão (1 3 e 7 dias). A Cx36 não variou significativamente em nenhum período analisado, mas a Cx43 apresentou uma pequena variação com 1 dia de lesão, voltou aos níveis fisiológicos após 3 dias e apresentou uma regulação positiva e significativa com 7 dias pós-lesão (Figura 16).

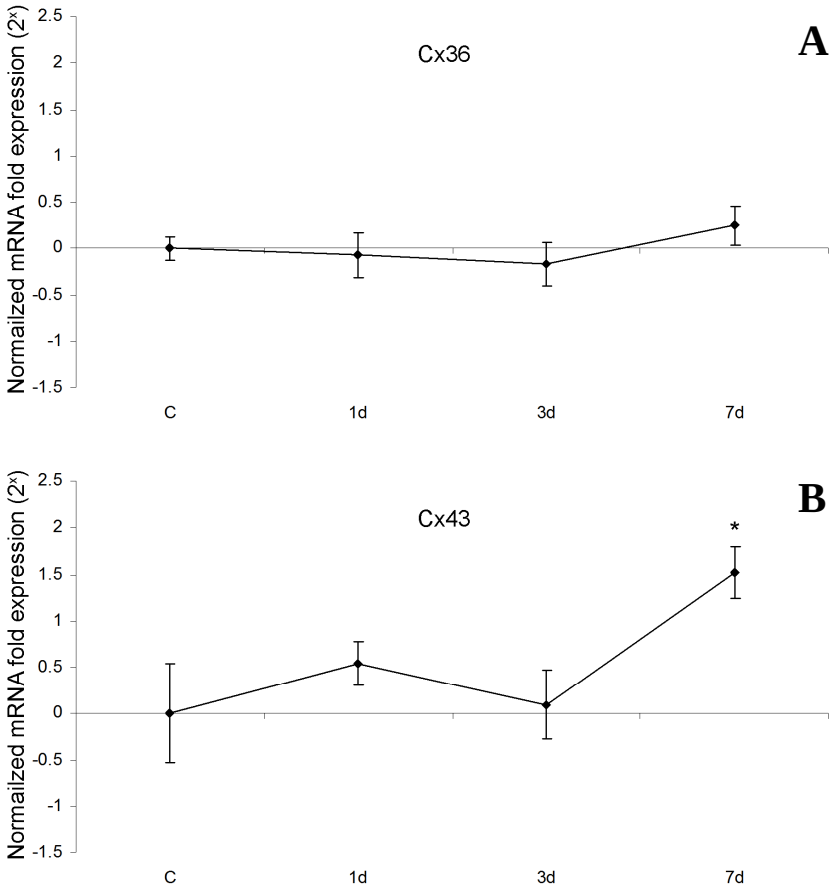

Figura 16- Análise da expressão gênica de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração. (A) A expressão gênica de Cx36 não variou significativamente nos diferentes períodos pós-lesão. (B) A expressão de Cx43 aumentou no primeiro dia pós-lesão, voltou a níveis fisiológicos em um período de 3 dias de sobrevida e com 7 dias de sobrevida ocorreu uma modulação positiva muito significativa da expressão.

4.10 Alterações dos níveis protéicos de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração

Além da expressão gênica, avaliamos os níveis protéicos destas Cxs por w*estern blot* na retina de pintos. Os níveis protéicos de Cx36 apareceram diminuídos após 1 dia de lesão, e aumentaram significativamente após 7 dias (Figura 17A). Detectamos um aumento dos níveis protéicos de Cx43 com 1 dia pós-lesão e ao mesmo tempo uma mudança evidente no padrão de fosforilação para essa proteína. Nos demais dias pós-lesão não observamos mudanças significativas comparando a amostra lesada e seu respectivo controle (Figura 17B).

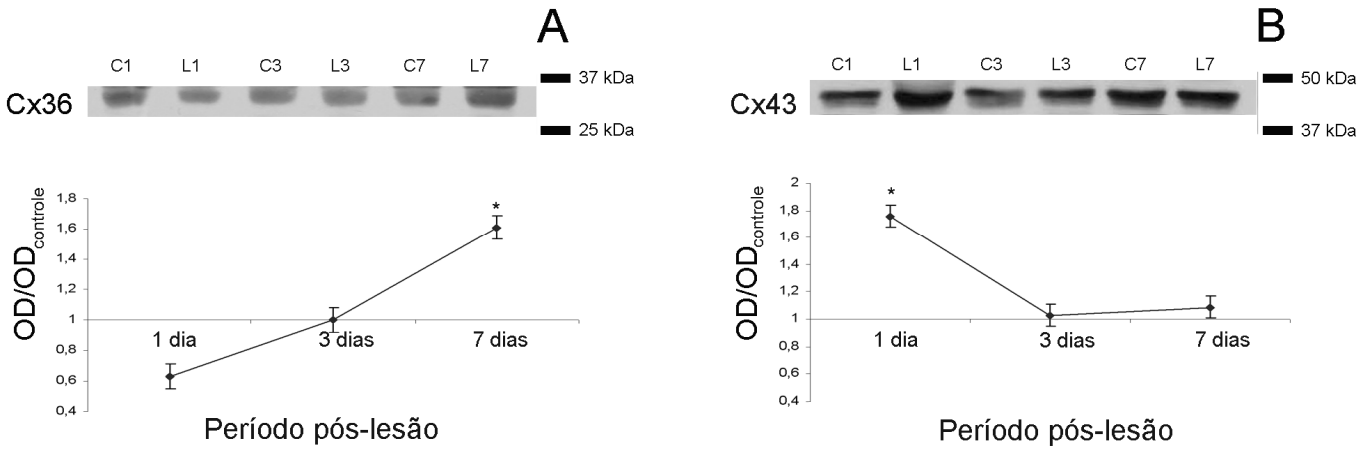

Figura 17- Análise dos níveis protéicos de Cx36 e Cx43 na neurodegeneração. (A) Os níveis protéicos de Cx36 não variou significativamente nos diferentes períodos pós-lesão. Com 1 dia após a lesão a quantidade de proteína estava diminuída e foi aumentando gradativamente até 7 dias. (B) Os níveis protéicos de Cx43 estavam aumentados com 1 dia após a lesão, além disso ocorreu mudança no padrão de fosforilação. Em 3 e 7 dias após a lesão, a quantidade de proteína detectada não foi diferente em relação aos respectivos controles.

4.11 Alterações na distribuição protéica de Cx36 na neurodegeneração

Avaliamos o padrão de distribuição da Cx36 em todos os tempos pós-lesão propostos inicialmente (Figura 18). Essa proteína parece ter uma regulação negativa de sua expressão no foco da lesão durante o processo degenerativo, mas não houve variação entre os períodos estudados. As retinas foram submetidas a uma contra-coloração das camadas nucleares por iodeto de propídio para melhor visualização da marcação. No foco da lesão nota-se um aumento da expressão de iodeto de propídio indicando núcleos de células em apoptose. Na retina com 1 dia de lesão, observamos uma desorganização geral decorrente da lesão.

