KALLENE SUMMER MOREIRA VIDAL

PROTEÍNAS ESTRUTURAIS EM RETINAS HUMANA E MURINA

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

São Paulo
2014

KALLENE SUMMER MOREIRA VIDAL

PROTEÍNAS ESTRUTURAIS EM RETINAS HUMANA E MURINA

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Vidal, Kallene Summer Moreira.

Proteínas estruturais em retinas humana e murina / Kallene Summer
Moreira Vidal. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de
concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Visão, glaucoma,
morfologia da retina, imuno-histoquímica, psicofísica, eletrofisiologia,
tomografia de coerência óptica.

Versão do título para o inglês: Structural proteins in human and
murine retina.

1. Neurofilamentos (NFs) 2. Proteína associada ao microtúbulo do tipo
2 (MAP-2) 3. Células ganglionares 4. Neurodegeneração retrógrada
5. Retina humana 6. Retina murina I. Britto, Prof. Dr. Luiz Roberto
Giorgetti de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III.
Título.

ICB/SBIB0107/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kallene Summer Moreira Vidal.

Título da Tese: Proteínas estruturais em retinas humana e murina.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH. 022/2010

DECLARAÇÃO

Declaro que o relatório Parcial apresentado pela pesquisadora **Kallene Summer Moreira Vidal**, referente ao projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Neurotransmissores em Retina Humana*", foi analisado e considerado satisfatório por esta Comissão, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

São Paulo, 08 de março de 2010.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **062** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luiz Roberto Giorgetti de Britto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Alterações morfofuncionais em retinas de camundongos com lesão eletrolítica do colículo superior*" do qual participam o(s) **Kallene Summer Moreira Vidal, Cecília Cerqueira Café Mendes, Marina Sorrentino Hernandez**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **30.05.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 31 de maio de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais:,
Jonatas e Rosemere, e a minha irmã,
Lorennna, que são meu alicerce.

E ao meu companheiro, Andre Brunoni, o
grande pilar da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Uma vez li em um livro que nos momentos mais críticos da vida como o nascimento e a morte, estamos sozinhos. Mas felizmente, durante nossa trajetória, somos agraciados pela companhia de pessoas que nos ajudam e se tornam inesquecíveis. Aqui gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Britto, por ter me proporcionado esta grande oportunidade que contribuiu significativamente para o meu crescimento profissional, e principalmente por ter compreendido a minha "vida dupla", com os olhos na clínica e as mãos na bancada.

Ao meu marido, André Brunoni, por respeitar as minhas escolhas incondicionalmente, e por suas importantes sugestões nas análises estatísticas.

À minha irmã, Lorena Vidal, que mesmo longe estava sempre disposta a ajudar e ouvir minhas crises existenciais.

À amiga querida, Cecília Café, pela ajuda nos experimentos com os animais e principalmente pela sua amizade honesta, na alegria ou na tristeza.

À amiga Caroline Real, por ajudar no que eu sempre precisei e pela sua amizade sincera.

Ao amigo Adilson Alves, que me acompanhou desde o início e me ajudou em todas etapas desta longa caminhada com a alegria mais contagiante que já conheci.

À Profa. e amiga Alice Cristina, pela sua preciosa contribuição durante a realização do PCR.

À Marina Hernandez, pela sua amizade e pela ajuda na discussão dos resultados.

Ao Prof. Alexandre Kihara e seu time de ouro, Guilherme, Verinha e Érica, pelas colaborações realizadas.

À Profa. Elizabeth Yamada, por ter despertado em mim o amor pela ciência básica.

Ao grupo do Laboratório de Neuropatologia Experimental da UFPA, pela colaboração com o estudo sobre retina humana.

Ao amigo João Paulo por me ensinar a dissecar uma retina como ninguém.

Ao amigo, Anderson pelas valiosas lições "Karatê Kid" durante a iniciação científica.

Aos amigos de ontem e hoje do laboratório de Neurobiologia Celular e laboratório de Comunicação Neuronal, Profa. Andrea, Mauro, Rosana, Gabriela, Priscila, Ana, Taísa, Fernanda, Débora e Lívia, pelo companheirismo e a disponibilidade em ajudar.

A todos os colegas e amigos da fisiologia, em especial à dupla infalível da secretaria de pós-graduação, Zé Maria e Paloma, por me socorrer durante todas as dúvidas burocráticas.

Aos animais, os quais propiciaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos doadores de retina humana, que mesmo sem saberem, fizeram de suas mortes um significado para estudar a vida.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo."

Albert Einstein

RESUMO

Vidal KSM. Proteínas estruturais em retinas humana e murina. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Alterações nas proteínas estruturais como neurofilamentos (NFs) e proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs) estão relacionadas ao dano neuronal em diferentes modelos experimentais de glaucoma, principalmente com aumento da pressão intraocular (PIO). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi descrever a distribuição dos NFs e da proteína associada ao microtúbulo do tipo 2 (MAP-2) em retinas humanas de doador-cadáver sem patologias, e em retinas murinas de um modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares da retina (RGCs). Além disso, avaliamos a viabilidade deste modelo como modelo de degeneração de RGCs sem interferência do aumento da PIO. Para isso, usamos camundongos C57BL/6, machos, que foram submetidos à cirurgia estereotáxica através da qual foi realizada uma lesão eletrolítica somente no lado direito do colículo superior; assim, o olho esquerdo constituiu o grupo “experimental” e o olho direito, o grupo “controle”. Também foram utilizadas retinas de animais que não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico, formando o grupo “branco”. Os grupos foram avaliados 7, 15 e 45 dias após a lesão no colículo superior. A caracterização de NFs em retinas humanas e murinas foi feita através de ensaios de imuno-histoquímica e PCR em tempo real, enquanto que para o MAP-2 somente foi realizada imuno-histoquímica na retina humana e ambas as técnicas nas retinas murinas. Os resultados obtidos revelaram que os NFs e MAP-2 estão presentes nas células ganglionares do tipo M na retina humana. No modelo animal, através da análise de imuno-histoquímica, observou-se que os NFs estão diminuídos no grupo experimental quando comparados ao grupo branco principalmente após 45 dias da lesão, e o MAP-2 está aumentado principalmente no 15º dia de lesão. Já a análise utilizando PCR em tempo real mostrou um aumento da expressão dos NFs do grupo experimental em relação ao branco e diminuição da expressão de MAP-2. Além disso, ocorreu uma diminuição da espessura das retinas do grupo experimental em todos os tempos de lesão, no entanto, só houve perda celular no 45º dia de lesão, e esta perda foi mais evidente na periferia da retina. Assim, podemos concluir que neste modelo experimental ocorrem alterações na expressão do RNA mensageiro e nos níveis de proteína dos NFs e do MAP-2 antes da morte das RGCs nas retinas estudadas. Por último, os resultados obtidos com os NFs e MAP-2 neste modelo animal podem ser extrapolados para os seres humanos, uma vez que essas proteínas estão presentes em um tipo de RGCs que são inicialmente afetadas no glaucoma.

Palavras-chave: Neurofilamentos. Proteínas associadas ao microtúbulo do tipo 2. Retina humana. Retina murina. Células ganglionares. Neurodegeneração retrógrada.

ABSTRACT

Vidal KSM. Structural Proteins in human and murine retina. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The structural proteins like neurofilaments (NFs) and proteins associated with microtubules (MAPs) are affected by different types of neuronal damage seen with experimental models of glaucoma, mainly by those associated with increase of the intraocular pressure (IOP). This study aimed to describe the distribution of NFs and type 2 protein associated with microtubule (MAP-2) in dead-donor human retinas and to study the distribution of these proteins in a model of retrograde retinal ganglion cell (RGCs) degeneration in murine retina induced by an electrolytic lesion within the superior colliculus. Moreover, we aimed to evaluate the viability of this experimental model without the interference of an increased IOP. To achieve this, we submitted male C57bl/6 mice to a stereotaxic surgery for superior colliculus electrolytic lesion only in the right side; therefore, the left eye was used for the experimental group and the right eye for the control group. Also, retinas of male mice that were not submitted to any procedure were used as a second control group, which was called naïve group. The groups were evaluated 7, 15 and 45 days after the superior colliculus lesion. The characterization of the NFs in the human and murine retina was obtained through immunohistochemical essays and real-time PCR; for MAP-2, only immunohistochemical essays were performed for human retina, while both techniques were performed for the murine retina. The results revealed that both NFs and MAP-2 are present in the ganglion cell M in the human retina. In the experimental animal model the immunohistochemical essays demonstrated decrease of NFs in the experimental group when compared to the naïve group, mainly after 45 days post lesion; however, MAP-2 was increased after 15 days post lesion. The real-time PCR analysis demonstrated increased NFs and decreased MAP-2 expression when compared to the naïve group. Besides, there was a decrease of the retina thickness in the experimental group in every time point analyzed. Cellular loss, however, was only observed after 45 days post lesion and this loss was more evident in peripheral retina. Hence, we can conclude that there was variation of mRNA expression and structural protein levels before the loss of RGCs with experimental group retina. Lastly, the results related to NFs and MAP-2 in this experimental animal model can be extrapolated to humans, as these proteins are also present in the human RGCs that are affected early in glaucoma.

Keywords: Neurofilaments. Proteins associated to microtubules type 2. Human retina. Murine retina. Ganglion cell. Retrograde neurodegeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem das camadas da retina central humana	24
Figura 2 - Imagem ilustrando um de fundo de olho normal	26
Figura 3 - Vias visuais centrais em humanos.....	27
Figura 4 - Proteínas Estruturais.....	32
Figura 5 - Desenho esquemático com do modelo de lesão retrógrada no colículo superior.....	42
Figura 6 - Esquema ilustrativo das regiões utilizadas para o cálculo da densidade de células ganglionares nas retinas murinas	45
Figura 7 - Montagem plana de retina humana marcada para neurofilamentos (PAN)	51
Figura 8 - Distribuição da marcação com neurofilamentos (PAN) em cortes verticais de retina humana.....	52
Figura 9 - Densidade de células marcadas com neurofilamentos (PAN) na camada	52
Figura 10 - Distribuição da marcação com NF-L em cortes verticais de retina humana.....	53
Figura 11 - Distribuição da marcação com NF-H em cortes verticais de retina humana.....	54
Figura 12 - Expressão relativa do RNAm NF-L (A), NF-M (B) e NF-H (c) na região periférica e central da retina humana	55
Figura 13 - Padrão de expressão dos neurofilamentos na retina humana central e periférica	56
Figura 14 - Montagem plana de retina humana marcadas com MAP-2	57
Figura 15 - Densidade de células marcadas com MAP-2 na camada de células ganglionares	58
Figura 16 - Distribuição de MAP-2 em cortes verticais na retina humana.....	59
Figura 17 - Marcação para o PAN em cortes verticais na retina de camundongos do modelo de degeneração retrógrada.....	61
Figura 18 - Gráfico da quantificação do PAN na imuno-histoquímica 7, 15 e 45 dias após a lesão no colículo superior	62

Figura 19 - Marcação para MAP-2 em cortes verticais na retina de camundongos do modelo de degeneração retrógrada.....	63
Figura 20 - Gráfico da quantificação do PAN na imuno-histoquímica 7, 15 e 45 dias após a lesão no colículo superior	64
Figura 21 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-H em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior.....	66
Figura 22 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-M em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior.....	66
Figura 23 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-L em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior.....	67
Figura 24 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do MAP-2 em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior.....	68
Figura 25 - Espessura da retina após 7 dias da lesão no colículo superior	69
Figura 26 - Espessura da retina após 15 dias da lesão no colículo superior.....	70
Figura 27 - Espessura da retina após 45 dias da lesão no colículo superior.....	71
Figura 28 - Densidade celular na periferia da retina murina após 7,15 e 45 dias da lesão no colículo superior	72
Figura 29 - Densidade celular no centro da retina murina após 7,15 e 45 dias da lesão no colículo superior.....	73
Figura 30 - Comparação entre a densidade celular no centro e periferia da retina murina após 45 dias de lesão no colículo superior.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das amostras dos doadores de retina humana coletadas pelo CNCDO	40
Tabela 2 - Descrição dos primers e anticorpos usados no PCR em tempo real na retina humana	48
Tabela 3 - Descrição dos primers e anticorpos usados no PCR em tempo real na retina de camundongos	48
Tabela 4 - Dados morfológicos das células ganglionares observadas por marcação imuno-histoquímica para neurofilamentos (PAN) na região central e periférica da retina em montagem plana	51
Tabela 5 - Dados morfológicos das células ganglionares observadas por marcação imuno-histoquímica para MAP-2 na região central e periférica da retina em montagem plana	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RGCs	Células ganglionares da retina, do inglês <i>Retinal ganglion cell</i>
NFs	Neurofilamentos
MAP	Proteínas associadas ao microtúbulo
PCR	Do inglês, <i>Polimerase change reaction</i>
qPCR	Do inglês, <i>quantitative polimerase change reaction</i>
PIO	Pressão intra-ocular
ONL	Camada nuclear externa ,do inglês, <i>outer nuclear layer</i> ,
OPL	Camada plexiforme externa ,do inglês, <i>outer plexiform layer</i>
INL	Camada nuclear interna do inglês, <i>inner nuclear layer</i>
IPL	Camada plexiforme interna, do inglês, <i>inner plexiform layer</i>
GCL	Camada de células ganglionares, do inglês, <i>ganglion cell layer</i>
NFL	Camada das fibras do nervo óptico , do inglês, <i>nerve fiber layer</i>
GPN	Glaucoma de pressão normal
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
CNCDO	Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos do Estado do Pará
PFA	Paraformaldeído
ABC	complexo avidina-biotina
UBC	ubiquitina C
SDHA	complexo de succinato de desidrogenase, subunidade A e flavoproteína
cDNA	Do inglês, <i>complemetary DNA</i>
NF-L	Neurofilamento de baixo peso molecular
NF-M	Neurofilamento de médio peso molecular
NF-H	Neurofilamento de alto peso molecular
PAN	Anticorpo que reconhece os três tipos de neurofilamentos
MAP-2	Proteína associada ao microtúbulo do tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

2 μ A	Microampère
12 μ m	Micrômetro
kD	Kilodalton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivo específico	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Morfologia da retina e vias visuais	22
3.1.1 Morfologia da retina	22
3.1.2 Vias visuais	26
3.2 Células ganglionares	28
3.3 Proteínas estruturais	31
3.3.1 Neurofilamentos	32
3.3.2 Microtúbulos	34
3.4 Estudo da retina em modelos animais	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Coleta da retina humana	39
4.2 Modelo animal de degeneração retrógrada de células ganglionares por lesão eletrolítica no colículo superior	41
4.4 Aquisição da imagem e quantificação	44
4.4.1 Retinas humanas	44
4.4.2 Retinas de camundongos	44
4.5 Extração do RNA	46
4.6 PCR em tempo real	47
4.7 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Retinas humanas	50
5.1.1 Neurofilamentos	50
5.1.2 MAP - 2	56
5.2 Retinas murinas	60
5.2.1. Imuno-histoquímica	60
5.2.1.1 Neurofilamentos	60
5.2.1.2 MAP-2	62
5.2.2 PCR em tempo real	65

5.2.2.1 Neurofilamentos	65
5.2.2.2 MAP-2	67
5.2.3 <i>Modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares por lesão eletrolítica do colículo superior</i>	68
6 DISCUSSÃO	75
6.1 Modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares	75
6.2 O olho ipsolateral à lesão: um bom controle?	77
6.3 Proteínas estruturais na retina humana	78
6.4 Proteínas estruturais na retina murina	82
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE	99

1 INTRODUÇÃO

As proteínas estruturais têm papel fundamental na formação do citoesqueleto dos axônios de células ganglionares na retina (RGCs), sendo compostas principalmente pelos neurofilamentos (NFs) e proteínas associada ao microtúbulo (Maps). Elas são responsáveis por manter a integridade do transporte axonal através do nervo óptico¹.

Distúrbios no transporte axonal podem levar à morte destas células e degeneração dos axônios no glaucoma¹, que é a segunda causa de cegueira irreversível no mundo².

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da fisiopatologia do glaucoma. Contudo, suas diferentes metodologias dificultam a interpretação dos resultados. Por exemplo, a maioria dos modelos envolve o aumento da pressão intra-ocular (PIO) como mecanismo de lesão³⁻⁶, apesar do aumento da PIO ser o mais importante dos fatores de risco para o desenvolvimento e progressão glaucomatosa, ele continua sendo apenas um fator de risco e não é a doença em si⁷. Além disso, existem outros fatores, como predisposição genética para alterações estruturais no disco óptico, deficiência no suporte nutricional nos axônios no nervo óptico, idade, raça, história familiar entre outros^{1,8-11}.

Outros modelos experimentais de neuropatia óptica que não envolvem o aumento da PIO, geralmente causam uma morte das RGCs de forma rápida^{12,13}, dificultando o estudo dos eventos que culminam para esta degeneração. Além do que na prática clínica, sabemos que a progressão do dano glaucomatoso sem a interferência da PIO ocorre de forma crônica e sem prejuízos visuais precoces, dificultando ainda mais o seu diagnóstico e tratamento^{9,14}.

Recentemente, estudos mostram que alterações nos NFs e MAPs estão envolvidas nos danos neuronais em diferentes modelos de glaucoma^{4-6,15,16}. Mudanças nestas proteínas podem preceder alterações estruturais envolvidas na fisiopatologia do glaucoma, como transtornos no transporte axonal⁴, o que pode levar à morte de células ganglionares⁵. Dada às inerentes dificuldades de se obter a retina humana em boas condições para a realização de ensaios imuno-histoquímicos, a caracterização dos NFs nas diferentes células da retina humana é

controversa^{17,18}. Em relação ao MAP-2, sua distribuição na retina humana ainda não foi caracterizada.