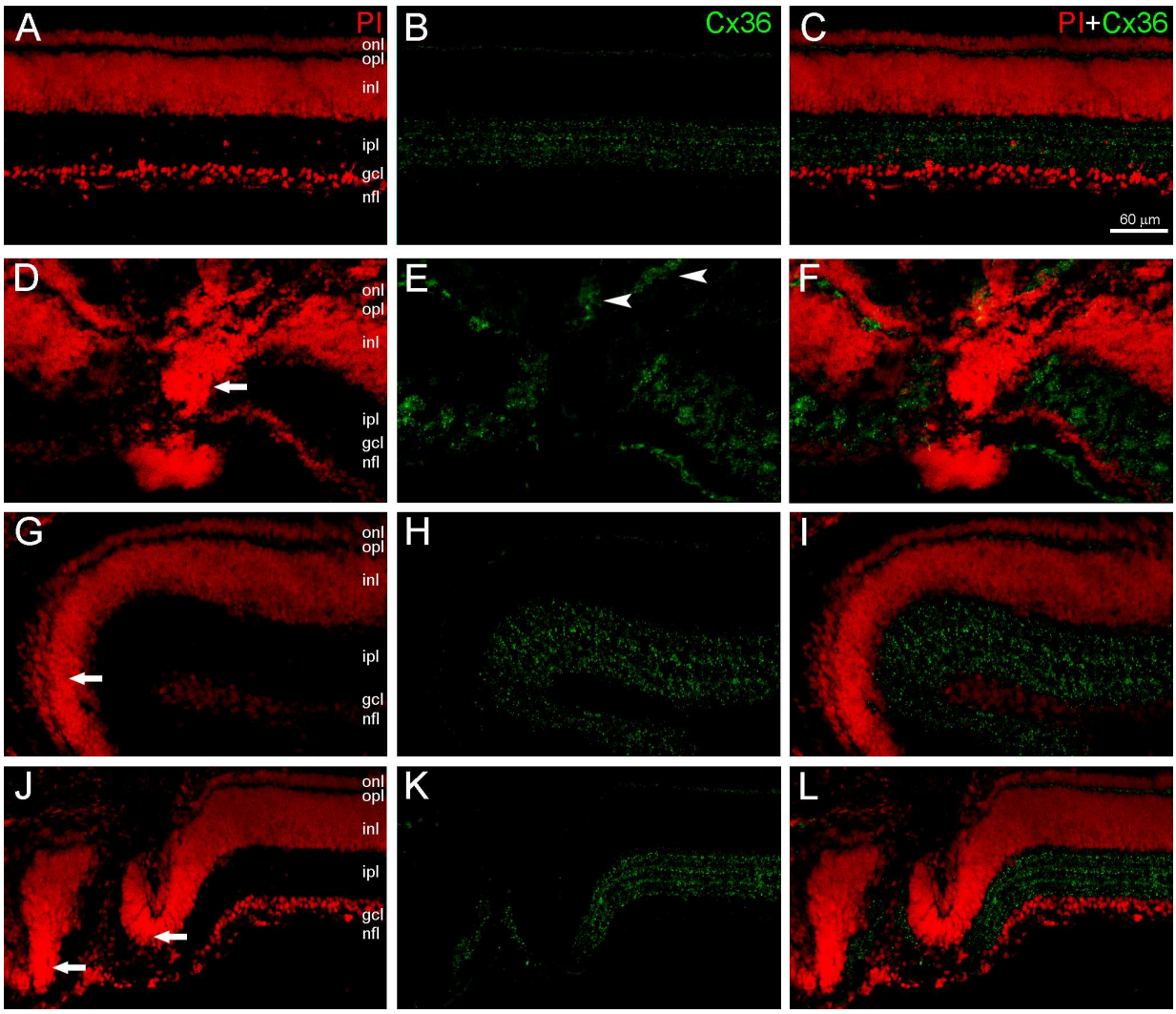

Figura 18- Análise da distribuição espacial de Cx36 na neurodegeneração. Contra coloração das camadas nucleares da retina por iodeto de propídio em retinas controle (A), lesada com 1 dia pós-lesão (D), 3 dias pós-lesão (G) e 7 dias pós-lesão (J). As áreas centrais ou laterais interrompidas correspondem ao foco da lesão. Caracterização da expressão de Cx36 em retinas controle (B), lesada com 1 dia pós-lesão (E), com 3 dias pós-lesão (H) e com 7 dias pós-lesão (K). Sobreposição das imagens de retinas controle (C), lesada com 1 dia pós-lesão (F), com 3 dias pós-lesão (H) e com 7 dias pós-lesão (L). Na retina controle, observamos uma marcação puntiforme na IPL formando duas linhas paralelas além de uma marcação puntiforme na OPL. Na retina lesada (setas), observamos um aumento da IR para o PI evidenciando núcleos de células em apoptose. Com 1 dia pós-lesão é possível observar um desarranjo na marcação de Cx36 não observado na retina controle, além disso, ocorre uma diminuição da marcação no foco da lesão. Estes resultados sugerem uma modulação na expressão dessa proteína. Barra de escala: 60 µm.

4.12 Alterações na distribuição protéica de Cx43 na neurodegeneração

Caracterizamos a distribuição espacial da Cx43 na retina controle e após 1, 3 e 7 dias de lesão (Figura 19). Na retina controle, observamos uma marcação fraca na OPL, marcação moderada na IPL e marcação mais intensa na GCL, de acordo com os resultados prévios sobre esta proteína relatados no artigo de Cxs no desenvolvimento (ANEXO B; Kihara, et al., 2008). Com 1 dia após lesão, foi possível identificar um aumento da imunorreatividade para a Cx43 no foco da lesão em relação às áreas controles, mas o padrão de marcação não teve alteração (Figura 19). Ao mesmo tempo, após 1 dia, observamos uma diminuição da marcação na penumbra, região seguinte ao foco da lesão comparando as áreas controles. Após 3 e 7 dias de lesão, ocorreu uma desorganização significativa na distribuição desta proteína. Observamos também, nos períodos de 3 e 7 dias pós-lesão, um aumento geral na marcação de Cx43 em toda a retina. Nas retinas lesadas, observamos um aumento da imunorreatividade para o iodeto de propídio (PI) no foco da lesão, evidenciando núcleos de células em apoptose.

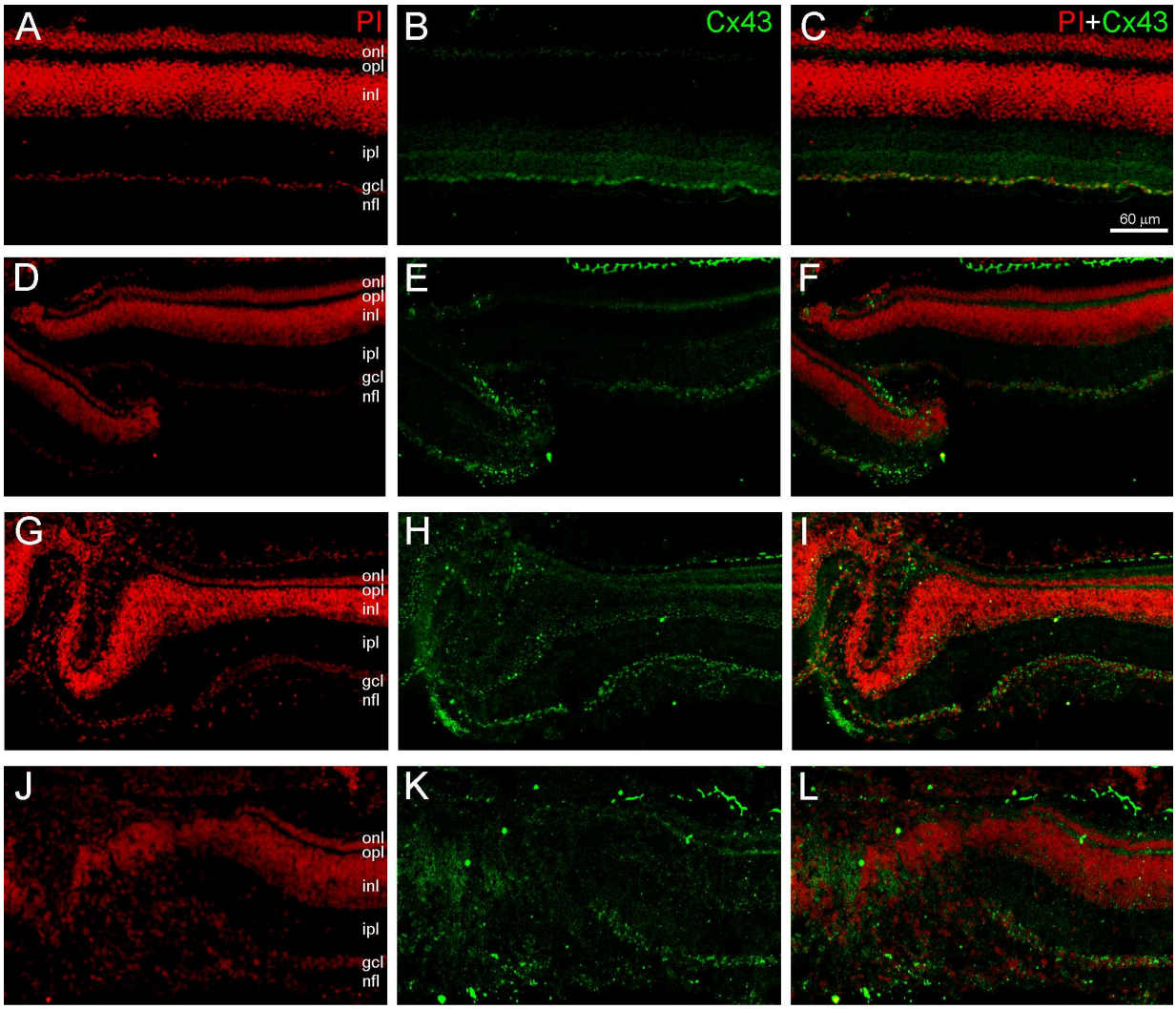

Figura 19- Análise da distribuição espacial de Cx43 na neurodegeneração. Contra coloração das camadas nucleares da retina por iodeto de propídio em retinas controle (A), com 1 dia pós-lesão (D), 3 dias pós-lesão (G) e 7 dias pós-lesão (J). As áreas laterais interrompidas correspondem ao foco da lesão. Caracterização da expressão de Cx36 em retinas controle (B), lesada com 1 dia pós-lesão (E), com 3 dias pós-lesão (H) e com 7 dias pós-lesão (K). Sobreposição das imagens de retinas controle (C), lesada com 1 dia pós-lesão (F), com 3 dias pós-lesão (H) e com 7 dias pós-lesão (L). Na retina controle, observamos uma marcação fraca na OPL, marcação moderada na IPL e marcação mais intensa na GCL. Nas retinas lesadas, observamos um aumento da IR para o PI no foco da lesão evidenciando núcleos de células em apoptose. Com 1 dia pós-lesão é possível observar um aumento da IR para Cx43 no foco da lesão e uma diminuição na penumbra com relação as regiões controles. . Após 3 e 7 dias de lesão observamos uma desorganização da distribuição espacial desta proteína. Barra de escala: 60 µm.