Portanto, conhecer a distribuição destas proteínas na retina humana é essencial para se definir o padrão de normalidade. Isto permite fazer uma correlação entre achados em modelos animais e humanos.

Além disso, este estudo destaca-se pela sua abordagem translacional para compreender o envolvimento das NFs e MAP na degeneração de células ganglionares em modelo experimental que não envolva o aumento da PIO, já descrito em outros modelos^{4-6,15,16}.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é avaliar a distribuição de NFs e MAPs através de ensaios imuno-histoquímicos e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) em retinas humana e de camundongo, provenientes de um modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares.

2.2 Objetivo específico

Avaliar a viabilidade do modelo murino de neuropatia óptica induzida retrogradamente por lesão eletrolítica no colículo superior através da análise da espessura retiniana e da densidade das células ganglionares em diferentes tempos após a lesão.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Morfologia da retina e vias visuais

3.1.1 Morfologia da retina

A retina é a porção do olho que, quando estimulada pela luz, gera sinais que são processados no córtex cerebral e em seguida dão origem à percepção visual^{19,20}.

Esta estrutura é constituída morfologicamente por dez camadas assim chamadas: camada pigmentar composta pelo epitélio pigmentar, camada de fotorreceptores formada pelos segmentos externos de cones e bastonetes, membrana limitante externa, camada nuclear externa (ONL, do inglês, *outer nuclear layer*), camada plexiforme externa (OPL, do inglês, *outer plexiform layer*), camada nuclear interna (INL, do inglês, *inner nuclear layer*), camada plexiforme interna (IPL, do inglês, *inner plexiform layer*), camada ganglionar (GCL, do inglês, *ganglion cell layer*), camada das fibras do nervo óptico (NFL, do inglês, *nerve fiber layer*) e membrana limitante externa (**Figura 1A**)^{19,20}.

A ONL é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores, a INL pelos corpos celulares das células bipolares, amácrinas e horizontais e ganglionares deslocadas. Já a GCL constitui-se de corpos celulares das células amácrinas deslocadas e ganglionares (**Figura 1B**)²¹.

Nas camadas plexiformes são encontradas conexões sinápticas em grande densidade entre os diversos tipos celulares; a OPL, por exemplo, possui prolongamentos dos fotorreceptores, células bipolares e horizontais enquanto que a IPL é composta pelas arborizações axonais de células bipolares e amácrinas e seus alvos sinápticos, os dendritos de células ganglionares (**Figura 1B**). Esta camada é dividida em sublamina *OFF* ou “a”, composta pelos estratos 1 e 2; e sublamina *ON* ou “b”, formada pelo estratos 3, 4 e 5²¹.

Além dos tipos neuronais que formam as camadas da retina, há também as células de Müller, células gliais radiais que abrangem toda a profundidade da retina neural e representam o principal tipo de células da glia presente na retina de todas as espécies de vertebrados. As células de Müller atuam sustentando, nutrindo e

isolando os neurônios da retina, bem como interferindo na comunicação entre as camadas plexiforme externa e plexiforme interna (**Figura 1B**)²².

A principal via de informação intra-retiniana começa nos fotorreceptores, passa pelos neurônios bipolares, que por sua vez, estabelecem contato com as células ganglionares (RGCs). As RGCs são responsáveis por enviar a informação neural através de seus axônios que formam a camada de fibras do nervo óptico (**Figura 1B**). Desmielinizados em sua porção retiniana, os axônios das RGCs convergem no disco óptico^{20,23}.

Essa via direta de informação na retina pode ser modulada em dois níveis diferentes. No primeiro nível, as sinapses entre os fotorreceptores e os neurônios bipolares são moduladas pelas células horizontais na OPL. Na próxima estação sináptica, a transferência de informação entre as células bipolares e as células ganglionares é modulada pelas células amácrinas na IPL (**Figura 1B**)²³.

O epitélio pigmentar (**Figura 1B**) está localizado abaixo da camada de fotorreceptores, e tem a função de impedir a dispersão de fótons que não tenham sido capturados pelos fotorreceptores. Esse epitélio tem várias outras funções de suporte para a retina: é parte integrante de uma barreira hemato-retiniana, e junto com a membrana de Brush promove seletividade no controle do transporte de íons, nutrientes e metabólitos entre a retina e os capilares fenestrados da coróide²⁴.

Ele também desempenha um papel importante na função do ciclo visual, reciclando enzimas que participam no processo de fototransdução no segmento externo dos fotorreceptores²⁵.

Além das funções citadas acima, o epitélio pigmentar é ainda responsável por renovar a porção apical dos segmentos externos dos fotorreceptores que são danificados por meio da fotoxidação de lipídeos e lipoproteínas²⁴.

Figura 1 - Imagem das camadas da retina central humana

Legenda: (A) Secção histológica vertical da retina central humana visualizada por microscopia óptica (ONL, do inglês, *outer nuclear layer*; OPL, do inglês, *outer plexiform layer*; INL, do inglês, *inner nuclear layer*; IPL, do inglês, *inner plexiform layer*; GCL, do inglês, *ganglion cell layer*). (B) Desenho esquemático dos diferentes tipos celulares encontrados na retina.

Fonte: <<http://webvision.med.utah.edu>>

Na região central da retina, é possível notar uma estrutura de tonalidade amarelada, avascular, denominada de mácula lútea, estrutura facilmente visualizada durante o exame oftalmológico de fundo de olho. A mácula lútea possui uma concavidade denominada de fóvea, onde as imagens são focalizadas com maior nitidez ou acuidade e é composta histologicamente apenas por cones (**Figura 2**)²⁶.

Em termos de densidades das diferentes populações de fotorreceptores na retina humana, a densidade de cones é mais elevada na região foveal e decresce rapidamente na retina periférica, enquanto que os bastonetes apresentam picos de densidade nas regiões temporal e nasal próximas à fóvea e decrescem de forma progressiva em direção à periferia²⁶.

Os cones detectam luz de faixas estreitas de comprimento de onda, possibilitando a visão de cores. Na fóvea, eles fazem sinapses com poucas células bipolares situadas na borda da mácula, e estas se conectam a uma ou poucas células ganglionares. Sendo assim, as fibras do nervo óptico que conduzem a informação proveniente da fóvea formam linhas exclusivas de transmissão de sinais,

muitas vezes correspondentes a um único cone. Esta organização proporciona ao sistema visual uma baixa sensibilidade à intensidade de luz e excelente discriminação de formas²⁷.

Já na retina periférica, vários bastonetes se conectam a poucas células bipolares na OPL. Em seguida, os sinais são transmitidos para a etapa seguinte de processamento na IPL onde ocorre divergência para vários tipos de células amácrinas que, por sua vez, convergem para as células ganglionares. Desta forma, cada fibra óptica veicula informações de uma grande área retiniana, coberta por vários bastonetes. Isso permite que o sistema visual seja sensível a um único quantum de luz e com alta sensibilidade à intensidade luminosa. No entanto, a convergência dos circuitos celulares da via dos bastonetes é desfavorável à visão precisa de detalhes²⁷.

Ao lado direito da mácula, observa-se outra estrutura importante, o disco óptico, que corresponde ao local de convergência dos axônios das células ganglionares. O disco é a porção do nervo óptico visível durante o exame oftalmológico, e no seu centro, emergem os principais vasos sanguíneos da retina. Esta região é desprovida de fotorreceptores, e se trata, portanto, de um ponto cego. **(Figura 2)**²⁶.

A avaliação do disco óptico é de extrema importância para detecção de doenças como glaucoma, que é uma neuropatia óptica crônica e progressiva, caracterizada por alterações típicas no disco óptico e da NFL, e na maioria das vezes, acompanhada de pressões intra-oculares acima de níveis considerados estatisticamente normais¹.

Entretanto, em alguns casos de glaucoma, não há evidências do aumento da pressão intra-ocular (PIO), e este tipo é conhecido como glaucoma de pressão normal (GPN). Nestes casos, os sinais clínicos são identificados apenas nos estágios mais avançados na doença, tornando o tratamento do GPN um desafio maior do que o tratamento de glaucoma hipertensivo²⁸. Em ambos os casos, as alterações do disco óptico e da NFL constituem o sinal mais precoce na detecção da doença⁷.

Figura 2 - Imagem ilustrando um de fundo de olho normal

Legenda: Observa-se a fóvea na região temporal (à esquerda da imagem) e o nervo óptico na região nasal da retina (à direita da imagem).

Fonte: Kolb, 1992²⁶.

3.1.2 Vias visuais

Do disco óptico de ambos os olhos emergem os nervos ópticos (II par de nervos cranianos) que a partir deste ponto passam a ser mielinizados, seguindo em direção à linha média, onde decussam em uma região denominada quiasma óptico, assim formando os tratos ópticos¹² (**Figura 3**).

Em seres humanos, cerca de 60% das fibras do nervo óptico decussam alcançando alvos contralaterais, enquanto 40% permanecem ipsolaterais²⁹. Já em roedores, 95% das projeções da retina convergem no quiasma óptico, enquanto apenas 5% permanecem ipsolaterais³⁰.

Após o cruzamento no quiasma, o primeiro alvo das fibras do trato óptico é o núcleo supra-quiasmático, que possui um importante papel na regulação de ritmos circadianos³¹.

Outros alvos são o núcleo geniculado lateral (tálamo), localizado no diencefalo e que emite axônios para o córtex visual primário (radiação óptica); os núcleos pré-tectais, que emitem axônios para os núcleos dos nervos cranianos,

responsáveis pelos reflexos oculomotores, como por exemplo, acomodação e reflexo pupilar; e o colículo superior, que emite axônios para os núcleos motores do tronco encefálico e medula espinhal, sendo responsável pelos reflexos de orientação dos olhos, cabeça e do corpo em relação aos estímulos visuais (**Figura 3**)^{27,29}.

Figura 3 - Vias visuais centrais em humanos

Legenda: Esquema ilustrando as vias visuais centrais em humanos com as indicações das projeções retinofugas e seus alvos no sistema nervoso central.

Fonte : Modificado de Lent, (2001)²⁷.

No corpo geniculado lateral, os axônios das células ganglionares fazem conexão definindo três vias principais de processamento, que são a magnocelular, parvocelular e koniocelular. Cerca de 80% das RGCs conectam-se à via parvocelular, 10% à via magnocelular³² e 9% a 10% à via koniocelular³³.

O corpo geniculado lateral apresenta seis camadas, sendo as duas ventrais magnocelulares, as quatro dorsais parvocelulares e as camadas intermediárias koniocelulares. Foram identificadas células koniocelulares também dentro das camadas parvo e magnocelulares^{34,35}.

A via parvocelular possui células sensíveis ao canal de oposição vermelho/verde, alta resolução espacial e baixa sensibilidade ao contraste e ao movimento. A via magnocelular possui células sensíveis ao movimento, baixa resolução espacial e alta sensibilidade ao contraste luminoso. A via koniocelular

possui células sensíveis ao canal de oposição azul/amarelo, resolução espacial intermediária e alta resolução ao estímulo em movimento^{36,37}.

3.2 Células ganglionares

As células ganglionares, em sua maioria, são as células de maior diâmetro na retina. Apresentam axônios de largo calibre, capazes de transmitir sinais em formas de picos sucessivos para outras regiões do sistema nervoso central. O nervo óptico reúne todos os axônios das células ganglionares e esse conjunto de mais de um milhão de fibras (nos seres humanos) transmite essas informações para a próxima estação no cérebro, integrando todos os canais de processamento da informação visual²⁶.

Nos anos 40, Polyak (1941) produziu uma descrição fenomenal da retina dos primatas através de neurônios impregnados pelo método de Golgi, fornecendo uma boa classificação os tipos de células ganglionares³⁸. Então, pelos anos 60, já havia uma razoável descrição e classificação das células ganglionares das retinas de mamíferos. No entanto, toda essa informação era baseada em células ganglionares marcadas em secções verticais^{38,39}.

O advento da montagem plana com a retina inteira, usando o método de marcação de Golgi, permitiu a reinterpretação de muitas das classificações anteriores, já que com esse método é possível visualizar toda arvore dendrítica das células ganglionares²⁶. Além disso, esta técnica permitiu comparações às imagens feitas com células ganglionares marcadas por injeção intracelular⁴⁰.

Existem pelo menos 18 tipos morfológicos de células ganglionares na retina humana²⁶. A via neuronal para percepção de cor, forma e movimento nas retinas de primatas se origina em pelo menos duas células ganglionares, as células *midget* e *parasol*⁴⁰. De acordo com Kolb et al. (1992), essas células também são chamadas de células ganglionares P e M, respectivamente²⁶.

Polyak (1941) foi o primeiro a descrever as células ganglionares *midget* e considerar que elas representam a maioria das células ganglionares na retina central de macacos e humanos³⁸. Estudos com marcação retrógrada indicam que esses neurônios compreendem 80% da população de células ganglionares que formam as vias projetadas para as camadas parvocelulares do núcleo geniculado lateral em macacos³².

As células ganglionares *midget* são claramente as células com a menor árvore dendrítica e quase nunca ultrapassa o diâmetro de seus corpos celulares, que mede de 9 a 12 μm ³⁸. De acordo com Kolb et al. (1992), está claro que as células na fóvea se enquadram nesse critério. No entanto, fora da fóvea e depois de 3 mm de excentricidade, as células *midgets* podem ter árvores dendríticas maiores, até 100 μm ^{26,41-43}.

Com relação às células M, existe uma concordância geral que as células ganglionares que se projetam para camada magnocelular são as células *parasol*, descritas Polyak (1941)^{38, 41, 42}. Assim como as células gigantes de Polyak, que são caracterizadas por apresentarem o corpo celular e a árvore dendrítica grandes, são equivalentes às células M marcadas por Golgi na periferia da retina humana²⁶. E também são equivalentes às células de grande corpo celular e com múltiplas ramificações marcadas com prata por Silveira e Perry (1991)⁴⁴.

Silveira e Perry (1991) foram os primeiros a descrever a presença das células M na região foveal⁴⁴. Essas células apresentam corpo celular muito maior que as células P, medindo 25-30 μm de diâmetro nesta região. Além disso, sua árvore dendrítica também é maior quando comparadas às células P. Na região periférica, a árvore dendrítica das células M aumentam significativamente de tamanho, chegando a 270 μm de diâmetro a 14 mm da fóvea. Seus dendritos contêm diversas varicosidades e ramificam principalmente no estrato 2 da sublamina OFF e no estrato 3 da sublamina ON²⁶.

As células *parasol* ou M apresentam corpo celular e árvore dendrítica maiores nos seres humanos do que nos macacos. A diferença de tamanho é menor na periferia da retina e gradualmente aumenta em direção ao centro. Em contraste, as células *midgets* ou P têm tamanho similar entre as duas espécies em qualquer excentricidade⁴⁰.

A diferença de tamanho do campo dendrítico das células *parasol* nos humanos e macacos poderiam explicar a diferente capacidade visual dessas duas espécies relacionadas à via magnocelular. A maior célula *parasol* humana, especialmente na retina central, prediz uma baixa densidade espacial e correspondentemente menor habilidade de resolução para o mosaico celular, sugerindo que o aumento da sensibilidade das células magnocelulares ao contraste de luminância é uma consequência do grande campo receptor dessas células⁴⁰.

Desta forma, em condições de baixa estimulação que tendem a excitar seletivamente a via magnocelular (baixo contraste, baixa frequência espacial, e alta frequência temporal), os humanos demonstrariam menor acuidade visual que os macacos⁴³. Em suporte a essa teoria, a acuidade visual dos macacos em baixa luminosidade é superior a dos humanos⁴⁵, e a visão humana é melhor em especificidade de contraste espacial e visão temporal⁴⁶.

Com relação às retinas de camundongos, estudos recentes descrevem diferente tipos morfológicos de células ganglionares⁴⁷⁻⁵⁰.

Como se pode imaginar, um número variado de células ganglionares foram descritas por diferentes tipos de técnicas de marcação. Provavelmente devido a diferença de técnica experimental aplicadas em cada um deles^{49,50}. O estudo de Volgy et al. (2009) parece ser o mais completo, onde 22 diferentes tipos de células ganglionares comuns aos gatos e humanos foram descritas nas retinas de camundongos⁵⁰.

3.3 Proteínas estruturais

As proteínas estruturais como neurofilamentos (NFs), microtúbulos e microfilamentos (**Figura 4**) compõem o citoesqueleto que tem papel fundamental no transporte axonal. Os microfilamentos são estruturas finas com cerca de 3-5nm de diâmetro. É uma estrutura mais simples composta de suas sequências helicoidais de moléculas globulares de actina.

Os neurofilamentos intermediários têm cerca de 10nm de diâmetro e são constituídos por muitas unidades fibrilares mais finas trançadas entre si. Os microtúbulos são estruturas tubulares de 25-28 nanômetros de diâmetro, compostas por uma proteína estrutural chamada tubulina e outras denominadas proteínas associadas ao microtúbulos (MAPs), do inglês *microtubule associate proteins* formando um cilindro²⁷.

O transporte axonal ao longo dos axônios das células ganglionares que formam o nervo óptico ocorre em direção anterógrada e retrógrada, permitindo o movimento de um grande número de componentes celulares, como mitocôndrias, endossomos, precursores de vesículas sinápticas e fatores neurotróficos⁵¹.

Quanto à velocidade do transporte axonal, ela pode ser lenta ou rápida. O transporte axonal lento apresenta duas ondas que viajam em diferentes velocidades, sendo uma associada aos neurofilamentos e microtúbulos, e a outra a vários tipos de proteínas, incluindo microfilamentos e tubulina¹.

Dados indicam que esse transporte é responsável pela manutenção da integridade e calibre dos axônios, uma vez que mantêm o fluxo de neurofilamentos e microtúbulos através do axônio¹.

O transporte axonal rápido está associado aos microtúbulos e pode ocorrer tanto de forma anterógrada como retrógrada. Nesse contexto vários estudos têm demonstrado que o aumento da pressão intraocular pode inibir o transporte axonal nas duas direções, levando à morte do axônio e de RGCs no glaucoma¹.

Figura 4 - Proteínas Estruturais

Legenda: Figura esquemática das estruturas nos microtúbulos (C), neurofilamentos (D) e microfilamentos (E).

Fonte: Modificado de Lent (2001)²⁷.

3.3.1 Neurofilamentos

Os NFs formam um dos principais componentes do citoesqueleto neuronal^{52,53}. A síntese e o transporte axonal de neurofilamentos têm um papel importante no controle do calibre axonal em grandes fibras nervosas mielinizadas, uma vez que os NFs são os elementos mais numerosos do citoesqueleto, e que sua densidade permanece constante ao longo de uma ampla gama de calibres. O número de NFs correlaciona-se diretamente com a área axonal^{15,54}.

Eles também contribuem para as propriedades dinâmicas do citoesqueleto neuronal durante diferenciação, crescimento, regeneração e orientação axonal, e agem para formar e manter a forma da célula, facilitando o transporte de partículas e organelas no citoplasma⁵⁴.

Os NFs são encontrados no corpo celular e especialmente nos axônios de neurônios do sistema nervoso central e periférico⁵⁵. Entre suas funções destacam-se: o transporte de moléculas e organelas pelo sistema nervoso, participação no crescimento axonal, função estrutural e arborização dendrítica⁵⁶.

Eles são compostos por três diferentes subunidades que formam um heteropolímero de 10nm de diâmetro e se diferenciam pelo peso molecular: baixo peso molecular, NF-L (68 kDa); médio peso molecular, NF-M (160 KDa) e alto peso molecular, NF-H (200Kda)^{57,58}. Os neurônios do sistema nervoso podem apresentar diferentes combinações e subunidades dos NFs, variando entre tipos celulares e em diferentes espécies⁵⁹.

Nos roedores, os NFs são heteropolímeros que para sua formação requerem a presença do NF-L associada ao NF-M ou NF-H. Já o NF-M não pode formar homopolímeros e necessita da presença do NF-L para sua incorporação entre os neurofilamentos. Entretanto, nos humanos, o NF-L interage e organiza-se independentemente de outros NFs⁵⁹.

Na retina de mamíferos, a marcação imuno-histoquímica dos NFs tem sido descrita principalmente nos axônios e nos processos das RGCs^{17,55,60,61}.

Dependendo da espécie estudada, os NFs podem ser encontrados em outros tipos de neurônios. Na maioria das espécies mamíferas como rato, camundongo, hamster, vaca e gato, os NFs são expressos na camada de células horizontais^{60,61} e no coelho e porco da Índia também são encontrados nas células bipolares⁶¹.

Os NFs normalmente não estão presentes nas células amácrinas em nenhuma espécie dos mamíferos, exceto gatos¹⁷ e coelhos⁶². Nenhuma marcação de NFs foi descrita em fotorreceptores nas espécies citadas.

Na retina interna de camundongos, o NF-L é descrito em células ganglionares de corpo celular grande, enquanto que o NF-H é encontrado apenas na parte distal dos axônios que formam o nervo óptico⁶⁰.

Alguns estudos têm mostrado que ocorre diminuição dos NFs nos axônios de células ganglionares de modelos experimentais de glaucoma^{4-6,16,63}, sendo que, no modelo com aumento da PIO, há uma menor marcação imuno-histoquímica de NF-H nas fibras do nervo óptico oriundas das regiões temporal, nasal e central, após 3 e 12 horas de PIO elevada. O mesmo foi observado com a marcação do NF-M após 3 horas em que a PIO foi aumentada; entretanto, no grupo exposto à 12 horas de PIO elevada, somente houve diminuição de NF-M nas fibras temporais. Estes dados sugerem que alterações nos NFs podem preceder a deficiência de transporte axonal, também quantificada neste estudo⁴.

Em modelos com aumento crônico da PIO, houve uma perda de 59-77% de RGCs marcadas com os 3 tipos de NFs na região central da retina, enquanto que na região nasal periférica essa perda foi de 96-97%. A comparação das contagens de neurônios marcados para NFs e a perda de células, avaliada por coloração de Nissl, indica que as células que contêm NFs representam uma grande proporção das células que degeneram na lesão glaucomatosa, particularmente nas regiões periféricas da retina⁶³.

3.3.2 *Microtúbulos*

O sistema tubular é provavelmente o mais interessante em termos de desenvolvimento e função dendrítica⁶⁴. Suas propriedades dinâmicas são moduladas pelas MAPs que se dividem em MAP-1, MAP-2 e tau⁶⁵.

As MAP's são caracterizadas por sua habilidade em promover a polimerização da tubulina e a estabilização dos microtúbulos^{66,67}.

A família MAP-1 apresenta três isoformas presentes na maioria dos vertebrados: MAP-1A, MAP-1B (também conhecida como MAP-5 ou MAP-1X) e MAP1S. Os integrantes da família MAP-1 são codificados por genes diferentes, regulam a estabilização e a formação dos fascículos microtubulares e também a formação de pontes cruzadas entre eles^{64,65}.

A proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP-2) é uma das MAPs mais abundantes no encéfalo⁶⁶, presente na região somatodendrítica neural, porém,

predominantemente expressa nos dendritos^{68,69}. A MAP-2 regula a extensão dos neuritos⁷⁰ e está associada com o desenvolvimento da polaridade neuronal⁷¹, sendo considerado como um marcador confiável da integridade estrutural envolvido que está envolvido na estabilização morfológica dos processos dendríticos e na modulação do crescimento e plasticidade dos neurônios⁷².

As MAP-2 podem ter alto peso molecular ou baixo peso molecular. As de alto peso molecular incluem a MAP-2A e MAP-2B, e as de baixo peso molecular incluem MAP-2C e MAP-2D. A expressão das isoformas de MAP-2 é regulada durante o desenvolvimento. A MAP-2A é principalmente expressa no cérebro adulto, enquanto a MAP-2B está presente ao longo de todo o desenvolvimento do sistema nervoso⁷³. Já, a MAP-2C é expressa nas fases iniciais do desenvolvimento, mas também é encontrada na retina e bulbo olfatório de animais adultos⁷⁴.

Na família MAP2 existem as isoformas de alto peso molecular: MAP-2A e MAP2B, expressas exclusivamente em neurônios, e as de baixo peso molecular, MAP2C e MA2D, presentes em neurônios e células gliais. A expressão das isoformas de MAP-2 é regulada durante o desenvolvimento. As MAP-2 de alto peso molecular são restritas ao corpo celular e dendritos, não sendo encontradas em axônios⁶⁴. A MAP-2A é expressa principalmente no cérebro adulto, enquanto que a MAP-2B está presente ao longo de todo o desenvolvimento do sistema nervoso⁷³. Já as MAPs de baixo peso molecular estão distribuídas em todos compartimentos neuronais^{64,75}.

A terceira família das MAPs é representada pela proteína tau. Existem seis isoformas de tau identificadas em neurônios de mamíferos, cuja função principal é se ligar, estabilizar e promover a associação dos microtúbulos⁶⁴.

A tau tem sido extensivamente estudada devido ao fato de que é o principal componente dos filamentos em forma de hélice pareados, os quais formam os emaranhados neurofibrilares encontrados na doença de Alzheimer e nas demências do lobo frontotemporal associada ao cromossomo 17 (FTDP-17)^{76,77}.

Com relação às neuropatias ópticas, como glaucoma, estudos recentes têm correlacionado alterações nos microtúbulos aos danos encontrados na NFL da retina e no nervo óptico de modelos animais⁴⁻⁶.

Em um modelo de glaucoma com aumento da PIO em porcos, foi mostrado uma diminuição da marcação com MAP nos feixes nervosos provenientes das regiões central, temporal e nasal da retina, após 12 h de PIO elevada⁴. Em outro,

com aumento da PIO em decorrência da lesão de veias episclerais em camundongos albinos, observou-se uma diminuição progressiva da imunorreatividade para tubulina nos feixes axonais⁶.

Estes estudos sugerem que a diminuição do MAP e tubulina nos axônios das RGCs pode ser um achado precoce da lesão glaucomatosa, ajudando na compreensão da fisiopatologia do glaucoma e na elaboração de estratégias terapêuticas^{4,6}. No entanto não pode ser afirmado que não há alteração dessas proteínas em outras estruturas das RGCs, uma vez que as mesmas não foram avaliadas nestes estudos.

De fato, outro estudo corrobora com os achados acima citados. Huang e Knighton (2005), realizaram experimentos em ratos utilizando polarímetro de varredura a *laser* e mostrou que a diminuição da birrefringência da NFL da retina pode indicar um declínio da densidade de microtúbulos. E este declínio precede a redução da espessura da NFL nos casos de glaucoma⁷⁸.

Em contrapartida, estudos com eventos isquêmicos corticais em animais, têm mostrado o aumento da imunorreatividade da MAP-2 no hemisfério contralateral ao lesionado, após o treinamento do animal para alguma habilidade específica, como o alcance do membro anterior⁷⁹. Já no lado com lesão isquêmica ocorre diminuição na expressão do MAP-2⁸⁰.

O aumento da expressão do MAP-2 também foi observado no córtex e estriado de animais que praticaram exercício físico na esteira de intensidade moderada; e no cerebelo de animais que praticaram exercício acrobático⁸¹.

Uma vez que a proteína estrutural MAP-2 participa do estabelecimento e manutenção da sinaptogênese e do crescimento da arborização dendrítica⁸¹, estes dados sugerem que o aumento da expressão desta proteína coincide com crescimento, arborização e remodelamento dendrítico, desempenhando um papel significativo na plasticidade neural^{71,82,83}.

3.4 Estudo da retina em modelos animais

Modelos animais têm sido amplamente utilizados para compreender os mecanismos envolvidos nas neuropatias ópticas como o glaucoma, entre outras. Em roedores, a retina e suas projeções retinoculares permitem estudar o fenômeno da morte secundária em células ganglionares (RGCs) do sistema nervoso

central^{84,85}, possibilitando testar estratégias que aumentem a sobrevivência neuronal e a regeneração axonal¹².

Existem diversos modelos que geram lesão no nervo óptico. Alguns deles utilizam o aumento da pressão intraocular através da lesão de veias que drenam o fluxo sanguíneo da retina³; em outros, ocorre a transecção do nervo intracranialmente¹³ ou intraorbitariamente⁸⁶. Existem também aqueles que promovem o esmagamento do nervo óptico (ONC)¹². Nesses três últimos modelos citados, a pressão intra-ocular não é afetada.

O ONC é um importante modelo de degeneração do sistema nervoso central, que resulta na morte celular das RGCs e é utilizado como modelo para o glaucoma de pressão normal, neuropatia óptica isquêmica anterior e danos traumáticos no nervo óptico¹².

A literatura descreve que após a lesão do nervo óptico há um aumento nas concentrações de óxido nítrico e glutamato no humor aquoso, levando à degeneração secundária das RGCs¹². Após esse processo, uma parte das células morre por necrose devido à lesão mecânica, enquanto outras morrem tardiamente, por apoptose. Os possíveis fatores envolvidos neste processo são o bloqueio do transporte axonal, culminando para um suprimento inadequado de fatores tróficos, o desequilíbrio na homeostase de cálcio, e a citotoxicidade por glutamato e óxido nítrico⁸⁷⁻⁸⁹.

Outro modelo experimental também utilizado é o de degeneração retrógrada de RGCs através de lesões no colículo superior⁹⁰. Este modelo visa estudar neuropatia óptica crônica permitindo investigar estágios e mecanismos das alterações das RGCs antes mesmo da morte celular, que ocorrem rapidamente em modelos em que são executados lesões diretas nos nervos ópticos⁹¹.

O modelo por lesão retrógrada no colículo superior também pode ser utilizado como modelo de glaucoma de pressão normal, em que a perda neuronal parece ser decorrente da lesão inicial no axônio da célula ganglionar na lamina crivosa¹², seguida de uma degeneração retrógrada das RGCs, o que possivelmente explicaria a causa da morte celular no glaucoma⁹².

No entanto, o método para o desenvolvimento de neuropatias ópticas, como o glaucoma, em modelos animais, ainda não é padronizado, desta forma prejudicando o esclarecimento sobre o processo da degeneração das RGCs, e diminuição no aporte nutricional pelo axônio descritos pela literatura nestes modelos^{5,87,93-95}.

Os estudos em retinas humanas são de grande importância para a detecção precisa das proteínas envolvidas nos mecanismos citados acima, no entanto limitam-se à análise da morfologia celular. Sendo assim, é extremamente importante o desenvolvimento de modelos animais que permitam a melhor compreensão dos mecanismos relacionados a neuropatias ópticas para se estabelecer propostas terapêuticas em fases mais precoces da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta da retina humana

A obtenção das retinas para o estudo foi feita seguindo as diretrizes e normas definidas pela Resolução 196/96 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos e foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB/USP (CPSH 022/201).

Durante a iniciação científica da candidata ao doutoramento, foi estabelecida uma colaboração com o Banco de Olhos do Estado do Pará e o Laboratório de Neuropatologia Experimental da Universidade Federal do Pará sob a supervisão da Professora Doutora Elizabeth Sumi Yamada, descrita a seguir.

A captação dos globos oculares, assim como a remoção da córnea para transplante era de responsabilidade da equipe do Banco de Olhos do Estado do Pará. Após a emissão do atestado de óbito do doador, consentimento explícito por escrito dos familiares e/ou responsável legal do mesmo (ANEXO 1) fornecido pela Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos do Estado do Pará (CNCDO), era realizada a enucleação dos globos oculares de doadores-cadáveres considerados adequados para transplantes. O Próprio Banco de olhos comunicava a equipe discente no Laboratório para retirar os globos oculares (sem a córnea) fixados em solução de paraformaldeído (PFA) a 4% , tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 – 7,4.

Informações sobre a identificação, idade, sexo e a causa da morte do doador eram registradas pelo Banco de Olhos. Possíveis doadores que apresentassem sorologia para HIV, Hepatite B ou C positivas eram posteriormente excluídos.

O Laboratório de Neuropatologia Experimental do Estado do Pará enviou 45 retinas não dissecadas para o Laboratório de Neurobiologia Celular em São Paulo. As amostras eram preservadas em sacarose 30% e enviadas em isopor com gelo por avião para São Paulo. Destas, foram excluídas 10 retinas devido ao mau estado de preservação das mesmas, uma vez que a retina dentro da calota posterior somente é fixada em PFA 4%, após o processamento do globo ocular para transplante de córnea. Em outras circunstâncias, essas retinas seriam descartadas no próprio Banco de Olhos. Também foram excluídas cinco retinas de doadores que apresentaram sorologia positiva para hepatite B ou C e HIV.

Foram analisadas seis amostras de retina para cada anticorpo estudado, sendo utilizados cinco tipos de anticorpos, totalizando o uso de 30 amostras de retina incluídas neste estudo. Não foram observadas alterações macroscópicas como hemorragias retinianas ou vítreas. No entanto, informações sobre doença oftalmológicas não foram obtidas, uma vez que o registro destes dados não fazia parte do protocolo da equipe CNCDO. A Tabela 1 descreve características das amostras dos doadores.

Tabela 1 - Características das amostras dos doadores de retina humana coletadas pelo CNCDO

Amostra	Dados
Sujeitos, n	30
Idade, anos, média (DP)	22.1 (4.7)
Tempo sem fixação*, horas, média (DP)	8.4 (2.4)
Gênero	
Masculino, n (%)	30 (100%)
Feminino, n (%)	---
Causa da Morte	
Traumatismo Crânio Encefálico, n (%)	5 (16.7%)
Traumatismo Tóraco-abdominal (%)	7 (23.3%)
Ferimento por arma de Fogo, n (%)	11 (36.7%)
Ferimento por arma branca, n (%)	7 (23.3%)

Legenda: CNCDO: Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos do Estado do Pará; * Tempo em que olho ficou sem fixação contando a hora do óbito até o momento em que foi colocado no paraformaldeído 4% sem a córnea.

4.2 Modelo animal de degeneração retrógrada de células ganglionares por lesão eletrolítica no colículo superior

Para o modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares, foram usados camundongos C57BL/6, machos, adultos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB/USP em 30/05/12, protocolo registrado sob nº 062 na fl. 129 do livro 02 para uso de animais em experimentação.

Os camundongos foram pesados e anestesiados via peritoneal com tribromoetanol 2%. Em seguida, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica com objetivo de acessar o colículo superior usando as seguintes coordenadas: ântero-posterior 3,2mm (posterior ao bregma), látero-lateral 0,8mm (lateralmente à sutura central) e profundidade 1,2mm e 1,8mm.

Para a lesão eletrolítica inseriu-se um eletródio no colículo superior direito (olho esquerdo; grupo experimental) e aplicou-se uma corrente catódica seguida de uma anódica de intensidade de 2 μ A cada uma, ambas com duração de 5 segundos. O colículo esquerdo não foi submetido a nenhuma corrente sendo considerado o lado controle (olho direito; grupo controle). Também foram utilizados animais que não foram submetidos a nenhum tipo de lesão, formando um terceiro grupo de comparação, o grupo “branco”. A Figura 5 mostra um desenho esquemático do modelo e as imagens da lesão no colículo superior.