4.13 Caracterização de degeneração por Fluoro-Jade B

Realizamos experimentos para evidenciar células que estão morrendo no processo degenerativo. Para isso, utilizamos Fluoro-Jade B, um marcador histoquímico usado para evidenciar neurônios em degeneração, freqüentemente por processo necrótico. Nossos resultados indicaram que o processo degenerativo ocorre principalmente entre 6 horas e 1 dia (Figura 20).

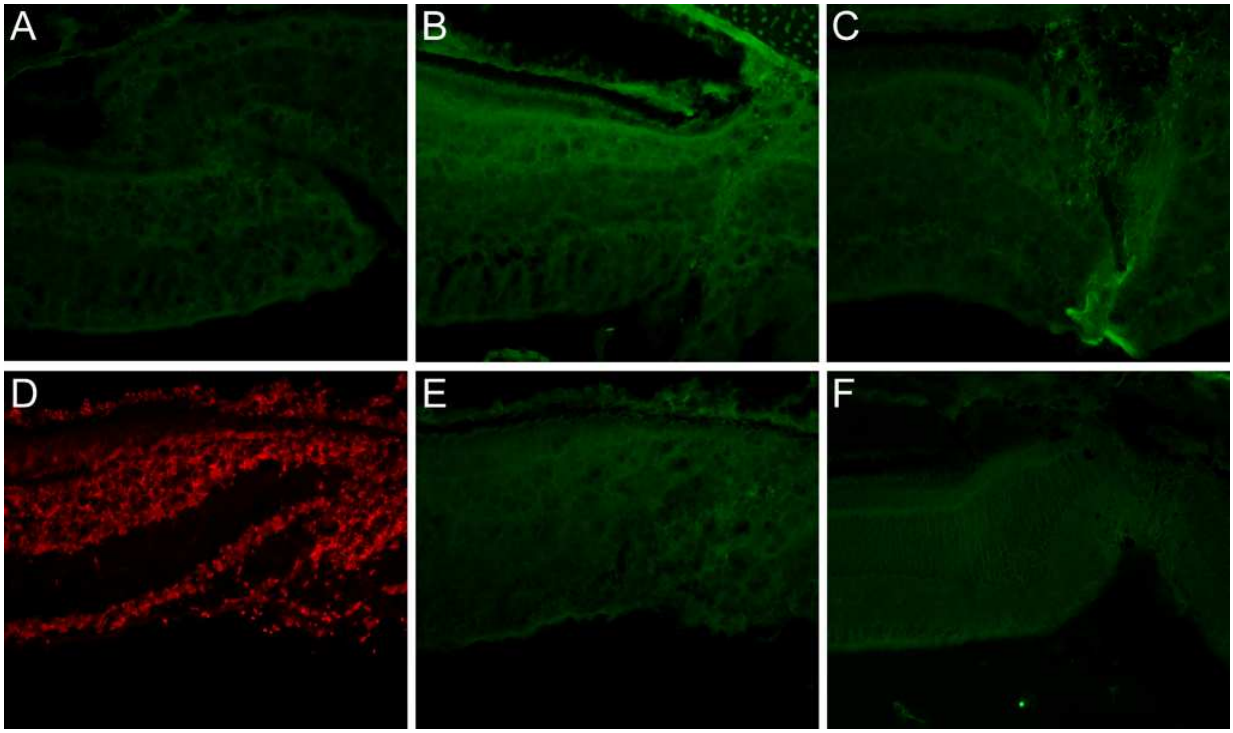

Figura 20- Histoquímica utilizando Fluoro-Jade B na neurodegeneração. Retinas com diferentes tempos pós-lesão: (A) 2h, (B) 6h, (C) 24h, (D, E) 3 dias e (F) 7 dias.

4.14 Caracterização de apoptose por TUNEL

Baseado nos resultados obtidos com a marcação por Fluoro-Jade B, realizamos experimentos utilizando a técnica de TUNEL. Nossos resultados evidenciaram a presença de células apoptóticas nas proximidades da lesão nos períodos analisados, que neste caso foram entre 6 e 24 horas (Figura 21).

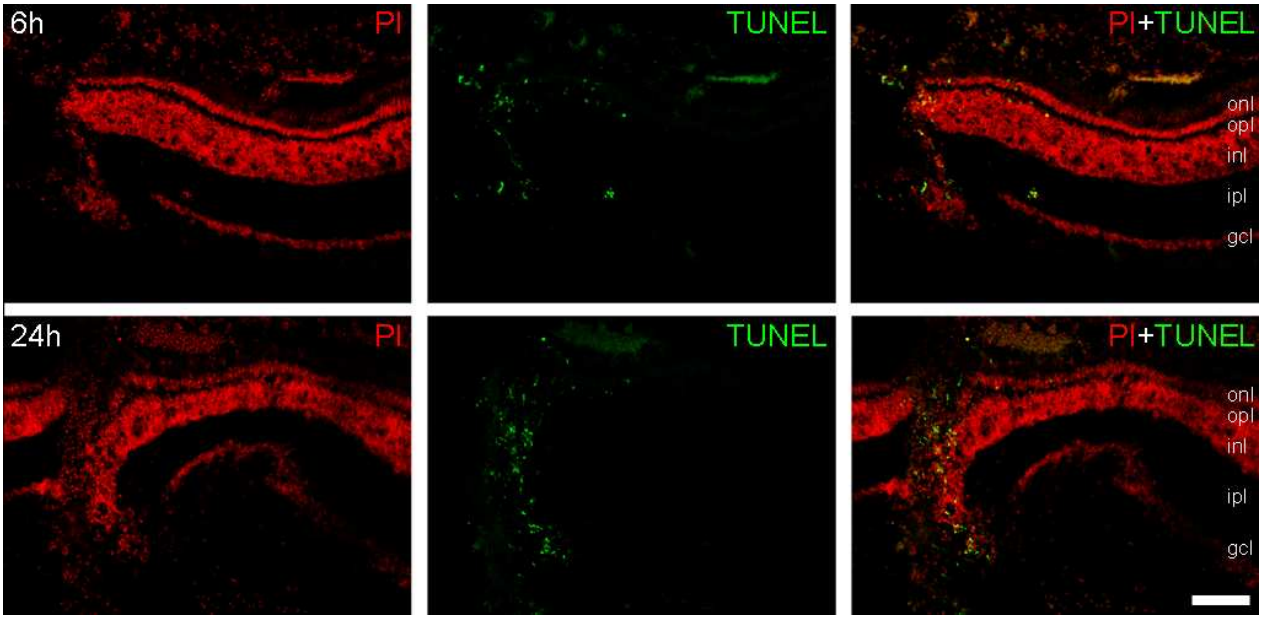

Figura 21- Ensaio para TUNEL em retinas lesadas após 6 e 24 horas. As retinas foram contra-coradas com iodeto de propídio para melhor visualização das camadas nucleares. Barra de escala: 60 µm.

Ao determinarmos que o pico de morte celular ocorre principalmente 1 dia após a lesão, realizamos experimentos de TUNEL com imuno-histoquímica de Cx36 para analisar se as células em apoptose estavam acopladas ou não. Este resultado revelou que uma grande quantidade de células da INL e ONL estavam em apoptose. As células que expressam a Cx36 (cones, bipolares e amácrinas) têm seus pericários situados justamente nessas camadas (Figura 22).