A indução de lesão por via eletrolítica foi escolhida com base em experimentos do Laboratório de Neurobiologia Celular que utilizou esta abordagem para ablação de diferentes áreas do sistema visual⁹⁶.

Os animais (exceção do grupo branco) foram divididos em 3 grupos experimentais e sacrificados 7, 15 e 45 dias após a lesão eletrolítica. Após os diferentes tempos de sobrevida, estes animais e o grupo branco foram anestesiados com quetamina e xilazina, ambos por via intramuscular, e submetidos a perfusão transcardíaca com PFA 4% visando a realização de ensaios de imuno-histoquímica.

Em seguida, os encéfalos e os globos oculares foram removidos, pós-fixados em PFA 4% por 4 horas e transferidos para uma solução de sacarose a 30%.

Figura 5 - Desenho esquemático com do modelo de lesão retrógrada no colículo superior

Legenda: À esquerda desenho esquemático mostrando as vias visuais, enfatizando que a lesão é feita no lado direito do colículo superior e o grupo experimental corresponde ao olho esquerdo. À direita, secção histológica corada pelo método Giemsa com seta mostrando a área lesionada no colículo superior direito e lado conta lateral intacto. Barra de escala: 300 μ m.

Para os ensaios de PCR quantitativo (qPCR) os animais foram eutanasiados nos mesmos tempos indicados anteriormente por deslocamento cervical seguido de decapitação. Em seguida, os olhos controle, experimental e branco foram enucleados e as retinas dissecadas e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração do RNAm.

4.3 Imuno-histoquímica

Parte das retinas humana e murina foram dissecadas do globo ocular e processadas para cortes verticais (12 µm de espessura) em um criostato e coletadas em lâminas gelatinizadas. Outras, após a dissecação, foram separadas para o processamento de montagens planas, onde a retina inteira, após a reação imuno-histoquímica, é disposta em uma lâmina gelatinizada que em seguida é colocada sobre uma placa quente para promover a aderência do tecido à lâmina.

A imunorreatividade foi demonstrada usando método de imunofluorescência ou o método do complexo avidina-biotina peroxidase (ABC). A metodologia empregada foi a mesma descrita em detalhes por Röhrenbeck et al. (1989)⁹⁷.

Para avaliação da distribuição das proteínas estruturais em ambas espécies, utilizaram-se dois tipos de anticorpos primários: PAN (clone FNP7; Zymed, CA, USA), um anticorpo contra os três tipos de neurofilamentos: baixo peso molecular (NF-L; 68 kD), médio peso molecular (NF-M; 160 kD) e alto peso molecular (NF-H; 200 kD), e o MAP-2 (Millipore, MA, USA), contra a proteína associada ao microtúbulo do tipo 2. Somente na retina humana foram realizados ensaios imuno-histoquímicos utilizando anticorpos para os neurofilamentos separadamente: NF-L (anticorpo monoclonal, clone NR4; Sigma, MO, USA), NF-M (anticorpo monoclonal, clone NN18; Sigma, MO, USA) e NF-H (anticorpo monoclonal fosforilado e não fosforilado, clone N52; Sigma, MO, USA).

Para a marcação de células ganglionares nas retinas de camundongos, foi escolhido um anticorpo que reage contra as proteínas ligantes de cálcio, a calretinina (Chemicon, CA, USA). De acordo com a literatura, a calretininina marca 89% das RGCs da retina de camundongo⁹⁸ e todas RGCs em ratos^{99,100}.

Os anticorpos primários foram diluídos na concentração de 1:1000 em 0,05% de soro de jumento com Triton X-100 a 0,03%. O tempo de incubação para os anticorpos primários foi de 24 horas (cortes verticais) e 72 horas (montagem plana).

Para imunofluorescência, utilizaram-se anti-imunoglobulinas na concentração de 1:200 (IgG anti-mouse) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, MO, USA ou Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA). Para o método do ABC, utilizou-se IgG anti-mouse e IgG anti-rabbit conjugado com biotina na mesma concentração (Vector labs). Os cortes verticais foram incubados em

anticorpo secundário por 2 horas, e as montagens planas por 48 horas.

4.4 Aquisição da imagem e quantificação

4.4.1 Retinas humanas

As imagens do PAN, NF-L, NF-M, NF-H e MAP-2 nos cortes verticais foram obtidas utilizando microscopia confocal (1024_1024 pixels) (*Nikon Corporation, Tokyo, Japan*).

Através das montagens planas marcadas com PAN e MAP, foi determinado o número de neurônios marcados a cada intervalo de 2mm em toda retina, utilizando imagens capturadas em uma objetiva de 20X de um microscópio Nikon E1000 acoplado a uma câmera digital Nikon DCM1200. A área medida em cada intervalo foi de 0.529 mm². Linhas de isodensidade foram construídas através dos valores da densidade plotados em mapas do contorno retiniano utilizando o programa ArcView GIS 3.2 (ESRI, 2002).

O tamanho do corpo celular foi medido na excentricidade de 3mm (região central) e 11mm (região periférica). O tamanho da árvore dendrítica foi determinado somente na excentricidade de 11mm devido a região central apresentar grande sobreposição de fibras e dendritos. Todas as medidas foram determinadas através do programa *Image J* (Rasband, W.S., *Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <<http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2008>>*).

4.4.2 Retinas de camundongos

Para se avaliar a viabilidade do modelo animal como modelo de neurodegeneração na GCL, foram realizadas medidas das espessuras das retinas nos cortes verticais, a partir dos processos externos dos fotorreceptores até margem vitreal da retina⁸⁶. Para isso, foram capturadas cinco imagens aleatórias da região central da retina de cinco animais comparando-se o grupo experimental (o olho esquerdo; contra-lateral à lesão no colículo) ao seu respectivo controle (olho direito) nos três diferentes tempos após a lesão: 7, 15 e 45 dias (total de 15 animais). Também foram tomadas medidas da região central das retinas de 3 animais brancos.

Para o cálculo da densidade das células ganglionares, foi utilizado o mesmo protocolo da retina humana. No entanto, a densidade celular foi calculada separadamente na periferia da retina e no centro, uma vez que a região periférica é mais suscetível à morte neuronal como observado em outro modelo de degeneração de RGCs⁶³. A região central foi delimitada por uma área de 2,5 mm², e a periférica pelo restante, de forma semelhante ao método usado por Almeida (2009) (**Figura 6**)¹⁰¹.

Figura 6 - Esquema ilustrativo das regiões utilizadas para o cálculo da densidade de células ganglionares nas retinas murinas

Legenda: Barra de escala: 1mm.

Fonte: modificada de Almeida (2009)¹⁰¹.

A quantificação do MAP-2 e PAN foi realizada através da análise de densidade óptica integrada pelo programa *Image J* em cortes verticais. Foram utilizados três animais para cada tempo, totalizando 9 animais, além de 3 animais para o grupo branco.

As imagens dos cortes verticais e da camada de células ganglionares nas montagens planas foram obtidas por uma objetiva de 20X do microscópio Nikon E1000 acoplado a uma câmera digital Nikon DCM1200 e analisadas pelo programa *Image J*.

4.5 Extração do RNA

Para a extração do RNA das retinas de ambas espécies, utilizamos o protocolo de Paschon et al. (2012)¹⁰². Na extração das retinas murinas, cada amostra foi composta por duas retinas de animais diferentes. Foram utilizadas 15 retinas de camundongo (cinco amostras) para cada grupo animal nos três diferentes tempos de lesão e 12 retinas de animais brancos (seis amostras). As retinas dissecadas foram acondicionadas em 500 μ L do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

As seis retinas humanas utilizadas para extração de RNA foram dissecadas, separando-se a retina periférica da central, quatro horas após o óbito do doador, e em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido e transportadas em gelo seco, em mãos, até São Paulo. No entanto foi necessário descartar duas retinas que descongelaram durante o transporte. Sobrando 4 amostras de retina humana que foram descongeladas e acondicionadas em reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Após esse procedimento, as retinas foram maceradas com o auxílio de um sonificador. Ao material resultante foram adicionados 100 μ L de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas (12000xg a 4 °C) durante 15 minutos. A fase translúcida superficial, resultante do processo de centrifugação, foi coletada e acondicionada em tubos e, posteriormente, foram adicionados 250 μ L de isopropanol.

As amostras foram centrifugadas (12000xg a 4 °C) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado de RNA foi adicionado 1,0 mL de etanol (75%), e as amostras centrifugadas (7500xg a 4 °C) por 10 minutos. Os resíduos sobrenadantes foram descartados, preservando no tubo apenas o precipitado de RNA. A esse material foram adicionados 20 μ L de água livre de nucleases (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e, ele foi posteriormente, homogeneizado.

A concentração do RNA total foi quantificada por espectrofotometria, utilizando 260 nm de comprimento de onda. De forma prévia à realização do protocolo de transcrição reversa, as amostras foram tratadas com DNase *Amplification Grade* (Invitrogen, EUA) e, posteriormente, a enzima M-MLV (Invitrogen, EUA) para realização da transcrição reversa. Para ambos os procedimentos, foi adotado o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen, EUA).

4.6 PCR em tempo real

Para o PCR quantitativo em tempo real foi utilizado o kit SYBR Green tendo a ubiquitina C (UBC) e o SDHA (complexo de succinato de desidrogenase, subunidade A e flavoproteína) como genes de referência.

Primers específicos para NF-L, NF-M, NF-H e (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foram utilizados para retinas humanas e de camundongos, além de *primers* específicos para MAP-2 somente para retinas murinas. Foi usado 1mL de cDNA, com 20mL de SYBR PCR Master Mix, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Applied Biosystems). Após a reação, a quantificação da amplificação foi feita através da determinação do limiar de ciclos (*cycle threshold*, *CT*) (103) baseada na detecção da fluorescência emitida. Os dados foram capturados no sistema Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.

As sequências utilizadas dos pares de *primers* para os neurofilamentos (humano e de camundongos) e MAP-2 em camundongos estão descritos nas tabelas 2 e 3. Os *primers* usados para os genes UBC e SDHA foram descritos previamente por Vandesompele et al. (2002)¹⁰⁴.

As análises dos resultados da expressão gênica foram feitas seguindo-se o método de Ct comparativo ($2^{-[\Delta\Delta Ct]}$).

Tabela 2 - Descrição dos primers e anticorpos usados no PCR em tempo real na retina humana

Gene	Forward/Reverse	Número de acesso ao genbank
NF-H	CCCAGCTGCGAGAATACCA ACCTTCCAGGAGTTTTCTGTAAGC	NM_021076.3
NF-L	CTCGTCATTTGCGCGAATAC TCACCCTCCAGGAGTTTTCTGT	NM_006158.4
NF-M	CAGAGCTCCCAGGTCTTTGG GCGGGTGGACATCAGATAGG	NM_005382.2

Legenda: NF-H: neurofilamentos de alto peso molecular; NF-M: neurofilamentos de médio peso molecular; NF-L: neurofilamentos de baixo peso molecular.

Tabela 3 - Descrição dos primers e anticorpos usados no PCR em tempo real na retina de camundongos

Gene	Forward/Reverse	Número de acesso ao genbank
MAP-2	TCCCTCGTTTCTTCGGTCG GGTCACAGCTTACTCGCAGAGC	NM_001039934.1
NF-H	CTCAAGTGCGACGTGACGTC CCAACCTCACTCGGAACCACT	NM_010904.3
NF-L	CATGCAGGACACAATCAACAAA TGTCCAAGGCCATCTTGACA	NM_010910.1
NF-M	AGGAAGAGATCGCCGAGTACC GATGGTGTCTGCTAGCTGCTG	NM_0108691.2

Legenda: NF-H: neurofilamentos de alto peso molecular; NF-L: neurofilamentos de baixo peso molecular; NF-M: neurofilamentos de médio peso molecular.

4.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas no pacote estatístico Stata 12 (Statacorp, College Station, TX, EUA) para Mac OSX. Os resultados nos gráficos estão expressos em média, intervalo de confiança e conforme indicado na legenda da figura.

Para a avaliação da espessura das retinas murinas, a variável dependente (espessura) foi calculada como a média de três medidas aleatórias para cada retina central de cada grupo. A análise de variância (ANOVA) de duas vias foi realizada para avaliar se houve mudança na variável dependente ao longo do tempo (7,15 e

45 dias), de acordo com cada grupo: controle (n=5), experimental (n=5) e branco (n=3). Também exploramos se houve diferença entre os grupos para cada tempo de avaliação utilizando ANOVAs de uma via.

A densidade celular (número de células / mm²), foi calculado a cada 2 mm na retina inteira em 7, 15 e 45 dias após a lesão (total de 15 animais), e no grupo branco (3 retinas). Realizamos a análise ANOVA de duas vias, separadamente para o centro e periferia, para comparar a densidade média entre os grupos experimental, controle e branco nos diferentes tempos de lesão, seguido da análise *post-hoc* com método de Bonferroni.

Também realizamos uma ANOVA de duas vias comparando a diferença de densidades entre o centro x periferia, para cada grupo no 45^o dia.

Para análise da quantificação imuno-histoquímica dos NFs e MAP-2, calculamos a média dos valores obtidos nos grupos experimental e controle e dividimos pela média dos valores do grupo branco. Foi realizado uma ANOVA de uma via, seguido da análise *post-hoc* com método de Bonferroni.

Para as análises dos resultados obtidos com PCR em tempo real, também foi realizada a ANOVA de uma via, seguida por comparações pareadas (teste de Bonferroni ou Tukey), com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Retinas humanas

5.1.1 Neurofilamentos

Para o estudo de caracterização de neurofilamentos na retina humana, realizamos a marcação para PAN por imuno-histoquímica em montagens planas. A medida do tamanho dos corpos celulares foi realizada na excentricidade de 3mm (região central) e 11mm (região periférica) a partir do nervo óptico, em todos os quadrantes das retinas processadas para montagem plana.

Os dados revelaram um número considerável de fibras nervosas na NFL e uma população de células ganglionares de corpo celular grande e sua árvore dendrítica completamente marcadas na GCL (**Figura 7**). O mesmo foi visto em cortes verticais marcados para o PAN, onde também foi possível verificar corpos celulares na INL e processos na IPL (**Figura 8A**).

No centro da retina, as células marcadas são menores ($19,2 \pm 9,6 \mu\text{m}$) em relação às células marcadas na periferia ($25,8 \pm 12,2 \mu\text{m}$). Na retina periférica, é possível observar que as células marcadas originam de 2 a 4 dendritos primários de larga espessura (**Figura 7B**) enquanto que no centro os dendritos são mais finos e em menor quantidade (**Figura 7A**). Nos cortes verticais, observamos que esses dendritos arborizam no estrato 2 da sublamina *OFF* na IPL (**Figura 8A**). As características da morfologia dessas células estão descritas na Tabela 3.

A região ao redor da fóvea apresenta alta densidade de células ganglionares (150 células/mm^2). A medida que nos afastamos do centro da retina em direção à periferia, há diminuição da densidade celular (**Figura 9**).

Tabela 4 - Dados morfológicos das células ganglionares observadas por marcação imuno-histoquímica para neurofilamentos (PAN) na região central e periférica da retina em montagem plana

Morfologia	Central	Periferia
Diâmetro do corpo celular μm (média $\pm$ desvio padrão)	19,2 $\pm$ 9,6	25,8 $\pm$ 12,2
Morfologia dos dendritos primários	2 dendritos finos	2-3 dendritos largos
Diâmetro da árvore dendrítica μm (média $\pm$ desvio padrão)	-	180,1 $\pm$ 78,2

Figura 7 - Montagem plana de retina humana marcada para neurofilamentos (PAN)

Legenda: (A) A seta mostra células ganglionares de grande corpo celular na região central da retina. (B) Célula ganglionar completamente marcada na região periférica da retina. Barra de escala: 50 μm . Microscopia óptica.

Figura 8 - Distribuição da marcação com neurofilamentos (PAN) em cortes verticais de retina humana

Legenda: PAN: anticorpo para os 3 subunidades de neurofilamentos. (A) Corpos celulares completamente marcados (seta), marcação de células deslocadas na inl (cabeça de seta). (B) Nenhuma marcação foi observada na imuno-histoquímica feita para NF-M. onl – camada nuclear externa; opl – camada plexiforme externa; inl – camada nuclear interna; ipl – camada nuclear interna; gcl – camada de células ganglionares. Barra de escala: 20 μm . Microscopia confocal.

Figura 9 - Densidade de células marcadas com neurofilamentos (PAN) na camada de células ganglionares da retina humana

Legenda: As linhas de isodensidade correspondem ao número de células por mm^2 . Barra de escala: 1 mm. D, dorsal; V, ventral; N, nasal; T, temporal; círculo preenchido, escavação do nervo óptico.

O número de células ganglionares não foi determinado na fóvea, devido a densidade destas células nesta região, o que dificulta a individualização e consequentemente a contagem celular. Na retina central, perto da papila do nervo óptico, não observamos corpos celulares, apenas axônios e dendritos.

Além da imuno-histoquímica para neurofilamentos (PAN), realizamos marcações para as 3 isoformas dos neurofilamentos em cortes verticais: NF-L, NF-M e o NF-H. O NF-L foi detectado em corpos celulares de neurônios na GCL, em fibras localizadas na NFL e por último, em processos na IPL, especialmente no estrato 2 (**Figura 10B e 10C**), enquanto que o NF-H foi observado apenas no corpo de neurônios localizados na GCL e nas fibras localizadas na NFL (**Figura 11B e 11C**). No entanto, a imuno-histoquímica para NF-M em cortes verticais não mostrou marcação em nenhum tipo de celular nas camadas da retina humana. (**Figura 8B**).

Figura 10 - Distribuição da marcação com NF-L em cortes verticais de retina humana

Legenda: NF-L: neurofilamentos de baixo peso molecular. (A) em vermelho, contra-coloração com iodeto de propídeo (B) em verde, distribuição do NF-L nos cortes verticais: células ganglionares marcadas (seta) e possíveis células deslocadas (cabeça de seta) na inl. (C) sobreposição de painéis A e B. onl – camada nuclear externa; opl – camada plexiforme externa; inl – camada nuclear interna; ipl – camada plexiforme interna; gcl – camada de células ganglionares; nfl – camada de fibras do nervo óptico. Barra de escala: 20 μ m. Microscopia confocal.

Figura 11 - Distribuição da marcação com NF-H em cortes verticais de retina humana

Legenda: NF-H: neurofilamentos de alto peso molecular (A) em vermelho contra-coloração com iodeto de propídeo. (B) em verde distribuição do NF-H: alguns corpos celulares marcados (seta) (C) Sobreposição de painéis A e B. onl – camada nuclear externa; opl – camada plexiforme externa; inl – camada nuclear interna; ipl – camada plexiforme interna; gcl – camada de células ganglionares; nfl – camada de fibras do nervo óptico. Barra de escala: 20 μ m. Microscopia confocal.

Com base nos resultados obtidos pela imuno-histoquímica, optamos por realizar PCR quantitativo de tempo real para detectar a diferença da expressão de RNAm do NF-L, NF-M e NF-H na retina humana comparando-se a periferia e o centro da retina.

Os níveis de RNAm do NF-H, NF-L e NF-M foram respectivamente 5,17; 6,65 e 9,65 maiores na retina central do que na periférica (**Figura 12**).

A distribuição dos genes de neurofilamentos na região central e periférica da retina humana pode ser observada na Figura 13. Nas duas regiões, o gene com maior expressão foi o NF-L seguido do NF-M, expresso duas vezes mais do que o NF-H (**Figura 13**).

Figura 12 - Expressão relativa do RNAm NF-L (A), NF-M (B) e NF-H (c) na região periférica e central da retina humana

Legenda: Expressão relativa do RNAm NF-L (A), NF-M (B) e NF-H (c) na região periférica e central da retina humana. O RNAm de cada neurofilamento foi medido por PCR em tempo real e normalizado com SDHA. Valores expressos em média e desvio padrão. Número de indivíduos entre parêntesis. * $p < 0.05$ pelo teste t.

Figura 13 - Padrão de expressão dos neurofilamentos na retina humana central e periférica

Legenda: Padrão de expressão dos neurofilamentos na retina humana central e periférica. O RNAm de cada neurofilamento foi medido por PCR em tempo real e normalizado com SDHA. Valores expressos em média e desvio padrão em relação aos valores do NF-H. Número de indivíduos entre parêntesis. * $p < 0.05$ por Anova seguido por teste de Tukey.

5.1.2 MAP - 2

A distribuição do MAP-2 em montagem planas das retinas humanas mostrou fibras do nervo óptico e células ganglionares de corpo celular grande medindo em média $13,8 \pm 7,9 \mu\text{m}$ no centro da retina e $31,9 \pm 17,1 \mu\text{m}$ na periferia. Axônios e dendritos destas células ganglionares também foram completamente marcados em sua maioria.

No centro da retina, na excentricidade de 3mm a partir do nervo óptico, as células ganglionares são menores com dendritos de menor calibre e em menor quantidade (**Figura 14 A**), enquanto na periferia (excentricidade de 11mm), os corpos celulares são maiores apresentando de 2 a 5 dendritos de maior calibre (**Figura 14 B**). Os dados morfológicos estão descritos na Tabela 5.

Figura 14 - Montagem plana de retina humana marcadas com MAP-2

Legenda: (A) Centro da retina: nota-se neurônios na camada de células ganglionares dispostos entre as fibras (B) Periferia da retina: nota-se células apresentando marcação no seu corpo celular e sua árvore dendrítica marcada. Microscopia óptica. Barra de escala 100 μm .

Tabela 5 - Dados morfológicos das células ganglionares observadas por marcação imuno-histoquímica para MAP-2 na região central e periférica da retina em montagem plana

Morfologia	Central	Periferia
Tamanho do corpo celular μm^2 (média $\pm$ desvio padrão)	13,8 $\pm$ 7,9	31,9 $\pm$ 17,1
Morfologia dos dendritos primários	2 dendritos finos	2-3 dendritos largos
Diâmetro da árvore dendrítica μm (média $\pm$ desvio padrão)	-	256,1 $\pm$ 83,1

A densidade das células ganglionares, assim como mostrado na marcação para neurofilamentos, também decresce de forma concêntrica. Observa-se que as linhas de isodensidade formam um leve alongamento no meridiano naso-temporal (**Figura 15**).

Figura 15 - Densidade de células marcadas com MAP-2 na camada de células ganglionares

Legenda: As linhas de isodensidade correspondem ao número de células por mm^2 . Barra de escala: 1mm ; círculo preenchido, escavação do nervo óptico.

A microscopia confocal em cortes verticais marcados com MAP-2 revelou que a árvore dendrítica destas células ramifica de forma difusa na IPL (**Figura 16B**). A análise da imagem mostrou que estes processos estão localizados principalmente no estrato 2 da sublâmina *OFF* e no estrato 3 da sublâmina *ON* da IPL (**Figura 16 D**).

Também foram observados corpos celulares deslocados localizados principalmente na sublâmina *OFF* da IPL (**Figura 16 A e B**). Observamos que os corpos celulares destas células deslocadas estão cercados pelos processos das células ganglionares na IPL (**Figura 16 C**).

Figura 16 - Distribuição de MAP-2 em cortes verticais na retina humana

Legenda: (A) em vermelho: contra-coloração com iodeto de propídeo. Células deslocadas na margem externa da ipl (seta). (B) Células ganglionares (cabeça de seta) e células deslocadas (seta). (C) Combinação dos canais verde e vermelho da microscopia confocal. As células deslocadas estão envolvidas pelos processos na ipl (seta). (D) Imagem da análise de distribuição do MAP 2 dos processos na ipl. onl – camada nuclear externa; opl – camada plexiforme externa; inl – camada nuclear interna; ipl – camada plexiforme interna; gcl – camada de células ganglionares; nfl – camada de fibras do nervo óptico. Barra de escala: 20 μ m. Microscopia confocal.

5.2 Retinas murinas

5.2.1. Imuno-histoquímica

5.2.1.1 Neurofilamentos

Tanto o grupo controle (retina ipsilateral à lesão) quanto o experimental (retina contralateral à lesão) variaram ao longo dos tempos estudados (7, 15 e 45 dias pós lesão) (**Figura 8**). Sendo assim, optou-se por não utilizar os dados referentes ao grupo controle como normalizador e sim um animal naïve (branco).

A marcação para neurofilamentos (PAN) nos cortes verticais das retinas de camundongos mostrou que, tanto no grupo experimental quanto no grupo controle, houve uma diminuição gradativa do PAN na NFL das retinas desses animais quando comparados ao grupo branco, nos três tempos após a lesão no colículo superior direito, sendo que após 45 dias, a marcação com PAN diminui consideravelmente na NFL (**Figura 17**).

A quantificação do PAN realizada por densidade óptica integrada revelou uma tendência estatística entre os grupos experimental, controle e branco para o 7º dia ($F_{2,8}=4,11$; $p=0,07$). Porém ao comparar-se o grupo experimental ao grupo branco, o grupo experimental ($0,42 \pm 0,02$) apresentou menos da metade do valor da média do branco ($1,0 \pm 0,19$) ($t=3,24$, $p=0,02$). Observou-se também uma tendência estatística no 15º dia ($F_{2,8}=3,64$; $p=0,08$) e no 45º dia ($F_{2,8}=5,08$; $p=0,07$), porém o grupo experimental somente apresentou valores significativamente menores que o grupo branco ($t=3,2$; $p=0,01$ e $t=10,93$; $p<0,01$, respectivamente). Após 45 dias da lesão, houve uma diminuição da marcação do PAN no grupo experimental ($0,22 \pm 0,03$) em mais de um quarto do valor da média encontrada no grupo branco ($1,0 \pm 0,19$). As médias do grupo experimental após 15 dias da lesão foi de $0,27 \pm 0,03$.

Figura 17 - Marcação para o PAN em cortes verticais na retina de camundongos do modelo de degeneração retrógrada

Legenda: As setas indicam a marcação do PAN na camada de fibras do nervo óptico da retina. Barra de escala: 50 µm; microscopia óptica.

Figura 18 - Gráfico da quantificação do PAN na imuno-histoquímica 7, 15 e 45 dias após a lesão no colículo superior

Legenda: O gráfico foi plotado com a razão entre as médias dos grupos experimentais e controle pela média do branco. Entre o grupo branco e experimental 7 e 15 dias após a lesão, $p < 0,05$. Entre o grupo branco e experimental 45 dias após a lesão, $p < 0,01$.

5.2.1.2 MAP-2

Já na marcação para MAP-2 em cortes verticais foi possível verificar um aumento da imunorreatividade desta proteína na GCL e na IPL da retina do grupos experimentais e controles em relação ao grupo branco em todos os tempos avaliados. No entanto, esse aumento foi visivelmente maior no grupo experimental 15 dias após a lesão. No tempo 45 dias, a marcação para o MAP-2 diminui nos grupos experimental e controle, mas ainda assim é maior do que no grupo branco (Figura 19).

Figura 19 - Marcação para MAP-2 em cortes verticais na retina de camundongos do modelo de degeneração retrógrada

Legenda: as setas indicam a marcação na camada de células ganglionares e as cabeças de seta a marcação na camada plexiforme interna da retina. Barra de escala: 50 μ m; microscopia óptica.

A análise de densidade óptica da marcação para MAP-2 revela uma diferença entre os grupos para todos os tempos, ou seja, para o 7º dia ($F_{2,8}=102,66$; $p<0,001$), 15º dia ($F_{2,8}=63,87$; $p<0,001$) e 45º dia após a lesão no colículo superior no camundongo ($F_{2,8}=6,69$; $p<0,02$). Tal diferença deveu-se a valores significativamente

mais altos do grupo experimental ($t=21,65$; $p<0,001$; $t=11,25$; $p<0,001$ e $t=3,12$; $p=0,03$ para o 7º, 15º e 45º dias, respectivamente) e do grupo controle ($t=3,87$; $p=0,02$; $t=5,77$; $p<0,001$ e $t=3,11$; $p=0,04$ para o 7º, 15º e 45º dias, respectivamente). Em relação ao grupo branco as médias da densidade óptica integrada da marcação para MAP-2 nos grupos experimentais comparados ao grupo branco ($0,92 \pm 0,01$) foram: $2,87 \pm 0,09$ em 7 dias, $4,39 \pm 0,30$ em 15 dias e $2,80 \pm 0,50$ em 45 dias após a lesão.

Além disso, o grupo experimental apresentou valores mais altos do que o grupo controle para o 15º dia ($t=3,53$; $p=0,04$) mas não para os demais tempos ($t=0,66$; $p=0,53$ e $t=0,21$; $p=0,84$ para o 7º e 45º dias, respectivamente), ou seja, somente houve diferença significativa na marcação para o MAP-2 entre o grupo experimental e seus respectivos controles no 15º dia após a lesão. Aqui, o aumento do MAP-2 ($4,39 \pm 0,30$), chegou a ser quase quatro vezes maior do que o grupo branco ($0,92 \pm 0,01$), e aproximadamente uma vez maior do que seu controle ($3,24 \pm 0,22$). Os resultados da quantificação do MAP-2 podem ser observados na Figura 20.

Figura 20 - Gráfico da quantificação do PAN na imuno-histoquímica 7, 15 e 45 dias após a lesão no cóliculo superior

Legenda: O gráfico foi plotado com a razão entre as médias da densidade óptica integrada dos grupos experimentais e controle pelo branco; $p<0,001$ entre o grupo experimental (7 e 15 dias após a lesão) e o grupo branco; $p<0,05$ entre o grupo e experimental 45 dias após a lesão branco.

5.2.2 PCR em tempo real

Uma vez que na análise de imuno-histoquímica os controles (lado ipsolateral da lesão) variaram ao longo do tempo, optamos por excluir os grupos controles também da análise de PCR em tempo real e fazer as comparações dos grupos experimentais em relação ao grupo branco.

5.2.2.1 Neurofilamentos

A análise da expressão gênica das três subunidades dos neurofilamentos mostrou que, em relação ao NF-H, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo branco e os grupos experimentais no 7º, 15º e 45º dias ($F_{3,19}=1,1$; $p=0,38$). Observou-se, porém, uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos para os genes NF-L ($F_{3,18}=5,06$; $p=0,01$) e NF-M ($F_{3,18}=4,97$; $p=0,01$).

As análises *post-hoc* com correção de Bonferroni revelaram que para o NF-L, a expressão foi maior no 7º e 45º dia, em relação ao branco ($t=7,58$, $p=0,01$; $t=8,39$, $p=0,01$, respectivamente), enquanto que para o NF-M a expressão foi maior apenas para o grupo no 45º dia em relação ao grupo branco ($t=8,5$; $p=0,01$). Os resultados para a quantificação do RNAm do NF-H, NF-M e NF-L podem ser observados nas Figuras 21, 22 e 23, respectivamente.

Figura 21 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-H em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior

Legenda: Eixo y: razão entre a expressão gênica do NF-H experimental e branco após correção pela média entre os genes de referência Ubc e Rpl. Eixo x: Tempo em dias pós lesão eletrolítica do colículo superior em que as retinas murinas foram coletadas. Entre parênteses, tamanho da amostra por grupo. Barra=erro padrão da média; p=ns.

Figura 22 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-M em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior

Legenda: Eixo y: razão entre a expressão gênica do NF-M experimental e branco após correção pela média entre os genes de referência Ubc e Rpl. Eixo x: Tempo em dias pós lesão eletrolítica do colículo superior em que as retinas murinas foram coletadas. Entre parênteses, tamanho da amostra por grupo. Barra=erro padrão da média; * p<0,05.

Figura 23 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do NF-L em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior

Legenda: Eixo y: razão entre a expressão gênica do NF-L experimental e branco após correção pela média entre os genes de referência Ubc e Rpl. Eixo x: Tempo em dias pós lesão eletrolítica do colículo superior em que as retinas murinas foram coletadas. Entre parênteses, tamanho da amostra por grupo. Barra=erro padrão da média; * e ** $p < 0,05$.

5.2.2.2 MAP-2

A expressão gênica do MAP-2, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos branco x experimental ($F_{3,19}=7,01$; $p < 0,01$), sendo que os grupos 0^o ($t=12,46$, $p < 0,01$) e 15^o dias ($t=7,92$; $p=0,01$) apresentaram valores menores que o grupo branco (**Figura 24**).

Figura 24 - PCR em tempo real em amostras de retina murina para o gene do MAP-2 em grupos experimentais e branco no modelo de lesão eletrolítica do colículo superior

Legenda: Eixo y: razão entre a expressão gênica do MAP-2 experimental e branco após correção pela média entre os genes de referência Ubc e Rpl. Eixo x: Tempo em dias pós lesão eletrolítica do colículo superior em que as retinas murinas foram coletadas. Entre parênteses, tamanho da amostra por grupo. Barra=erro padrão da média; * $p<0,01$ e ** $p<0,05$.

5.2.3 Modelo animal de degeneração retrógrada de células ganglionares por lesão eletrolítica no colículo superior

Para avaliar a viabilidade do modelo experimental como modelo de neuropatia óptica, realizamos a medida da espessura da retina do grupo experimental comparando com seu respectivo controle e ao grupo branco. Ao todo, foram estudados 15 animais, divididos em três diferentes tempos: 7, 15 e 45 dias após a lesão; e três animais do grupo branco.

Após 7 dias de lesão, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos ($F_{2,12}=263,34$; $p<0,001$). Na comparação *post-hoc* grupo a grupo, com correção de Bonferroni, o grupo experimental apresentava uma espessura significativamente menor que o controle ($t=10,76$; $p<0,001$) e que o branco ($t=22,98$; $p<0,001$) e que o grupo controle apresentava uma espessura significativamente menor que o grupo branco ($t=13,66$; $p<0,001$) (**Figura 25**).

Figura 25 - Espessura da retina após 7 dias da lesão no colículo superior

Legenda: Eixo y: médias da espessura das retinas em μm . Eixo x: tempo em dias pós lesão eletrolítica: experimental (n=5), controle(n=5) e branco (n=3). $p < 0,001$; barra=intervalo de confiança.

Os dados do 15º dia também indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos ($F_{2,12}=62,8$; $p < 0,001$). A avaliação *post-hoc* grupo a grupo, com correção de Bonferroni revelou que o grupo experimental apresentava uma espessura significativamente menor que o controle ($t=6,89$; $p < 0,001$) e que o branco ($t=10,95$; $p < 0,001$). Assim como o grupo controle que também apresentou uma espessura significativamente menor que o grupo branco ($t=4,98$; $p < 0,001$) (**Figura 26**).

Figura 26 - Espessura da retina após 15 dias da lesão no colículo superior

Legenda: Eixo y: médias da espessura das retinas em μm . Eixo x: tempo em dias pós lesão eletrolítica: experimental (n=5), controle(n=5) e branco (n=3); $p < 0,001$; barra= intervalo de confiança.