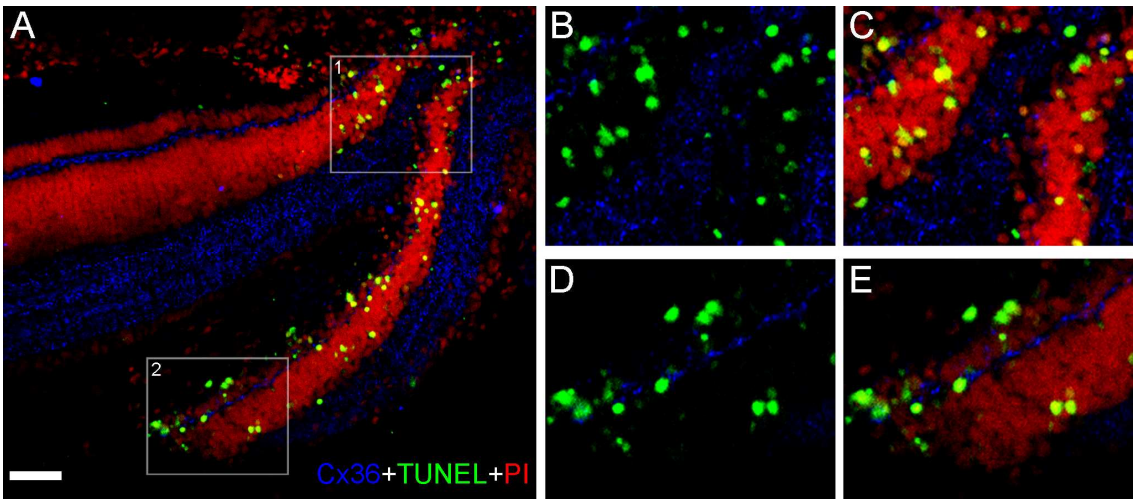

Figura 22- Experimento com TUNEL e Cx36. A proximidade de marcação entre células apoptóticas e Cx36 sugere que as células entram em processo de apoptose acopladas. As retinas foram contra-coradas com iodeto de propídio para melhor visualização das camadas nucleares. Barra de escala: 60 µm.

4.15 Ensaios de viabilidade celular por liberação de lactato desidrogenase

Uma vez que determinamos a presença de células apoptóticas e necróticas no período inicial da lesão, examinamos a liberação de lactato desidrogenase (LDH) após 1 dia de lesão. Realizamos experimentos para determinar a quantidade de LDH liberado por retinas lesadas e controles (sem lesão mecânica). Os animais foram submetidos à lesão e sacrificados após 1 dia. Suas retinas foram dissecadas e condicionadas em meio de explante por 4 horas. Os resultados preliminares indicaram que a liberação de LDH foi maior significativamente em retinas lesadas do que em retinas controle (Figura 23).

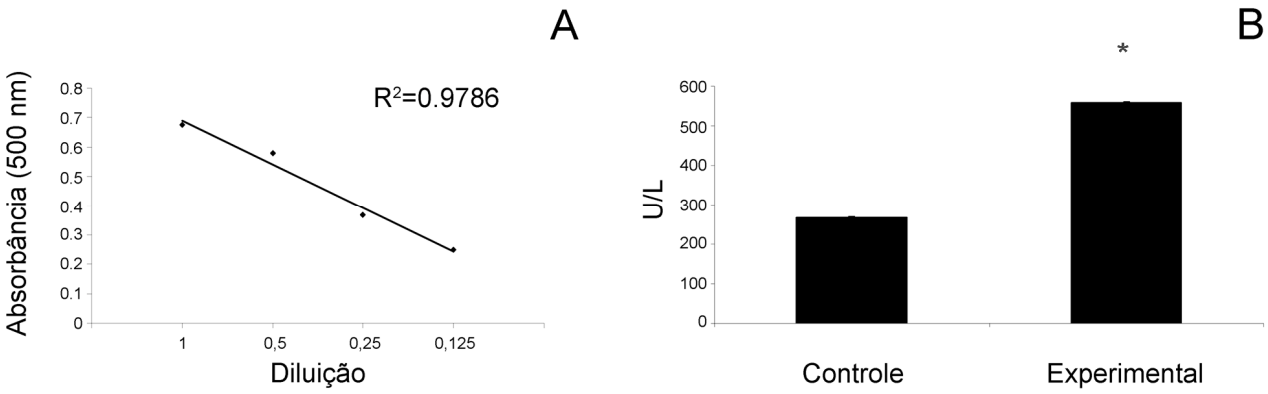

Figura 23- Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH). (A) Curva padrão com diferentes diluições. (B) Liberação da enzima em retina lesada e controle. Teste T pareado ($p<0,01$).

Depois de determinar a diferença de liberação entre retinas lesadas e controles, iniciamos os estudos com bloqueadores (CBX e quinina) e abridores (TMA) farmacológicos de JCs. Realizamos experimentos para avaliar a liberação desta enzima após 1, 2 e 4 horas de condicionamento em meio de cultura contendo PBS (controle) ou agentes farmacológicos (experimental).

Na figura 24A, tanto o controle quanto o experimental liberaram praticamente a mesma quantidade de LDH após 1 e 2 horas de incubação com PBS ou CBX. Após 4 horas, o explante de retina controle liberou significativamente mais LDH do que o que estava incubado com CBX. Observando o experimento com quinina (Figura 24B) podemos concluir que a ação deste fármaco foi mais precoce, após 1 hora de incubação o controle liberou significativamente mais LDH do que o experimental e após 4 horas a diferença aumentou.

A combinação de CBX (bloqueador inespecífico de Cxs) com quinina (bloqueador específico para Cx36 e Cx50) resultou em diminuição da liberação de LDH em todos os tempos observados (Figura 24C). Finalmente, podemos observar na figura 24D experimentos com TMA (abridor de JCs). Nossos dados mostraram que nas primeiras horas de incubação, a liberação de LDH foi menor pelas retinas controle do que pelas incubadas com TMA, mas após 4 horas, os explantes controles e experimentais passaram a liberar a mesma quantidade da enzima. Este último experimento não apresentou significância estatística. Os asteríscos indicam resultados com significância estatística no teste T pareado ($p<0,01$).