Por fim, os dados do 45º dia, também indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos ($F_{2,12}=274,1$; $p < 0,001$). A comparação *post-hoc* grupo a grupo, com correção de Bonferroni mostrou que o grupo experimental apresentava uma espessura significativamente menor que o controle ($t=13,31$; $p < 0,001$) e que o branco ($t=23,13$; $p < 0,001$). E mais uma vez, o grupo controle apresentou uma espessura significativamente menor que o grupo branco ($t=11,6$; $p < 0,001$) (**Figura 27**).

Figura 27 - Espessura da retina após 45 dias da lesão no colículo superior

Legenda: Eixo y: médias da espessura das retinas em μm . Eixo x: tempo em dias pós lesão eletrolítica: experimental (n=5), controle (n=5) e branco (n=3); $p < 0,001$; barra= intervalo de confiança.

Realizamos também ANOVA de 2 vias, tendo como variável dependente a espessura da retina e como variáveis independentes o tempo de lesão e o grupo (experimental vs. controle). Nessa análise, não se observou um efeito principal de tempo ($F_{2,26}=2,9$; $p=0,07$), de forma que o tempo de lesão não influenciou na espessura da retina. Isto também foi constatado quando se analisou o grupo experimental ($F_{2,14}=2,63$; $p=0,11$) e controle ($F_{2,14}=3,16$; $p=0,08$) separadamente.

A segunda análise realizada para avaliar a degeneração de células ganglionares neste modelo, foi o cálculo da densidade celular na retina periférica e central entre o grupo experimental, controle e branco. Também foram estudados 15 animais, divididos entre os 3 tempos após a lesão do colículo superior, e três animais para o grupo branco.

O cálculo de densidade celular na periferia da retina mostrou que na comparação entre os grupos experimental, controle e branco, não houve diferenças significativas após 7 dias ($F_{2,12}=0,94$; $p=0,42$) e 15 dias ($F_{2,12}=2,15$; $p=0,17$) da lesão no colículo superior. Contudo, no 45º dia, foi observada uma diferença significativa entre os grupos ($F_{2,12}=129,68$; $p < 0,001$). A análise *post-hoc* com correção de Bonferroni revelou que o grupo experimental foi significativamente menor que o controle ($t=31,41$; $p < 0,001$) e que o branco ($t=10,32$; $p < 0,001$). Porém, os grupos

controle e branco não foram significativamente diferentes entre si ($t=0,03$; $p=0,97$) (Figura 28).

Figura 28 - Densidade celular na periferia da retina murina após 7,15 e 45 dias da lesão no colículo superior

Legenda: No eixo y observamos os valores da densidade celular (número de células/ mm²) na periferia da retina. No eixo x, observamos os três diferentes tempos de lesão no colículo superior. Grupo experimental e controle ($n=5$) e grupo branco ($n=3$); $p<0,001$ entre o grupo experimental no 45º dia e o grupo branco; barra=intervalo de confiança.

Para a análise da densidade celular no centro da retina, não foram observadas diferenças entre os grupos no 7º ($F_{2,12}=1,63$; $p=0,24$) e no 15º ($F_{2,12}=2,66$; $p=0,12$) dias. Observamos, porém, uma diferença entre os grupos no 45º dia ($F_{2,12}=235,63$; $p<0,001$). A análise *post-hoc* com correção de Bonferroni revelou que o grupo experimental foi significativamente menor que o controle ($t=30,60$; $p<0,001$) e que o branco ($t=14,28$; $p<0,001$). Esta diferença não foi observada entre os grupos controle e branco ($t=1,04$; $p=0,33$) (Figura 29).

Figura 29 - Densidade celular no centro da retina murina após 7,15 e 45 dias da lesão no colículo superior

Legenda: Eixo y: densidade celular (número de células/ mm²) no centro da retina. Eixo x: tempo em dias pós lesão eletrolítica do colículo superior. Grupos experimental e controle (n=5) e grupo branco (n=3); p<0,001 entre grupo experimental no 45º dia e o grupo branco; barra=intervalo de confiança.

Para verificar se a densidade celular final foi significativamente menor na comparação entre centro e periferia para os 3 grupos, realizou-se uma ANOVA de 2 vias, com as variáveis dependentes "localização" (centro e periferia) e "grupo" (branco, experimental e controle). Observou-se efeitos principais de localização ($F_{1,20}=193,81$; $p<0,001$), grupo ($F_{2,20}=210,18$; $p<0,001$) e interação entre "grupo e localização" ($F_{2,20}=19,36$; $p<0,001$). Na análise dos contrastes, comparando-se o grupo experimental e controle (vs. branco) em relação à localização, observou-se uma diferença significativa entre experimental e branco ($t_{1,20}=26,31$; $p<0,001$), mas não entre controle e branco ($t_{1,20}=0,21$; $p<0,65$). Em outras palavras, a diferença entre a densidade de centro e periferia foi significativamente menor para o grupo experimental do que para o grupo controle. Observa-se pelo gráfico (**Figura 30**) que tal diminuição da diferença ocorreu pela perda mais acentuada de células periféricas no grupo experimental.

Figura 30 - Comparação entre a densidade celular no centro e periferia da retina murina após 45 dias de lesão no colículo superior

Legenda: Eixo y: densidade celular (número de células/ mm²) da retina. Eixo x: os três grupos de estudo: experimental e controle (n=5) e branco (n=3); $p < 0,001$ entre o grupo experimental e branco na periferia e no centro da retina, $p = ns$ entre o grupo controle e branco em ambas regiões; barra= intervalo de confiança.

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo de degeneração retrógrada de células ganglionares

O objetivo principal deste estudo foi analisar a distribuição dos NFs e MAP-2 na retina humana e murina de um modelo com degeneração das RGCs sem interferência do aumento da PIO. Para facilitar o entendimento deste capítulo, optamos por primeiro discutir os resultados sobre a viabilidade do modelo, antes de descrever os resultados relacionados às proteínas estruturais.

O motivo de escolha do modelo experimental de degeneração retrógrada de RGCs por lesão eletrolítica no colículo superior é que nele não há interferência na PIO, podendo ser usado, desta maneira, como modelo de glaucoma de pressão normal.

Diversos trabalhos experimentais têm debatidos os efeitos do aumento da PIO na morte das RGCs, assim como os mecanismos envolvidos neste processo³. Entretanto, no glaucoma de pressão normal, o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na morte destas células continua sendo um desafio¹⁰⁵. Por outro lado, não existe uma padronização de modelos experimentais para o glaucoma de pressão normal, gerando uma limitação na compreensão da fisiopatologia desta doença.

Todavia, nos modelos animais com lesão no colículo superior, ocorre uma diminuição dos fatores tróficos em direção ao corpo celular das células ganglionares, interrompendo as sinapses de seus axônios e promovendo morte celular de forma crônica^{106,107}. Isso permite o uso deste modelo para o estudo de neuropatias ópticas sem o aumento da PIO, como o glaucoma de pressão normal.

Para confirmar se o modelo animal com lesão eletrolítica no colículo superior era realmente viável para estudar degeneração de células ganglionares, como sugerido pela literatura^{91,106}, realizamos a análise da espessura da retina e da densidade celular na GCL comparando o grupo experimental e seu respectivo controle, além do grupo branco nos 3 tempos após a lesão.

A análise temporal da média da espessura das retinas mostrou que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental, controle e branco (**Figuras 25, 26 e 27**), porém esta diferença não foi significativa entre os

tempos avaliados, logo não houve interferência do tempo na diminuição da espessura retiniana no grupo experimental.

Além disso, observamos que houve diferença na média da espessura retiniana, entre os grupos controle e branco, ou seja, a espessura da retina no grupo experimental foi menor do que no grupo controle e menor do que o grupo branco, mostrando que o respectivo controle de cada olho do grupo experimental (olho contra-lateral à lesão) curiosamente também foi afetado pela lesão (**Figuras 25, 26 e 27**).

Ao avaliarmos densidade de células por mm^2 de área da retina, observamos que tanto na região periférica como central houve uma diminuição estatisticamente significativa da densidade celular entre o grupo experimental em relação aos grupos controle e branco, apenas no 45º dia após a lesão no colículo superior ($p < 0.001$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na densidade celular entre os grupos controles e branco ($p = 0,33$) (**Figura 28 e 29**), como observadas na espessura da retina (**Figuras 25, 26 e 27**). Além disso, notou-se que a diminuição de RGCs na periferia foi maior do que no centro (**Figura 30**).

Os dados obtidos com a espessura retiniana são semelhantes aos dados descritos por Yang et al. (2013). Em seu estudo, foram utilizados camundongos C57BL/6J submetidos à aspiração do colículo superior avaliados até 4 meses após o procedimento. A medida da espessura da retina foi feita através da tomografia de coerência óptica nos animais ainda vivos e mostrou-se significativamente menor no grupo experimental⁹¹.

Após 4 meses da aspiração do colículo superior, os camundongos foram sacrificados e um ensaio imuno-histoquímico utilizando o anticorpo para Brn3b foi realizado na retina destes animais, mostrando que não houve diferença na densidade celular na GCL entre os grupos⁹¹. Entretanto, em nosso estudo, mostramos que após 45 dias da lesão eletrolítica no colículo superior, houve uma diminuição na densidade de células na GCL na periferia e centro da retina do grupo experimental (**Figuras 28 e 29**).

Outros autores, usando modelo animal com aumento da PIO, também apoiam a ideia de que a degeneração das RGCs têm duas fases: a primeira envolve a atrofia destas células afetando a espessura da retina, enquanto a segunda envolve um insulto nos axônios, o que provoca a degeneração de partes do axônio distais à cabeça do nervo óptico, mas não causa a morte imediata das RGCs^{108,109}.

Além disso, Vickers et al. (1995) sugerem que muitos dos circuitos intrínsecos da retina permanecem relativamente intactos em um modelo experimental com aumento da PIO em macacos. Entretanto, ocorre morte das RGCs, caracterizadas como células M, inicialmente na periferia da retina⁶³.

Esses dados estão de acordo com os nossos resultados, onde mostramos que na fase mais crônica da lesão ocorre morte das RGCs e esta morte é mais acentuada na periferia da retina (**Figura 30**). No entanto não identificamos qual o tipo celular da GCL foi afetado na periferia. A princípio queríamos ter uma noção do que estava acontecendo em toda a retina e para isso usamos como marcador a calretinina, que marca aproximadamente 90% das células ganglionares⁹⁸; no entanto, este anticorpo também marca células amácrinas deslocadas na GCL¹¹⁰, e estas podem ter sido contadas ou confundidas com RGCs em nossa amostra. Porém, acreditamos que isso não tenha sido um fator limitante para nossa análise, uma vez que as amácrinas deslocadas correspondem a 2% do total das células na GCL em camundongos⁵⁰. Uma forma de excluir esse tipo celular da amostra, seria realizar duplas marcações utilizando anticorpos específicos para as células ganglionares e calretinina na mesma retina.

Contudo, podemos dizer que o nosso modelo experimental mostrou ser um bom modelo para estudar a degeneração crônica de células ganglionares, fornecendo a possibilidade de avaliar os mecanismos que precedem a morte celular na GCL, na fase precoce do glaucoma. Tal possibilidade é de extrema importância para estudar intervenções terapêuticas que promovam neuroproteção das células ganglionares e reversibilidade do dano neuronal.

6.2 O olho ipsolateral à lesão: um bom controle?

O uso do olho ipsolateral como controle em estudos sobre distúrbios visuais em modelos experimentais com roedores têm sido descrito na literatura^{3,5,6,18,111,112}, uma vez que, em roedores, 95% das fibras axonais convergem no quiasma óptico, enquanto apenas 5% permanecem ipsolaterais³⁰.

No entanto, em nosso estudo, na análise da espessura da retina, observamos que a espessura no grupo controle também sofreu variação assim como o grupo experimental quando comparadas ao grupo branco (**Figuras 25, 26, 27**). De fato, é

possível notar nos ensaios de imuno-histoquímica que houve variação dos NFs e MAP-2 no grupo controle em relação ao grupo branco (**Figuras 17, 18, 19 e 20**).

Como tínhamos por objetivo avaliar se possíveis alterações nos NFs e MAP-2 estariam envolvidas aos mecanismos associados à atrofia da retina antes da morte neuronal, observada no 45º dia após a lesão, achamos prudente discutir os nossos resultados da análise das proteínas estruturais usando o grupo branco como comparação. Logo, consideramos que neste modelo o uso do olho ipsolateral como controle não seria adequado para avaliar alterações precoces na fisiopatologia da lesão.

Hernandes (2011) também mostrou que a enucleação do globo ocular pode afetar de maneira assimétrica áreas visuais primárias tanto contralaterais quanto ipsolaterais à lesão, neste caso, inviabilizando a utilização do lado ipsolateral à lesão como controle¹¹³. Entretanto, a literatura não fornece ferramentas para entender por que lesões em 5% das fibras que não cruzam no quiasma óptico afetariam de forma significativa os achados na retina do olho ipsolateral à lesão.

Uma possível explicação em nosso estudo é que como a lesão eletrolítica não atingiu toda a estrutura do colículo superior (**Figura 5**), afetando retrogradamente apenas fibras de regiões retinianas correspondentes, é possível que a área lesionada tenha abrangido mais seletivamente as fibras ipsolaterais, desta forma, comprometendo as retinas do grupo controle.

Para este estudo, o fato da lesão não ter atingindo todo colículo superior afetando determinadas fibras, permitiu que pudéssemos estudar alterações iniciais da lesão que possivelmente estão envolvidas nos estágios iniciais do glaucoma^{108,109}.

6.3 Proteínas estruturais na retina humana

A análise com imuno-histoquímica para PAN e MAP-2 na retina humana mostrou que ambos marcadores foram encontrados em células de corpo celular grande na GCL (**Figuras 7 e 14**).

As células ganglionares marcadas pelos anticorpos têm semelhanças morfológicas com as células do tipo M, segundo a classificação de Kolb et al. (1992) para retina humana²⁶. Estas células apresentam corpo celular grande que aumenta de tamanho progressivamente a medida que se afastam do centro da retina em

direção à periferia. O mesmo também é observado com tamanho da árvore dendrítica destas células²⁶.

Os dendritos das células do tipo M estratificam no estrato 2 e 3 da IPL, camada *OFF* e *ON* respectivamente²⁶. Em nosso estudo, a ramificação dendrítica das células marcadas para o PAN ocorreu no estrato 2, e as células marcadas para o MAP 2, nos estratos 2 e 3 da IPL (**Figuras 8A e 16D**).

O motivo de termos escolhido a classificação proposta por Kolb et al. (1992), é que esta foi baseada na análise da morfologia celular usando como critério o tamanho do corpo celular e de sua árvore dendrítica, assim como sua ramificação na IPL. Além disso, as análises foram feitas em retinas processadas para montagens planas, utilizando o método de impregnação por Golgi²⁶.

Estudos com primatas não-humanos mostram que as células do tipo M correspondem a 10% do total das células ganglionares e projetam seus axônios para a camada magnocelular do núcleo geniculado lateral⁴⁴. Na espécie humana, estudos *in vitro* utilizando técnicas de injeção intracelular mostram que aproximadamente 21% das células ganglionares apresentam esta característica⁴⁰.

Com relação à análise da distribuição de neurofilamentos na retinas humanas, Straznicky et al. (1992) mostraram que células na GCL marcadas com um anticorpo para aos 3 tipos de neurofilamentos formam linhas de isodensidade dispostas de forma concêntrica ao redor da fóvea¹⁷, da mesma forma como foi demonstrado em nosso estudo (**Figura 9**). Entretanto, estas células, classificadas como *Shrub*³⁸, apresentam um corpo celular menor do que as células marcadas para neurofilamentos em nossos resultados (**Tabela 4 e Figura 7**).

Segundo Polyak (1941), as células *Shrub* apresentam corpo celular grande e arborizam exclusivamente na sublâmina *OFF*. No entanto, esta classificação se baseia na análise morfológica de células na GCL em cortes verticais³⁸, não sendo possível realizar de forma adequada a medida da área dendrítica destas células. Por este motivo, a classificação proposta por Kolb et al. (1992) seria mais adequada para descrevermos o tipo celular marcado por neurofilamentos²⁶.

Contudo, a melhor maneira de classificar as células na GCL é através de estudos com marcadores retrógrados introduzidos nas estruturas supra-quiasmáticas^{114,115}, o que obviamente por questões éticas, não podem ser aplicados em estudos com a espécie humana.

Outra metodologia que tem se mostrado bastante promissora, é uso de injeções intracelulares em estudos *in vitro*^{40,43,116,117}. Entretanto, esta técnica não pôde ter sido utilizada em nosso estudo, pois o tempo entre a morte do doador e o acesso aos globos oculares foi superior a 7 horas (**Tabela 1**), inviabilizando os estudos *in vitro*.

A análise imuno-histoquímica dos 3 tipos de neurofilamentos isoladamente mostrou a presença de NF-H no corpo celular de células na GCL, e fibras na NFL (**Figuras 11B e 11C**). Além das estruturas citadas, o NF-L também foi encontrado na arborização dendrítica na IPL e em células deslocadas na INL, sendo o neurofilamento com maior distribuição na retina humana (**Figuras 10B e 10C**). Porém, não encontramos marcação imuno-histoquímica com NF-M (**Figura 8B**).

Estes resultados discordam dos achados por Ruiz-Ederra et al. (2004), que mostraram o NF-H e o NF-M presentes tanto no corpo celular de RGCs, quanto em processos na IPL, e a marcação do NF-L mais restrita ao corpo celular na GCL. De acordo com os autores, o NF-H e NF-M foram os marcadores com maior distribuição na retina humana¹⁸.

Com base nos nossos resultados obtidos com a imuno-histoquímica e as divergências com a literatura existente, optou-se por usar a técnica de PCR em tempo real para investigar a expressão do RNAm dos NFs separadamente.

Esta metodologia permitiu mostrar que o NF-L foi o gene mais expresso na região central e periférica da retina, corroborando com os nossos resultados na imuno-histoquímica. Em seguida, o NF-M foi o segundo gene mais presente, seguido pelo NF-H (**Figuras 12 e 13**).

Como mencionado anteriormente, não obtivemos marcação na imuno-histoquímica NF-M (**Figura 8B**), porém detectamos o seu RNAm nos ensaios com PCR em tempo real (**Figuras 12 e 13**). Acreditamos que a provável explicação para isso é que esse neurofilamento é expresso em homodímero, mas conjugado a outro neurofilamento, como o NF-L⁵⁹. É possível que o epítipo que o anticorpo reconhece estivesse mascarado pela estrutura tridimensional em consequência de sua inserção entre os demais neurofilamentos constituintes da estrutura morfológica, prejudicando desta forma, a sua detecção na imuno-histoquímica. Ensaios com *Western blot* podem esclarecer melhor uma correlação entre a expressão gênica e proteica do NF-M.

A análise da distribuição do MAP 2 mostrou que a densidade de células na GCL também decresce em direção à periferia (**Figura 15**). Essas células também se assemelham com as células do tipo M que projetam seus axônios para via magnocelular no núcleo geniculado lateral (**Figura 14 e Tabela 5**)²⁶.

Estudos com modelos experimentais de glaucoma envolvendo o aumento da PIO têm demonstrado que as células do tipo M são inicialmente afetadas, havendo consequentemente a diminuição da densidade celular deste grupo de neurônios, principalmente na região periférica da retina^{63,118,119}. A causa da morte destas células pode ser em decorrência da inibição do transporte axonal anterógrado e retrógrado¹²⁰⁻¹²².

A inibição do transporte axonal anterógrado afeta o transporte de organelas, mitocôndrias e substâncias necessárias para a manutenção do axônio distal e da sinapse. No transporte retrógrado, ocorre a diminuição da distribuição de fatores tróficos para a manutenção do neurônio¹.

Sabe-se que os microtúbulos e neurofilamentos participam do transporte axonal das RGCs¹. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de NFs e MAPs na fisiopatologia do glaucoma em modelos experimentais, antes da morte de RGCs^{4-6,16}. Logo, nossos resultados sobre a caracterização dos NFs e MAPs na retina humana mostram que os achados na literatura com modelos animais podem ser extrapolados aos seres humanos.

É de grande relevância correlacionarmos os estudos nas ciências básicas com os estudos clínicos, uma vez que segundo a Quigley e Broman (2006), existem 65 milhões de casos de glaucoma em todo o mundo, sendo que, a cada ano, surgem mais 2,4 milhões de casos. A prevalência de cegueira por glaucoma é de 5,2 milhões de pessoas, representando a segunda causa de cegueira no mundo e a maior causa de cegueira irreversível².

Quanto ao glaucoma sem o aumento da PIO, o glaucoma de pressão normal, a literatura mundial apresenta dados controversos e antigos quanto a sua incidência, que pode variar de 6,7 a 65%^{123,124}. Além disso, Quigley (2004) chega afirmar que, não sendo mais a PIO critério para definição do glaucoma, o termo glaucoma de pressão normal não faria sentido¹²⁵. Atualmente existem duas coortes multicêntricas que investigam fatores de risco e dados epidemiológicos sobre o glaucoma de pressão normal: o *Low Pressure Glaucoma Treatment Study* (LoGTS)¹²⁶ e *Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study* (CNTGS)¹²⁷. No entanto, até o

presente momento, nenhum achado foi conclusivo.

6.4 Proteínas estruturais na retina murina

Também realizamos ensaios imuno-histoquímicos utilizando PAN e MAP-2 em retinas de camundongos no modelo experimental de degeneração de células ganglionares, por meio de lesão eletrolítica do colículo superior. Com relação ao PAN, a análise de densidade óptica integrada mostrou que houve uma diminuição da marcação nas camadas NFL e GCL da retina, ao comparar os cortes verticais do grupo experimental ao grupo branco (**Figura 18**), sendo que quanto mais crônico o período pós-lesão (45º dia), maior a perda de marcação do PAN no grupo experimental (**Figuras 17 e 18**).

Os nossos dados estão de acordo com a literatura que mostra a diminuição de neurofilamentos em modelos experimentais de glaucoma com aumento da PIO^{4,6,16}. No entanto, esses estudos avaliaram a diminuição de neurofilamentos apenas nos axônios das RGCs, e nenhum deles avaliou a retina por completo em si. Porém, como as células ganglionares formam os axônios que irão compor o nervo óptico^{19,20}, e em nosso estudo houve uma degeneração retrógrada das RGCs em virtude da lesão do colículo superior, o que afeta o transporte axonal dessas células, sugerimos que a diminuição de neurofilamentos no grupo experimental pode decorrer da deficiência no transporte axonal e da degeneração dos axônios das RGCs.

Em um estudo em que se avaliou neurofilamentos fosforilados, Soto et al. (2011) demonstraram redução dessa proteína após 10 dias de PIO elevada em ratos nos axônios das RGCs. Além disso, observaram uma marcação fraca em outras regiões, como no corpo celular e nos dendritos das RGCs, enquanto que nos animais controles somente foi observada marcação de NFs fosforilados nos axônios das RGCs¹⁰⁹. Sabe-se que os NFs encontram-se desfosforilados no corpo celular e em dendritos de neurônios e fosforilados nos axônios¹⁶.

A fosforilação pode rapidamente modificar a função de proteínas e enzimas, sem necessariamente mudar os níveis de suas expressões. Sendo assim, as células apresentam um estado de equilíbrio entre as proteínas quinase, fosfatases (ativadas ou desativadas) e os substratos protéicos (fosforilado ou desfosforilado). Esse sistema de controle permite que vários sinais de diferentes sinapses passem a ser

integrados, variando o estado de fosforilação da proteína desde o mínimo possível até o máximo de fosforilação. O processo é bidirecional e pode sofrer potenciação ou inibição de acordo com *steady-state* (estado basal) bioquímico da célula. Tais modificações são sugeridas como um dos possíveis alicerces dos processos de plasticidade celular observados no sistema nervoso central¹²⁸. Logo, a redistribuição da marcação de NFs fosforilados nas células ganglionares e seus dendritos parece estar relacionada ao aumento da plasticidade das RGCs e axônios, normalmente vista quando os neurônios são fisicamente desconectados de seus alvos sinápticos^{108,109}.

Em nosso estudo, o anticorpo para detecção dos neurofilamentos não diferencia formas fosforiladas e defosforiladas, bem como os três diferentes tipos de NFs. Entretanto, com base nos estudos citados, seria interessante refinar essa análise no nosso modelo experimental e assim observar se ocorre a mesma redistribuição destes marcadores nas RGCs como observada por Soto et al. (2011).

Além disso, outro estudo em macacos apresentando glaucoma com aumento da PIO, mostrou que RGCs imunorreativas para os NFs representam uma grande proporção das células que degeneram em olhos glaucomatosos, particularmente nas regiões periféricas da retina⁶³.

Já em relação à marcação imuno-histoquímica para MAP-2, observamos um aumento da marcação nas camadas GCL e IPL por meio da análise de densidade óptica integrada nos cortes verticais das retinas do grupo experimental comparados ao grupo branco. Esse aumento foi observado a partir do 7º dia de lesão, no entanto, no 15º dia, a marcação com MAP-2 chegou a ser 4X maior no grupo experimental do que no grupo branco, diminuindo no 45º dia (**Figura 19 e 20**).

A literatura mostra que em modelos experimentais de glaucoma com aumento da PIO há uma diminuição de microtúbulos⁵ e MAPs⁴ nos axônios das RGCs. Entretanto, esses estudos não mostram alterações em outras camadas celulares da retina. É possível que o aumento do MAP-2 na GCL e IPL mostrados em nossos resultados estejam correlacionados ao aumento da arborização dendrítica das RGCs como resposta compensatória a degeneração das mesmas. Sabe-se que MAP-2 atua como proteína estabilizadora de microtúbulos, capaz de reduzir o dano neuronal participando na formação de neuritos no processo de polarização celular^{129,130}.

Além disso, em estudos com modelos animais apresentando isquemia cortical, o aumento da imunorreatividade para MAP-2 nas áreas corticais perilesionais poderia ser indicativo da reestruturação dendrítica compensatória dos neurônios remanescentes^{131,132}. Esses achados sugerem que o MAP-2 esteja envolvido na estabilização e manutenção dos circuitos neurais no cérebro maduro¹³³. Portanto, a atividade dendrítica pode estar presente pelo efeito fisiológico de reestruturação espontânea das redes neurais remanescentes após o dano neuronal¹³⁴.

No entanto, contraditoriamente aos dados obtidos pela imuno-histoquímica, a avaliação dos níveis de RNAm do MAP-2 no grupo experimental apresentou-se mais baixo no grupo experimental 7 e 15 dias após a lesão no colículo superior em relação ao grupo branco. Após 45 dias, não houve diferenças significativas entre o grupo experimental e grupo branco (**Figura 24**). É possível que a diminuição dos níveis de RNAm esteja relacionado à possibilidade de seu *steady-state* ser controlado por outros fatores diferentes da transcrição. De fato, Safaei e Ficher (1989) mostraram que os níveis de RNAm do MAP-2 estão diminuídos no cérebro adulto de rato, enquanto os níveis da proteína continuam alto, quando comparados aos cérebros de ratos em desenvolvimento. Um possível motivo para essa discordância seria a mudança na estabilidade das moléculas de MAP-2 durante o desenvolvimento. O MAP-2 no cérebro adulto está fortemente associado com citoesqueleto estável e, como resultado, essas proteínas tem menor taxa de replicação. Nessas condições, menor quantidade do RNAm é necessária para manter o nível estacionário dessa proteína¹³⁵. Em concordância com essa teoria, há estudos que demonstram que as proteínas MAP-2 estão associadas a microtúbulos estáveis nos dendritos de neurônio maduros^{136,137}.

Esses achados na literatura reforçam os nossos resultados, uma vez que o aumento da marcação do MAP-2 na imuno-histoquímica ocorre no 7º e 15º dia de lesão quando comparados ao branco. Nesses mesmos tempos, observamos uma diminuição dos níveis de RNAm em comparação ao grupo branco (**Figuras 19 e 20**). No 45º dia da lesão, observamos uma queda na marcação do MAP-2 em relação a 15 dias após a lesão. Após 45 dias da lesão, parece haver uma “recuperação” dos níveis do RNAm no grupo experimental, não havendo diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo branco (**Figura 24**).

Com relação à análise do PCR em tempo real para NFs, também obtivemos resultados em direção oposta aos resultados mostrados na imuno-histoquímica. No entanto, vale ressaltar que nos ensaios imuno-histoquímicos, a avaliação dos NFs foi feita através do anti - PAN que reconhece os três tipos de subunidades do NFs (baixo, médio e alto peso molecular), enquanto que nos ensaios com PCR em tempo real, avaliamos cada neurofilamento isoladamente. Tendo em vista isso, podemos dizer que os níveis de RNAm do NF-H não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo branco em todos os tempos avaliados (**Figura 21**). Já, os níveis de RNAm do NF-M foram maiores no grupo experimental apenas 45 dias após a lesão quando comparados ao grupo branco (**Figura 22**). E os níveis de RNAm do NF-L no grupo experimental foram maiores 7 e 45 após a lesão em relação ao branco (**Figura 23**).

Szaro e Strong (2010) discutem que mudanças nos níveis de RNAm dos NFs dependem criticamente de regulações pós-transcricionais, controlando assim o transporte, tradução e estabilidade do RNAm dos NFs. Esse controle é usado pelas células para coordenar a expressão das proteínas funcionais no lugar e no momento certo. Além disso, os mecanismos pós-transcricionais modulam o aumento da transcrição gênica dos NFs para produzir o padrão final da expressão da proteína durante a regeneração de axônios. O mesmo é observado na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica¹³⁸.

Embora as diferenças entre os níveis de RNAm e a marcação da proteína de NFs e MAP-2 encontradas neste estudo apresentem explicações plausíveis na literatura, não podemos desconsiderar uma possível limitação técnica neste estudo. A marcação das proteínas de NFs e MAP-2 é restrita às camadas na retina como a NFL e GCL + IPL, respectivamente, enquanto que a extração do RNAm é realizada em toda a retina. O ideal seria a realização da técnica de hibridização *in situ*, para correlacionar o nível de RNAm das proteínas no local onde há mudanças na marcação das proteínas demonstradas através dos ensaios imuno-histoquímicos.

Contudo, pode-se afirmar que, neste estudo, as alterações de NFs e MAP-2 ocorrem antes da morte das RGCs provocada retrogradamente por lesão eletrolítica no colículo superior. Estes podem ser usados como marcadores precoces do dano neuronal ocasionado pelo glaucoma sem interferência do aumento da PIO e com aumento da PIO, o que já foi descrito previamente na literatura.

Por último, os NFs e MAP-2 marcam células ganglionares do tipo M em

retinas humanas, que são as células mais suscetíveis à morte neuronal no glaucoma. Sendo assim, podemos concluir que possivelmente alterações nos NFs e MAP-2 também sejam precoces no glaucoma em seres humanos, abrindo possibilidades para estratégias terapêuticas focadas na regulação dos NFs e de MAP-2.

7 CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que em retinas murinas de um modelo experimental de degeneração retrógrada de RGCs, a marcação para os NFs e MAP-2 está diminuída nas camadas NFL e aumentada na IPL e GCL, respectivamente. Enquanto que os níveis de RNAm do NFs estão aumentados e dos MAP-2 diminuídos. Também observamos que os NFs e MAP-2 estão presentes em células do tipo M nas retinas humanas sem alterações patológicas.

Além disso, no modelo de degeneração retrógrada de RGCs por lesão eletrolítica no colículo superior, houve uma diminuição da espessura da retina dos grupos experimentais em todos os tempos estudados (7, 15 e 45 dias após a lesão) e morte celular no 45º dia de lesão tanto no centro como na periferia da retina, sendo a morte celular mais acentuada na região periférica.

REFERÊNCIAS¹

1. Morrison JC, Plollack PI. Glaucoma: Science and Practice. New York: Thieme; 2003.
2. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006 Mar;90(3):262-7.
3. Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, Liu H, Rojas M, Xu Z, et al. Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8123-31.
4. Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Cringle SJ, Yu DY. Time-dependent effects of elevated intraocular pressure on optic nerve head axonal transport and cytoskeleton proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Mar;49(3):986-99.
5. Huang X, Kong W, Zhou Y, Gregori G. Distortion of axonal cytoskeleton: an early sign of glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 May;52(6):2879-88.
6. Fu CT, Sretavan D. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Feb;51(2):980-90.
7. Susanna RM, Medeiros FA. Nervo óptico no glaucoma. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2007.
8. Shields MB. Open-angle glaucoma. In: Wikins MW, editor. *Textbook of Glaucoma*. Baltimore; 1998.
9. Caprioli J. The treatment of normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*. [Comment Editorial Review]. 1998 Oct;126(4):578-81.
10. Tezel G, Kass MA, Kolker AE, Wax MB. Comparative optic disc analysis in normal pressure glaucoma, primary open-angle glaucoma, and ocular hypertension. *Ophthalmology*. 1996 Dec;103(12):2105-13.
11. Miller KM, Quigley HA. Comparison of optic disc features in low-tension and typical open-angle glaucoma. *Ophthalmic Surg*. 1987 Dec;18(12):882-9.
12. Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye (Lond)*. [Review]. 2004 Nov;18(11):1075-84.
13. Frank M, Wolburg H. Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve. *Glia*. 1996 Mar;16(3):227-40.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

14. King D, Drance SM, Douglas G, Schulzer M, Wijsman K. Comparison of visual field defects in normal-tension glaucoma and high-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1986 Feb 15;101(2):204-7.
15. Liu Q, Xie F, Siedlak SL, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, et al. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*. [Review]. 2004 Dec;61(24):3057-75.
16. Kashiwagi K, Ou B, Nakamura S, Tanaka Y, Suzuki M, Tsukahara S. Increase in dephosphorylation of the heavy neurofilament subunit in the monkey chronic glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jan;44(1):154-9.
17. Straznicky C, Vickers JC, Gabriel R, Costa M. A neurofilament protein antibody selectively labels a large ganglion cell type in the human retina. *Brain Res*. 1992 Jun 5;582(1):123-8.
18. Ruiz-Ederra J, Garcia M, Hicks D, Vecino E. Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2004 Feb 10;10:83-92.
19. Wassle H. Colour vision. A patchwork of cones. *Nature*. [Comment News]. 1999 Feb 11;397(6719):473, 5.
20. Rodieck RW. Visual pathways. *Annu Rev Neurosci*. 1979;2:193-225.
21. Dowling JE. Retinal neuromodulation: the role of dopamine. *Vis Neurosci*. 1991 Jul-Aug;7(1-2):87-97.
22. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):307-12.
23. Boycott B, Wassle H. Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. [Review]. 1999 Jun;40(7):1313-27.
24. Bharti K, Miller SS, Arnheiter H. The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Feb;24(1):21-34.
25. Cai X, Nash Z, Conley SM, Fliesler SJ, Cooper MJ, Naash MI. A partial structural and functional rescue of a retinitis pigmentosa model with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One*. 2009;4(4):e5290.
26. Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol*. 1992 Apr 8;318(2):147-87.
27. Lent R. Cem bilhões de neurônios. São Paulo: Atheneu; 2001.
28. Tavares IM, Mello PA. Normal tension glaucoma. *Arq Bras Oftalmol*. [Review]. 2005 Jul-Aug;68(4):565-75.