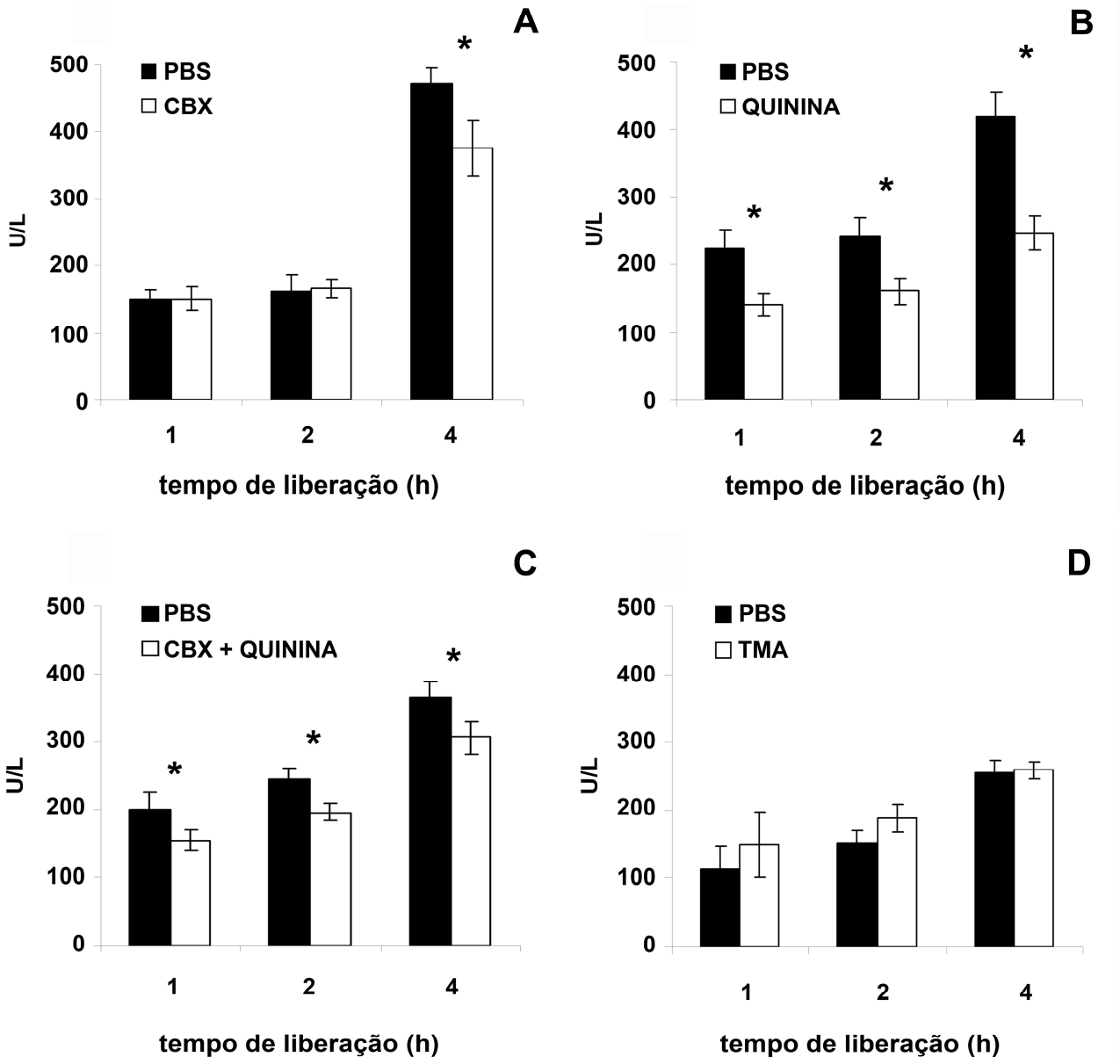

Figura 24- Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) utilizando bloqueadores e abridores de JCs. As barras do gráfico representam a quantidade de enzima LDH liberada em U/L por tempo de incubação (1, 2 e 4 horas). (A) retinas lesadas condicionadas em meio de cultura com PBS e CBX. (B) retinas lesadas condicionadas em meio de cultura com PBS e quinina. (C) retinas lesadas condicionadas em meio de cultura com PBS e uma mistura de CBX+quinina. (D) retinas lesadas condicionadas em meio de cultura com PBS e TMA. Teste T pareado ($p<0,01$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Cxs no desenvolvimento embrionário da retina de pintos

5.1.1 Cx36 na retina de pintos

A maior parte dos estudos que descrevem a Cx36 consideram esta proteína como a Cx mais abundante na retina de roedores (Sohl, et al., 1998; Feigenspan, et al., 2001; Striedinger, et al., 2005; Kihara, et al., 2006a). Estudos mostraram que a Cx36 esta presente em vários neurônios da retina, incluindo fotorreceptores, como bastonetes e/ou cones, células amácrinas AII e células bipolares de cones (Deans, et al., 2002; Degen, et al., 2004; Feigenspan, et al., 2004). A Cx36 é considerada um elemento essencial na via dos bastonetes visto que células ganglionares de centro "*on"* de animais KO para Cx36 não respondem a estimulação visual (Deans, et al., 2002). Entretanto, na retina de pintos, animais com visão fotópica com predominância de cones, a Cx36 não havia sido detectada anteriormente, mesmo com estudos sobre esta Cx durante o desenvolvimento embrionário (Becker, et al., 2002).

No presente estudo, fomos capazes de detectar uma modulação da expressão de Cx36 durante a histogênese da retina. Observamos níveis de expressão virtualmente ausentes no início do desenvolvimento embrionário e níveis muito altos na retina adulta. De fato, tanto os resultados obtidos no PCR quanto no *western blot* mostraram que a Cx36 é mais expressa em neurônios diferenciados da retina do que em células progenitoras. Estes resultados foram de encontro com estudos anteriores realizados em camundongos (Hansen, et al., 2005, Kihara, et al., 2006a). Nestes estudos, a Cx36 tinha baixa expressão nos primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (P1, P5), aumentando até os níveis do adulto em P10.

Em nosso estudo, observamos que na retina de embriões E15 os níveis de expressão da Cx36 e o padrão de distribuição se apresentaram como na retina adulta. Nesta fase do desenvolvimento, a maioria dos tipos celulares já se diferenciou. Finalmente, descrevemos a expressão da Cx36 em cones na retina madura de pintos, com um padrão de distribuição bastante distinto na camda plexiforme interna. Na retina de pintos, localizamos a Cx36 principalmente na sub-lâmina "*off*" da camada plexiforme interna, em oposição à sub-lâmina "*on*", na retina

de roedores. Assim, embora a ontogênese dessa proteína na retina de pintos compartilhe um perfil temporal semelhante com o observado no desenvolvimento de camundongos, provavelmente possui um papel específico na circuitaria da retina das diferentes espécies.

5.1.2 Cx43 na retina de pintos

No SNC, a Cx43 foi descrita em células da glia (Theis, et al., 2005), principalmente em animais adultos (Guldenagel, et al., 2000; Zahs, et al., 2003; Kihara, et al., 2006a). Apesar disso, embora alguns estudos sugiram a expressão dessa proteína em neurônios de regiões específicas (Rozental, et al., 2000). Curiosamente, na retina de embriões de pintos, a expressão da Cx43 foi determinada na transição do epitélio pigmentar da retina (EPR) com a parte neural da retina (Pearson, et al., 2004).

Neste estudo, caracterizamos a expressão da Cx43 durante a histogênese da retina. Utilizando métodos quantitativos, verificamos que a elevada expressão da Cx43 no início do desenvolvimento embrionário provavelmente é determinada tanto por mecanismos de transcrição quanto de tradução. Além disso, observamos mudanças importantes no estado de fosforilação da Cx43 durante a retinogênese: nos estágios iniciais, verificamos a prevalência da forma fosforilada dessa proteína, que apresenta uma desfosforilação gradual durante o desenvolvimento. No início do desenvolvimento, a Cx43 forma hemicanais entre o epitélio pigmentado e a retina neural que permitem a passagem de ATP e outras moléculas (Pearson, et al., 2004). Diversas evidências indicam que o grau de fosforilação da Cx43 está correlacionado com a permeabilidade das JCs (Musil, et al., 1990; Lampe e Lau, 2000), embora a regulação pós-transcricional da Cx43 seja mediada por estímulos específicos do tecido (Li, et al., 1998). Em resumo, observamos mudanças evidentes na expressão de Cx43 durante o desenvolvimento da retina, o que provavelmente indica funções específicas desta Cx durante o desenvolvimento.

5.1.3 Cx45 na retina de pintos

Em contraste com a Cx43, a expressão da Cx45 ainda não havia sido caracterizada na retina de pintos até o momento. Com este estudo, fomos capazes

de determinar altos níveis de expressão gênica e protéica, por PCR em tempo real e *western blot*, durante o desenvolvimento e no adulto. Estudos anteriores descreveram a Cx45 presente em células gliais, uma hipótese sugerida por dados em outras regiões do SNC (Kleopa, et al., 2002) e evidências *in vitro* (Dermietzel, et al., 2000). Na retina de camundongos, apesar de ser expressa por neurônios, a Cx45 foi descrita em células gliais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kihara, et al., 2006b). Estudos utilizando gene repórter de Cx45 em camundongos (Maxeiner, et al., 2003) sugeriram que canais de Cx45 têm um papel específico durante o desenvolvimento do SN. Analisando nossos resultados a respeito desta Cx, podemos atribuir à Cx45 importante papel em processos relacionados com a histogênese da retina de pintos, sendo a Cx com maior distribuição em células progenitoras.

5.1.4 Cx50 na retina de pintos

Embora a expressão gênica de Cx50 tenha sido descrita em camundongos (Guldenagel, et al., 2000, Kihara, et al., 2006a), a distribuição espacial desta Cx na retina foi muito estudada no sistema visual de coelhos (Schutte, et al., 1998; Huang, et al., 2005). Nesses estudos (Huang, et al., 2005), o RNAm da Cx50 e a proteína foram descritos em células horizontais. Em adição, a Cx50 foi caracterizada na macroglia, tanto na retina de coelhos como na de ratos (Schutte, et al., 1998). Embora alguns estudos tenham avaliado a Cx50 em tecidos neurais (Whiteet al., 1998; Yin, et al., 2001; Zhouet al., 2002), informações relacionadas à expressão ontogenética dessa Cx na retina são muito limitadas. Ao contrário da Cx43 e Cx45, não foi detectada expressão significativa da Cx50 nos estágios iniciais do desenvolvimento, mas uma regulação positiva muito pronunciada durante a histogênese da retina. É possível que o aumento da expressão da Cx50, observada em estágios do final do desenvolvimento embrionário (E15 e P15), tenha relação com a diferenciação celular e maturação sináptica dos tipos celulares da retina que ocorrem mais tardiamente na escala de tempo, principalmente em células amácrinas e bipolares. Nesse sentido, a expressão de Cx50 aparece simultaneamente à formação da circuitaria básica subjacente à sinalização visual (E12-E15), apresentando um padrão de expressão temporal parecido ao padrão de Cx36 observado em camundongos (Degen, et al., 2004; Hansen, et al., 2005; Kihara, et al., 2006a).