29. Purves D, Lotto B, Polger T. Color vision and the four-color-map problem. *J Cogn Neurosci*. 2000 Mar;12(2):233-7.
30. Drager UC, Olsen JF. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol*. 1980 Jun;191(3):383-412.
31. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1070-3.
32. Perry VH, Oehler R, Cowey A. Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience*. 1984 Aug;12(4):1101-23.
33. Kaas JH, Huerta MF, Weber JT, Harting JK. Patterns of retinal terminations and laminar organization of the lateral geniculate nucleus of primates. *J Comp Neurol*. 1978 Dec 1;182(3):517-53.
34. Hendry SH, Yoshioka T. A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science*. 1994 Apr 22;264(5158):575-7.
35. Hendry SH, Reid RC. The koniocellular pathway in primate vision. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:127-53.
36. Van Essen DC, Anderson CH, Felleman DJ. Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*. 1992 Jan 24;255(5043):419-23.
37. Sincich LC, Horton JC. The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:303-26.
38. Polyak SL. *The Retina*. The University of Chicago Press; 1941.
39. Brown JE, Major D. Cat retinal ganglion cell dendritic fields. *Exp Neurol*. [In Vitro]. 1966 May;15(1):70-8.
40. Dacey DM, Petersen MR. Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9666-70.
41. Rodieck RW, Binmoeller KF, Dineen J. Parasol and midget ganglion cells on the human retina. *J Comp Neurol*. 1985 Mar 1;233(1):115-32.
42. Watanabe M, Rodieck RW. Parasol and midget ganglion cells of the primate retina. *J Comp Neurol*. 1989 Nov 15;289(3):434-54.
43. Dacey DM. The mosaic of midget ganglion cells in the human retina. *J Neurosci*. 1993 Dec;13(12):5334-55.

44. Silveira LC, Perry VH. The topography of magnocellular projecting ganglion cells (M-ganglion cells) in the primate retina. *Neuroscience*. 1991;40(1):217-37.
45. Cavanaugh CR, Hilz R. Invariance of visual receptive-field size and visual acuity with viewing distance. *J Opt Soc Am*. 1973 Aug;63(8):929-33.
46. Merigan WH. Temporal modulation sensitivity of macaque monkeys. *Vision Res*. 1980;20(11):953-9.
47. Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. 2002 Sep 16;451(2):115-26.
48. Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH. Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol*. 2005 Aug 29;489(3):293-310.
49. Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience*. 2006 Jun 19;140(1):123-36.
50. Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA. Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2009 Feb 10;512(5):664-87.
51. Borgonovo B, Ouwendijk J, Solimena M. Biogenesis of secretory granules. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Aug;18(4):365-70.
52. Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays*. [Review]. 2003 Apr;25(4):346-55.
53. Hoffman PN, Cleveland DW, Griffin JW, Landes PW, Cowan NJ, Price DL. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(10):3472-6.
54. Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2008 Aug;38(1):27-65.
55. Vickers JC, Costa M. The neurofilament triplet is present in distinct subpopulations of neurons in the central nervous system of the guinea-pig. *Neuroscience*. 1992 Jul;49(1):73-100.
56. Mikuni N, Babb TL, Chakravarty DN, Chung CK. Postnatal expressions of non-phosphorylated and phosphorylated neurofilament proteins in the rat hippocampus and the Timm-stained mossy fiber pathway. *Brain Res*. 1998 Nov 16;811(1-2):1-9.
57. Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol*. 1993 Sep;122(6):1337-50.
58. Lopez-Picon F, Puustinen N, Kukko-Lukjanov TK, Holopainen IE. Resistance of neurofilaments to degradation, and lack of neuronal death and mossy fiber

sprouting after kainic acid-induced status epilepticus in the developing rat hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2004 Dec;17(3):415-26.

59. Carter J, Gragerov A, Konvicka K, Elder G, Weinstein H, Lazzarini RA. Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5101-8.

60. Drager UC, Edwards DL, Barnstable CJ. Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J Neurosci.* 1984 Aug;4(8):2025-42.

61. Shaw G, Debus E, Weber K. The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates. *Eur J Cell Biol.* 1984 May;34(1):130-6.

62. Volgyi B, Bloomfield SA. Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 2002 Nov 18;453(3):269-79.

63. Vickers JC, Schumer RA, Podos SM, Wang RF, Riederer BM, Morrison JH. Differential vulnerability of neurochemically identified subpopulations of retinal neurons in a monkey model of glaucoma. *Brain Res.* 1995 May 22;680(1-2):23-35.

64. Poulain FE, Sobel A. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci.* 2010 Jan;43(1):15-32.

65. Tucker RP. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev.* 1990 May-Aug;15(2):101-20.

66. Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, Rubino H, Garner C, Shafit-Zagardo B. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 21;92(24):10894-8.

67. Ulitzur N, Rancano C, Pfeffer SR. Biochemical characterization of mapmodulin, a protein that binds microtubule-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997 Nov 28;272(48):30577-82.

68. Matus A. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci.* [Review]. 1994 Jan;17(1):19-22.

69. Cristofanilli M, Thanos S, Brosius J, Kindler S, Tiedge H. Neuronal MAP2 mRNA: species-dependent differential dendritic targeting competence. *J Mol Biol.* 2004 Aug 20;341(4):927-34.

70. Boucher M, Belanger D, Beaulieu C, Leclerc N. Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1999;42(4):257-73.

71. Gonzalez-Billault C, Owen R, Gordon-Weeks PR, Avila J. Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res.* 2002 Jul 5;943(1):56-67.
72. Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* [Review]. 1995 Feb;7(1):72-81.
73. Riederer B, Matus A. Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Sep;82(17):6006-9.
74. Charriere-Bertrand C, Garner C, Tardy M, Nunez J. Expression of various microtubule-associated protein 2 forms in the developing mouse brain and in cultured neurons and astrocytes. *J Neurochem.* 1991 Feb;56(2):385-91.
75. Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol.* 1984 Jun 20;226(2):203-21.
76. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1121-59.
77. Goedert M, Spillantini MG. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* [Review]. 2000 Jul 26;1502(1):110-21.
78. Huang XR, Knighton RW. Microtubules contribute to the birefringence of the retinal nerve fiber layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Dec;46(12):4588-93.
79. Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2004 Feb 4;24(5):1245-54.
80. Ballough GP, Martin LJ, Cann FJ, Graham JS, Smith CD, Kling CE, et al. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. *J Neurosci Methods.* 1995 Sep-Oct;61(1-2):23-32.
81. Garcia PC. Expressão de proteínas sinápticas e estruturais no sistema nervoso de ratos submetidos a diferentes modalidades de exercício físico [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Fisioterapia da Universidade da Cidade de São Paulo]. São Paulo: UNICID; 2012.
82. Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res.* 1992 Dec;33(4):505-12.
83. Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, Ivanko TL. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiol Learn Mem.* 2007 Mar;87(3):404-15.

84. Panagis L, Thanos S, Fischer D, Dermon CR. Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *Eur J Neurosci*. 2005 Apr;21(8):2305-9.
85. Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*. 1994 Jul;14(7):4368-74.
86. Leonelli M, Martins DO, Britto LR. Retinal cell death induced by TRPV1 activation involves NMDA signaling and upregulation of nitric oxide synthases. *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Apr;33(3):379-92.
87. Yoles E, Schwartz M. Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol*. [Review]. 1998 Jan-Feb;42(4):367-72.
88. Kreutz MR, Seidenbecher CI, Sabel BA. Molecular plasticity of retinal ganglion cells after partial optic nerve injury. *Restor Neurol Neurosci*. 1999;14(2-3):127-34.
89. Grosskreutz CL, Hanninen VA, Pantcheva MB, Huang W, Poulin NR, Dobberfuhr AP. FK506 blocks activation of the intrinsic caspase cascade after optic nerve crush. *Exp Eye Res*. 2005 May;80(5):681-6.
90. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, et al. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci*. 2008 Mar 12;28(11):2735-44.
91. Yang X, Chou TH, Ruggeri M, Porciatti V. A new mouse model of inducible, chronic retinal ganglion cell dysfunction not associated with cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Mar;54(3):1898-904.
92. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 1999 Jan;18(1):39-57.
93. Klocker N, Jung M, Stuermer CA, Bahr M. BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA--a supportive role for nitric oxide? *Neurobiol Dis*. 2001 Feb;8(1):103-13.
94. Tezel G, Yang J, Wax MB. Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Res Bull*. 2004 Feb 15;62(6):473-80.
95. Li Y, Semaan SJ, Schlamp CL, Nickells RW. Dominant inheritance of retinal ganglion cell resistance to optic nerve crush in mice. *BMC Neurosci*. 2007;8:19.

96. Torrao AS, Lindstrom JM, Britto LR. Presumptive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the chick tectum: effects of lesions of the lateral spiriform nucleus. *Brain Res.* 1996 Dec 16;743(1-2):154-61.
97. Rohrenbeck J, Wassle H, Boycott BB. Horizontal Cells in the Monkey Retina: Immunocytochemical staining with antibodies against calcium binding proteins. *Eur J Neurosci.* 1989 Sep;1(5):407-20.
98. Lee ES, Lee JY, Jeon CJ. Types and density of calretinin-containing retinal ganglion cells in mouse. *Neurosci Res.* 2010 Feb;66(2):141-50.
99. Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci.* 1990 Jul;5(1):1-16.
100. Mojumder DK, Wensel TG, Frishman LJ. Subcellular compartmentalization of two calcium binding proteins, calretinin and calbindin-28 kDa, in ganglion and amacrine cells of the rat retina. *Mol Vis.* 2008;14:1600-13.
101. Almeida CM. Citocinas e a sobrevivência de células ganglionares da retina de rato in vitro e in vivo. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009.
102. Paschon V, Higa GS, Resende RR, Britto LR, Kihara AH. Blocking of connexin-mediated communication promotes neuroprotection during acute degeneration induced by mechanical trauma. *PLoS One.* 2012;7(9):e45449.
103. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
104. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
105. Mozaffarieh M, Flammer J. New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* [Review]. 2013 Feb;13(1):43-9.
106. Perry VH, Cowey A. Changes in the retino-fugal pathways following cortical and tectal lesions in neonatal and adult rats. *Exp Brain Res.* 1979 Mar 9;35(1):97-108.
107. Cowey A, Alexander I, Stoerig P. Transneuronal retrograde degeneration of retinal ganglion cells and optic tract in hemianopic monkeys and humans. *Brain.* 2011 Jul;134(Pt 7):2149-57.
108. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci.* 2008 Jan 9;28(2):548-61.

109. Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Jan;52(1):434-41.
110. Haverkamp S, Inta D, Monyer H, Wässle H. Expression analysis of green fluorescent protein in retinal neurons of four transgenic mouse lines. *Neuroscience.* 2009 Apr 21;160(1):126-39.
111. Wang X, Sam-Wah Tay S, Ng YK. Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats. *Brain Res.* 2000 Sep 29;878(1-2):136-47.
112. Smith SA, Bedi KS. Unilateral enucleation of adult rats does not effect the synapse-to-neuron ratio within the stratum griseum superficiale of the superior colliculi. *Vision Res.* 1998 Oct;38(20):3041-50.
113. Hernandez MS. Geração de espécies reativas de oxigênio e neuroinflamação induzidas por enucleação ocular no sistema visual de ratos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
114. Dacey DM. Physiology, morphology and spatial densities of identified ganglion cell types in primate retina. *Ciba Found Symp.* 1994;184:12-28; discussion -34, 63-70.
115. Dacey DM. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:743-75.
116. Dacey DM, Lee BB. The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature.* 1994 Feb 24;367(6465):731-5.
117. Peterson BB, Dacey DM. Morphology of wide-field bistratified and diffuse human retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 2000 Jul-Aug;17(4):567-78.
118. Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Mar;32(3):484-91.
119. Dandona L, Hendrickson A, Quigley HA. Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991 Apr;32(5):1593-9.
120. Quigley HA, Addicks EM. Scanning electron microscopy of trabeculectomy specimens from eyes with open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1980 Dec;90(6):854-7.
121. Minckler DS, Spaeth GL. Optic nerve damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol.* [Case Reports]. 1981 Nov-Dec;26(3):128-48.

122. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol*. 1981 Apr;99(4):635-49.
123. Bankes JL, Perkins ES, Tsolakis S, Wright JE. Bedford glaucoma survey. *Br Med J*. 1968 Mar 30;1(5595):791-6.
124. Shiose Y, Ito T, Komuro K, Amano M. Prevalence and background of ocular hypertension and low tension glaucoma. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 1984 Apr;88(4):806-13.
125. Quigley HA. New paradigms in the mechanisms and management of glaucoma. *Eye* (Lond). 2004. Available from: <http://www.nature.com/eye/journal/vaop/ncurrent/full/>.
126. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Rosenberg LF, Ritch R, Yang JW. The Low-pressure Glaucoma Treatment Study (LoGTS) study design and baseline characteristics of enrolled patients. *Ophthalmology*. 2005 Mar;112(3):376-85.
127. Anderson DR, Drance SM, Schulzer M. Natural history of normal-tension glaucoma. *Ophthalmology*. 2001 Feb;108(2):247-53.
128. Queiroz CMT. Modulação da função neuronal por proteínas quinases e fosfases. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 2009.
129. Caceres A, Mautino J, Kosik KS. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*. 1992 Oct;9(4):607-18.
130. Tahirovic S, Bradke F. Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a001644.
131. Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P, et al. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience*. 1998 Jan;82(2):397-420.
132. Li Q, Callaghan M, Suprenant KA. The 77-kDa echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) shares epitopes with the mammalian brain MAPs, MAP-2 and tau. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 18;250(2):502-5.
133. Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*. 2004 Apr;35(4):992-7.
134. Gibb RL, Gonzalez CL, Wegenast W, Kolb BE. Tactile stimulation promotes motor recovery following cortical injury in adult rats. *Behav Brain Res*. 2010 Dec 6;214(1):102-7.
135. Safaei R, Fischer I. Regulation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) mRNA expression during rat brain development. *J Mol Neurosci*. 1989;1(3):189-98.

136. Olmsted JB, Asnes CF, Parysek LM, Lyon HD, Kidder GM. Distribution of MAP-4 in cells and in adult and developing mouse tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;466:292-305.
137. Matus A. Neurofilament protein phosphorylation--where, when and why. *Trends Neurosci.* [News Review]. 1988 Jul;11(7):291-2.
138. Szaro BG, Strong MJ. Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 2010 Jan;33(1):27-37.

APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA E ELETROFISIOLOGIA CELULAR
AV. AUGUSTO CORREA S/N BELÉM – PARÁ 66.075-110 - TEL. 91-2299130
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: *Estudo Imunohistoquímico da Retina Humana: Morfologia e Densidade de Neurônios Retinianos em Condições Normais e Patológicas*

ESCLARECIMENTOS DA PESQUISA:

A pesquisa de que trata este termo tem por objetivo estudar a organização estrutural de retinas humanas usando técnicas modernas de coloração, visando descrever aspectos morfológicos e numéricos dos seus componentes celulares assim como estabelecer como esses componentes se comunicam entre si. O material usado será a retina humana, a qual é um tecido fino e transparente localizado no fundo do olho e que é responsável pela captação do estímulo que em última análise nos permite ter o sentido da visão. A retina será obtida a partir da parte posterior do olho, depois que a córnea já tiver sido retirada para transplante. Posteriormente, a retina será corada para que os seus componentes celulares se tornem visíveis, dessa forma permitindo o estudo mencionado acima.

Os procedimentos de coleta e da pesquisa em si não oferecem nenhum risco ao doador, já que todas as etapas envolvidas serão realizadas após, e somente após, comprovada a morte do doador e somente mediante o consentimento explícito de familiares ou responsável legal do doador. Por outro lado, os resultados da pesquisa têm o potencial de oferecer benefícios à comunidade em geral já que podem fornecer conhecimentos básicos necessários para a compreensão de causas de problemas da visão e apontar caminhos para prevenção e tratamento de cegueira. Além disso, o estudo utilizará tecido remanescente do olho coletado para transplante de córnea, o qual, em outras circunstâncias, seria simplesmente desprezado.

Por meio deste, nós asseguramos que todas as informações referentes à participação do doador na pesquisa ficarão em total sigilo, e que danos provocados ao doador, comprovadamente, pela pesquisa serão amparados e/ou reparados. Fica aqui também explicitado que, a qualquer momento, o material coletado do doador poderá ser excluído da pesquisa se assim o desejarem os seus familiares ou representantes legais, sem haver qualquer forma de represália.

Dra. Elizabeth Sumi Yamada, M.D., Ph.D.

Coordenadora do Projeto

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Como responsável (ou representante legal) pelo (a) Sr.(a) _____

tendo permitido e autorizado a doação de seus órgãos e tecidos para fins de transplante, e, após ter sido esclarecido sobre os procedimentos, estou de pleno acordo com a doação da porção posterior dos seus globos oculares, não utilizáveis em transplante, para realização de pesquisas científicas no Laboratório de Morfologia e Eletrofisiologia Celular da Universidade Federal do Pará, sob a coordenação da Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada, em comum acordo com o CNCDO/SESPA.

Declaro ainda que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios, e que concordei com a doação do material para a pesquisa por minha livre vontade.

ASSINATURA DO DECLARANTE

TESTEMUNHAS _____

Belém, de _____ 2001. Hora: _____