5.2 Cxs na adaptação ao escuro

É largamente aceito que a comunicação mediada por Cxs na retina é importante para a adaptação dos indivíduos em ambientes com diferentes níveis de luminosidade (Becker, et al., 1998; Weiler, et al., 1999). A adaptação ao escuro desencadeia numerosos eventos no sistema visual, desde a contração pupilar controladas por áreas pré-tectais até mudanças nos níveis de dopamina, óxido nítrico e ácido retinóico, alterando a condutância dos canais de JCs formados por Cxs (Kihara, et al., 2006a). De fato, a produção e liberação destas moléculas neuromediadoras estão relacionadas à luminosidade ambiental, afetando o tamanho do campo receptivo das células da retina (Weiler e Akopian, 1992; Mills e Massey, 1995; Baldridge, et al., 1998). Além disso, o rápido “turnover” de proteínas que formam as JCs, evidenciado pela curta meia-vida das Cxs (Beardslee, et al., 1998; Saffitz, et al., 2000), indicam que a extensão do acoplamento é regulada pela transcrição e tradução desta proteína (Becker, et al., 1998). Estudos indicam que a falta de estímulo visual causada por longa adaptação ao escuro altera a expressão de Cxs na retina (Yang e Wu, 1989; Al-Ubaidi, et al., 2000; Kihara, et al., 2006a). De fato, mudanças no acoplamento de células da retina, particularmente entre os fotorreceptores (Raviola e Gilula, 1973; Tsukamoto, et al., 2001) e em menor grau entre as células da retina interna (Bloomfield e Xin, 1997), foram propostas para regular a circuitaria da retina, respondendo diferentemente para condições ambientais diversas de luminosidade (Sterling, 1995). Entretanto, nós observamos uma regulação positiva da expressão de Cx36 na adaptação ao escuro por toda a retina, notavelmente entre terminais sinápticos de cones. É possível que essa regulação aumente o acoplamento entre os fotorreceptores em condições escotópicas, permitindo e facilitando a somação espacial inicial na via vertical. Por este mecanismo, o sistema visual pode aumentar a sensibilidade à luz, mas em contrapartida, ocorre a diminuição da acuidade visual, como sugerido por resultados de estudos psicofísicos em humanos (Kihara, et al., 2006b).

Para concluir, a Cx36 foi descrita como a mais importante Cx na circuitaria da retina de espécies de mamíferos com hábitos noturnos, no qual o sistema visual é adaptado para a visão escotópica e o principal fotorreceptor é o bastonete. Por outro lado, no nosso estudo, a Cx36 foi descrita em uma retina com predominância de cones, onde, em nosso conhecimento, a via dos bastonetes não é bem

desenvolvida. A circuitaria da retina exibe particularidades baseadas na filogenia da espécie, compreendendo variações em diversos aspectos como, por exemplo, a expressão de neurotransmissores e seus respectivos receptores (Wassle e Boycott, 1991; Haverkamp e Wassle, 2000). Enquanto animais de hábitos noturnos como os roedores, que possuem predominantemente bastonetes, a sinalização via JCs ocorre verticalmente, em animais de hábitos diurnos como as aves, com predominância de cones, a Cx36 participa, aparentemente, de uma integração horizontal dos sinais.

5.3 Neurodegeneração retiniana causada por trauma mecânico

5.3.1 Cxs na neurodegeneração retiniana

Devido ao fácil acesso do ponto de vista experimental, a retina pode ser considerada um excelente modelo para o estudo dos efeitos de traumas mecânicos e mecanismos compensatórios de reparo sob condições experimentais controladas (Eysel, 1999). Este modelo de degeneração por lesão delimitada espaço-temporalmente possibilita a visualização de processo de gliose reativa muito pronunciada no foco das lesões retinianas, revelando uma importante reorganização tecidual. Foi descrito que as células gliais podem formar um sincício, com acoplamento via JCs, para diminuir a alta concentração de cálcio decorrente da morte neuronal (Orthmann-Murphy, et al., 2008).

Nossos experimentos mostraram que a expressão gênica de Cx36 não variou significativamente nos diferentes tempos pós-lesão analisados, mas os experimentos de *western blot* revelaram um aumento significativo dos níveis protéicos na retina após 7 dias de lesão. De fato, outros estudos com modelos degenerativos indicaram a modulação nos níveis protéicos de Cx36 sem alterações de expressão gênica (Oguro, et al., 2001; Striedinger, et al., 2005). Nos experimentos de imuno-histoquímica que evidenciam o foco, penumbra e áreas adjacentes à lesão, a Cx36 também não variou significativamente nos diferentes períodos pós-lesão, mas apareceu diminuída no foco de todas as lesões devido, possivelmente, à perda de células no local. O aumento dos níveis protéicos por *western blot* após 7 dias pode ser explicado por uma regulação positiva em toda a retina, como uma reação

tecidual à lesão, mas não ocorreram mudanças significativas no padrão de distribuição no foco da lesão.

Por outro lado, o RNAm da Cx43 aumentou após 1 dia de lesão, embora não de forma significativa. Somente após 7 dias de lesão houve um aumento significativo de expressão gênica, caracterizando uma regulação positiva deste gene neste período. Os experimentos de *western blot,* ao contrário, detectaram um aumento significativo da Cx43 com 1 dia pós-lesão. A detecção desta proteína em gel de poliacrilamida é caracterizada pela presença de banda dupla, indicando diferentes estados de fosforilação. Nas retinas controle (sem lesão) observamos marcação mais evidente da banda que representa o estado fosforilado da proteína. Por outro lado, em retinas com 1 dia de lesão, a forma predominante foi a desfosforilada, sugerindo mudanças conformacionais nesta proteína. De fato, como discutido na seção sobre o desenvolvimento, estudos indicam que o estado de fosforilação da Cx43 está co-relacionado com a permeabilidade dos canais de JCs (Musil, et al., 1990; Lampe e Lau, 2000). Assim, podemos sugerir que houve uma diminuição do acoplamento celular com 1 dia após a lesão, mas não dos níveis de proteína. Depois de 3 e 7 dias não observamos diferenças significativas dos níveis de proteína total com relação aos respectivos controles. Nos experimentos de imuno-histoquímica, evidenciamos um resultado parecido com o do *western blot*, observamos aumento da marcação de Cx43 no foco da lesão após 1 dia de lesão e uma pequena diminuição na penumbra, região adjacente à lesão, quando comparada as áreas controles. Nos demais períodos, 3 e 7 dias pós-lesão, ocorreu uma desorganização na distribuição desta proteína e um aumento geral na marcação de Cx43 em toda a retina, indicando uma resposta tecidual à lesão.

Atualmente, um grande número de mecanismos para degeneração secundária tem sido proposto, incluindo alterações na concentração extracelular de íons, liberação de espécies reativas de oxigênio, redução da energia disponível, altos níveis de glutamato (neurotransmissor excitatório) e alteração da concentração de cálcio intracelular, que em altos níveis pode ser citotóxica (Lynch e Dawson, 1994; Kermer, et al., 1999). Para caracterizar nosso modelo de lesão como um modelo efetivo de neurodegeneração, realizamos experimentos histoquímicos com Fluoro-Jade B, que evidencia a degeneração em neurônios, e a técnica de TUNEL, que marca núcleos de células em apoptose. Nos dois experimentos caracterizamos uma alta incidência de morte celular com 6 horas e um pico de morte celular com 1

dia após a lesão. Estes resultados indicaram que a morte neuronal evidenciada por estas metodologias é principalmente secundária, uma vez que em 2 horas pós-lesão não encontramos marcação tão evidente. Estes resultados corroboram com estudos que utilizaram modelo de lesão por trauma mecânico no encéfalo, onde observamos células em apoptose principalmente entre 6 e 24h após a lesão, caracterizando uma morte celular secundária severa, evidenciando uma preponderância da apoptose sobre a necrose (Alzheimer, et al., 2002).

Nossos experimentos de dupla-marcação com TUNEL e Cx36 revelaram uma grande população de núcleos em apoptose (células TUNEL-positivas) na INL e ONL, locais onde se concentram grande quantidade de células amácrinas com processos que arborizam na IPL e cones que arborizam na OPL, camadas plexiformes com alta expressão de Cx36. Esse dado sugere que as células em processo de apoptose apresentam-se acopladas. De acordo com a literatura, as camadas INL e ONL concentram os pericários de neurônios que expressam Cx36 como as células amácrinas, células bipolares de cone tipo *"on"* e cones (Feigenspan, et al., 2001; Feigenspan, et al., 2004).

5.3.2 Acoplamento celular na neurodegeneração retiniana

Depois de caracterizar a morte celular neste modelo, realizamos experimentos *in vitro* com bloqueadores farmacológicos de JCs como carbenoxolone (CBX, um bloqueador inespecífico de JCs, análogo ao ácido glicirretínico) e quinina (bloqueador específico de JCs formadas por Cx36 e Cx50), além de abridores de JCs como a trimetilamina (TMA). Realizamos medições da quantidade de Lactato Desidrogenase, enzima contida no citosol das células, liberada no meio de cultura em função da estabilidade da membrana celular. Em experimentos controle, nossos resultados evidenciaram que retinas lesadas por trauma mecânico liberaram o dobro de LDH do que retinas não lesadas após 4 horas de incubação em meio de cultura.

Nos experimentos com agentes farmacológicos, retinas lesadas foram incubadas em meio de cultura contendo PBS (controle) ou CBX (experimental) por 4 horas. Após 1 e 2 horas de incubação não foi possível observar diferenças significativas na liberação de LDH comparando o controle com o experimental, mas após 4 horas de incubação as retinas controle liberaram significativamente mais LDH do que as retinas incubadas com CBX. Experimentos com quinina mostraram que

após uma hora de incubação o controle liberou significativamente mais LDH do que o experimental, e essa diferença aumentou após 4 horas. Experimentos combinando CBX com quinina evidenciaram maior liberação de LDH pelo controle em relação ao experimental desde a primeira hora de incubação, e essa diferença se manteve estável após 4 horas. Esses dados sugerem que o CBX isoladamente tem ação anti-apoptótica, embora seus efeitos demorem algumas horas para serem evidenciados. A quinina apresentou uma ação mais rápida e também a favor da neuroproteção. Com a combinação dos dois fármacos não houve potencialização dos efeitos, mas sua ação foi rápida, ou seja, foi possível observar seus efeitos logo nas primeiras horas.

Por outro lado, estudos de lesão por laser na retina de roedores descreveram que tanto o tratamento com CBX quanto com quinina, *in vitro*, aumentaram a vulnerabilidade celular, ou seja, a incidência de morte celular secundária, sugerindo um papel neuroprotetor dos canais de JCs (Striedinger, et al., 2005). Uma possível explicação para essas discrepâncias é que o resultado parece depender fundamentalmente do tipo de Cx envolvido na JC, do modelo animal em estudo e do agente causador da lesão. Tanto a localização da JC como o subtipo molecular da Cx envolvida podem ser determinantes no tipo de sinalização, a favor ou contra a morte celular secundária (Perez Velazquez, et al., 2003).

Finalmente, realizamos experimentos com TMA (abridor de JCs) para avaliar se o aumento do acoplamento poderia interferir na morte celular secundária. Após 1 e 2 horas de incubação, os explantes condicionados em TMA liberaram mais LDH do que os controles, embora não tenha sido possível detectar diferenças significativas. Após 4 horas de incubação, esse efeito mostrou-se diminuído, ou seja, tanto o experimental como o controle passaram a liberar a mesma quantidade da enzima. Este dado sugere que a abertura dos canais de JCs, em um primeiro momento, pode aumentar a vulnerabilidade celular. De acordo com nossos resultados obtidos em retinas de pintos lesadas mecanicamente, podemos sugerir que o bloqueio das JCs parece exercer um papel neuroprotetor impedindo que a morte secundária se espalhe para áreas adjacentes à lesão, enquanto que a abertura de JCs não afeta significativamente o processo neurodegenerativo.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicaram uma importante modulação da expressão de Cxs durante a histogênese da retina, indicando a participação do acoplamento celular em processos de proliferação, diferenciação celular e apoptose. As Cxs mais expressas no início do desenvolvimento foram as Cx43 e Cx45. Possivelmente, essas proteínas possuem ações específicas e muito importantes durante a histogênese retiniana. Para esclarecer estas ações, nosso grupo atualmente realiza mais estudos sobre esta questão. As Cx36 e Cx45.6 estavam virtualmente ausentes no início do desenvolvimento, mas apresentaram alta expressão no final do desenvolvimento e no adulto. Esse resultado indica uma possível participação na maturação da retina ou participação nos circuitos neurais. Os experimentos de adaptação ao escuro revelaram que a Cx36 está envolvida na sinalização visual e pode sofrer modulações frente à adaptação ambiental. Observamos uma variação moderada da Cx36 na neurodegeneração, enquanto a Cx43 apresentou alterações de estado fosforilativo, aumento de expressão gênica e protéica. A regulação da expressão destes genes sugere a participação do acoplamento celular em processos neurodegenerativos. Esta regulação diferenciada para as Cxs analisadas pode estar relacionada com a expressão destes genes por tipos celulares específicos da retina ou características específicas do acoplamento provido pelas diferentes Cxs. Bloqueadores de JCs parecem atuar como fármacos neuroprotetores neste modelo de lesão, enquanto que abridores de JCs parecem aumentar o espalhamento da morte celular inicialmente. Entretanto, para confirmarmos esses achados são necessários mais estudos neste sentido para, desta forma, elucidar o papel do acoplamento no espalhamento da morte neuronal secundária e desenvolver novas estratégias de terapia celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Al-Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, Bruzzone R. Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. J Neurosci Res. 2000; 59(6):813-26.

Baldridge WH, Vaney DI, Weiler R. The modulation of intercellular coupling in the retina. Semin Cell Dev Biol. 1998; 9(3):311-8.

Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. Circ Res. 1998; 83(6):629-35.

Becker D, Bonness V, Mobbs P. Cell coupling in the retina: patterns and purpose. Cell Biol Int. 1998; 22(11-12):781-92.

Becker DL, Bonness V, Catsicas M, Mobbs P. Changing patterns of ganglion cell coupling and connexin expression during chick retinal development. J Neurobiol. 2002; 52(4):280-93.

Bennett MV, Barrio LC, Bargiello, TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. Neuron. 1991; 6(3):305-20.

Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca2+ homeostasis and cell death. J Neurochem. 1998; 70(3):958-70.

Bloomfield SA, Xin D. A comparison of receptive-field and tracer-coupling size of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. Vis Neurosci. 1997; 14(6):1153-65.

Bostanci MO, Bagirici F. Anticonvulsive effects of carbenoxolone on penicillin-induced epileptiform activity: an in vivo study. Neuropharmacology. 2007; 52(2):362-7.

Bruzzone R, Ressot C. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. Eur J Neurosci. 1997; 9(1):1-6.

Charles A. Intercellular calcium waves in glia. Glia. 1998; 24(1):39-49.

Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Salinaro Trovato A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F, Cloning of a new gap junction gene Cx36 highly expressed in mammalian brain neurons. Eur J Neurosci. 1998; 10:1202–1208.

Cruciani V, Mikalsen SO. Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes. Biol Chem. 2007; 388(3):253-64.

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Cudeiro J, Rivadulla C. Sight and insight--on the physiological role of nitric oxide in the visual system. Trends Neurosci. 1999; 22(3):109-16.

Cusato K, Bosco A, Rozental R, Guimaraes CA, Reese BE, Linden R, Spray DC. Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. J Neurosci. 2003; 23(16):6413-22.

Dang L, Pulukuri S, Mears AJ, Swaroop A, Reese BE, Sitaramayya A. Connexin 36 in photoreceptor cells: studies on transgenic rod-less and cone-less mouse retinas. Mol Vis. 2004; 10:323-7.

de Pina-Benabou MH, Szostak V, Kyrozis A, Rempe D, Uziel D, Urban-Maldonado M, Benabou S, Spray DC, Federoff HJ, Stanton PK, Rozental R. Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. Stroke. 2005; 36(10):2232-7.

Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. Neuron. 2002; 36(4):703-12.

Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Sohl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, Dermietzel R, Schilling K, De Zeeuw CI, Willecke K. Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. J Comp Neurol. 2004; 473(4):511-25.

Demb JB, Pugh EN. Connexin36 forms synapses essential for night vision. Neuron. 2002; 36(4):551-3.

Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC. Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. Brain Res Rev. 2000; 32(1):45-56.

Dreher Z, Distler C, Dreher B. Vitread proliferation of filamentous processes in avian Muller cells and its putative functional correlates. J Comp Neurol. 1994; 350(1):96-108.

Eysel U. Turning a corner in vision research. Nature. 1999; 399(6737):641-4.

Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Sohl G, Willecke K, Ammermuller J, Weiler R. Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. J Neurosci. 2004; 24(13):3325-34.

Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. J Neurosci. 2001; 21(1):230-9.

Fischer AJ, Stanke JJ, Aloisio G, Hoy H, Stell WK. Heterogeneity of horizontal cells in the chicken retina. J Comp Neurol. 200; 500(6):1154-71.

Froes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(13):7541-46.

Guldenagel M, Sohl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K. Expression patterns of connexin genes in mouse retina. J Comp Neurol. 2000; 425(2):193-201.

Hansen KA, Torborg CL, Elstrott J, Feller MB. Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina. J Comp Neurol. 2005; 493(2):309-20.

Haverkamp S, Wassle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. J Comp Neurol. 2000; 424(1):1-23.

Huang H, Li H, He SG. Identification of connexin 50 and 57 mRNA in A-type horizontal cells of the rabbit retina. Cell Res. 2005; 15(3):207-11.

Huang Y, Grinspan Jb, Abrams Ck, Scherer Ss. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. Glia. 2007; 55:46–56.

Jiang JX, Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. Biochim Biophys Acta. 2005; 1711(2):208-14.

Jiang JX, White TW, Goodenough DA. Changes in connexin expression and distribution during chick lens development. Dev Biol. 1995; 168(2):649-61.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Princípios da Neurociência. USA : McGraw-Hill; 1999. p. 179.

Keilhoff G, Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability in vitro. Neuroreport. 1993; 5(2):129-32.

Kermer P, Klocker N, Bahr M. Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. Cell Tissue Res. 1999; 298(3):383-95.

Kihara AH, Moriscot AS, Ferreira PJ, Hamassaki DE. Protecting RNA in fixed tissue: an alternative method for LCM users. J Neurosci Methods. 2005; 148(2):103-7.

Kihara AH, de Castro LM, Moriscot AS, Hamassaki DE. Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina. J Neurosci Res. 2006a; 83(7):1331-41.

Kihara AH, Tsurumaki AM, Ribeiro-do-Valle LE. Effects of ambient lighting on visual discrimination, forward masking and attentional facilitation. Neurosci Lett. 2006b; 393(1):36-9.

Kihara AH, Santos TO, Paschon V, Matos RJ, Britto LR. Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina. Neuroscience. 2007; 151(4):995-1005.

Kihara AH, Paschon V, Akamine PS, Saito KC, Leonelli M, Jiang JX, Hamassaki DE, Britto LR. Differential expression of connexins during histogenesis of the chick retina. Dev Neurobiol. 2008; 68(11):1287-302.

Kihara AH, Paschon V, Cardoso CM, Higa GSV, Castro LM, Hamassaki DE, Britto LRG. Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in an essentially rodless retina. J Comp Neurol. 2009; 512(5):651-63.

Kleopa KA, Yum SW, Scherer SS. Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. J Neurosci Res. 2002; 68(5):522-34.

Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. Cell. 1996; 84(3):381-8.

Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. Arch Biochem Biophys. 2000; 384(2):205-15.

Li WE, Ochalski PA, Hertzberg EL, Nagy JI. Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. Eur J Neurosci. 1998; 10(7):2444-63.

Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. Nat Neurosci. 1998; 1(6):494-500.

Lo CW. The role of gap junction membrane channels in development. J Bioenerg Biomembr. 1996; 28(4):379-85.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. Physiol Rev. 1981; 61(4):829-913.

Lynch DR, Dawson TM Secondary mechanisms in neuronal trauma. Curr Opin Neurol. 1994; 7(6):510-16.

Martins RA, Pearson RA. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. Brain Res. 2008; 1192:37-60.

Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. Neuroscience. 2003; 119(3):689-700.

Mills SL, Massey SC. Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. Nature.1995; 377(6551):734-7.

Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. J Cell Biol. 1990; 111(5 Pt 1):2077-88.

Nagy JI, Rash JE. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. Cell Commun Adhes. 2003; 10(4-6):401-6.

Nakase T, Fushiki S, Naus CC. Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. Stroke. 2003; 34(8):1987-93.

Naus CC, Bani-Yaghoub M. Gap junctional communication in the developing central nervous system. Cell Biol Int. 1998; 22(11-12):751-63.

Nemani VM, Binder DK. Emerging role of gap junctions in epilepsy. Histol Histopathol. 2005; 20(1):253-9.

Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, Oguro N, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. J Neurosci. 2001; 21(19):7534-42.

Orellana JA, Saez PJ, Shoji KF, Schalper KA, Palacios-Prado N, Velarde V, Giaume C, Bennett MV, Saez JC. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. Antioxid Redox Signal. 2009; 11(2):369-99.

Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS. Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. J Mol Neurosci. 2008; 35(1):101-16.

Ozog MA, Siushansian R, Naus CC. Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. J Neuropathol Exp Neurol. 2002; 61(2):132-41.

Pearson RA, Catsicas M, Becker DL, Bayley P, Luneborg NL, Mobbs P. Ca(2+) signalling and gap junction coupling within and between pigment epithelium and neural retina in the developing chick. Eur J Neurosci. 2004; 19(9):2435-45.

Pearson RA, Luneborg NL, Becker DL, Mobbs P. Gap junctions modulate interkinetic nuclear movement in retinal progenitor cells. J Neurosci. 2005; 25(46):10803-14.

Perez Velazquez JL, Frantseva MV, Naus CC. Gap junctions and neuronal injury: protectants or executioners? Neuroscientist. 2003; 9(1):5-9.

Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez R, Ramirez G. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. Eur J Neurosci. 1991; 3(11):1187.

Raviola E, Gilula NB. Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70(6):1677-81.

Rawanduzy A, Hansen A, Hansen TW, Nedergaard M. Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. J Neurosurg. 1997; 87(6):916-20.

Roerig B, Feller MB. Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. Brain Res Rev. 2000; 32(1):86-114.

Rozental R, Giaume C, Spray DC. Gap junctions in the nervous system. Brain Res Rev. 2000; 32(1):11-5.

Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MVL. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. Proc. Natl. Acad. Sci.1989; 86:2708-2712.

Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. Circ Res. 2000; 86(7):723-8.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem. 2000; 285(2):194-204.

Schutte M, Chen S, Buku A, Wolosin JM. Connexin50, a gap junction protein of macrogliaP6n the mammalian retina and visual pathway. Exp Eye Res. 1998; 66(5):605-13.

Shestopalov VI, Panchin Y. Pannexins and gap junction protein diversity. Cell Mol Life Sci. 2008; 65(3):376-94.

Sohl G, Degen J, Teubner B, Willecke K. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. FEBS Lett. 1998; 428(1-2):27-31.

Sterling P. Vision. Tuning retinal circuits. Nature. 1995; 377(6551):676-7.

Striedinger K, Petrasch-Parwez E, Zoidl G, Napirei M, Meier C, Eysel UT, Dermietzel R. Loss of connexin36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss. Eur J Neurosci. 2005; 22(3):605-16.

Theis M, Sohl G, Eiberger J, Willecke K. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. Trends Neurosci. 2005; 28(4):188-95.

Thoreson WB, Witkovsky P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. Prog Retin Eye Res. 1999; 18(6):765-810.

Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P. Microcircuits for night vision in mouse retina. J Neurosci. 2001; 21(21):8616-23.

Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. Nature. 1980; 283(5747):545-9.

Vaney DI. Retinal neurons: cell types and coupled networks. Prog Brain Res. 2002; 136:239-54.

Wassle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. Physiol Rev. 1991; 71(2):447-80.

Weiler R, Akopian A. Effects of background illuminations on the receptive field size of horizontal cells in the turtle retina are mediated by dopamine. Neurosci Lett. 1992; 140(1):121-124.

Weiler R, He S, Vaney DI. Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. Eur J Neurosci. 1999; 11(9):3346-50.

White TW, Bruzzone R, Goodenough DA, Paul DL. Voltage gating of connexins. Nature. 1994; 371(6494):208-9.

White TW, Goodenough DA, Paul DL. Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. J Cell Biol. 1998; 143(3):815-25.

Yang XL, Wu SM. Modulation of rod-cone coupling by light. Science. 1989; 244(4902):352-4.

Yeager M, Nicholson BJ Structure of gap junction intercellular channels. Curr Opin Struct Biol. 1996; 6(2):183-92.

Yin X, Gu S, Jiang JX. The development-associated cleavage of lens connexin 45.6 by caspase-3-like protease is regulated by casein kinase II-mediated phosphorylation. J Biol Chem. 2001; 276(37):34567-72.

Zahs KR, Kofuji P, Meier C, Dermietzel R. Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. J Comp Neurol. 2003; 455(4):531-46.

Zhou L, Chen T, Church RL. Temporal expression of three mouse lens fiber cell membrane protein genes during early development. Mol Vis. 2002; 8:143-8.

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. Fundamental Neuroscience. San Diego: Academic Press; 1999. p. 317-26.

ANEXO A

Artigo publicado no J. Neurofisiology. “*Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina*” de autoria de Kihara, Santos, Paschon, Matos, Britto (2007).

ANEXO B

Artigo publicado no Developmental Neurobiology. “*Differential expression of connexins during histogenesis of the chick retina*” de autoria de Kihara, Paschon, Akamine, Saito, Leonelli, Jiang, Hamassaki, Britto (2008).

ANEXO C

Artigo publicado no J. Comparative Neurology. “*Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in an essentially rodless retina*” de autoria de Kihara, Paschon, Cardoso, Higa, Castro, Hamassaki, Britto (2009).