Mauro Leonelli

RECEPTORES VANILÓIDES TRPV1 NA RETINA

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

São Paulo
2010

Mauro Leonelli

RECEPTORES VANILÓIDES TRPV1 NA RETINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica 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 Giorgetti de Britto

São Paulo
2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Leonelli, Mauro.

Receptores vanilóides TRPV1 na retina / Mauro Leonelli. -- São Paulo, 2010.

Orientador: 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: Comunicação celular no sistema nervoso central.

Versão do título para o inglês: Vanilloid TRPV1 receptors in the retina.

Descritores: 1. Retina 2. Receptores vanilóides 3. Desenvolvimento 4. Axotomia de nervo óptico 5. Óxido nítrico 6. Ratos I. Britto, Luiz Roberto Giorgetti de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0207/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mauro Leonelli.

Título da Tese: Receptores vanilóides TRPV1 na retina.

Orientador(a): 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) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **030** nas fls. **30** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Luiz Roberto Giorgetti de Britto, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Endocanabinóides no sistema visual de vertebrados**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Mauro Leonelli**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **20.04.2006**.

São Paulo, 24 de abril de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – 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 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.41 .10

NOSC/mcgn

São Paulo, 23 de julho de 2010.

REF.: Protocolo nº030/06.

"Endocanabinóides no sistema visual de vertebrados"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 20.04.2012.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA
Vice-Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr.

Prof Dr. LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITTO

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Ao Grande Pai que, segundo
Confúcio, zela em sua poderosa
calma, filha da paciência.*

AGRADECIMENTOS

O que escrevo aqui já é sabido pelas pessoas em questão, mas acho importante ser ressaltado sobre elas aquilo que, acredito, deva ser valorizado.

Minha Mamãe Maria Inês e meu Papai Idolo (e também *ídolo*), por me ensinarem desde cedo sobre a fé verdadeira. Apoiam-me sempre e me enriquecem em educação, direcionada ao meu raciocínio e a minha alma. Tudo me deram gratuitamente e em fartura. Ensinarão aos filhos que nessa vida mais se lucra ao perder a si; em ser peregrino, e não turista.

Meus irmãos Marcelo e Maurício, meus amigos, são como jóias de bom humor e esperança. Cientistas todos os três somos quando não nos falta o discernimento para identificar e selecionar aquilo que é bom e verdadeiro.

Fernanda, que me doa a cada dia amor sem cobrança, tolerância sem condescendência e a certeza no incerto. Saiba que nunca nos faltará aquela força que se faz mola de renovação de nosso carinho e amizade. É muito fácil construir com você, em especial, aquilo que não se vê.

Meus irmãos de coração, Vânia e Graciano Bellus Máximus, que conduziram minha “melhor metade” até meu encontro e, ainda, me dão carinho e compreensão, em abundância.

Mestre Britto, que há algum tempo é tão amigo quanto orientador. Ensinou-me sobre como lidar com os alunos e como aprender com eles, e sobre a pesquisa. Aprendo muito com você, e sou mais feliz ainda pois você confia ao ponto de transparecer que é recíproco.

Meu amigo Adilson, que é técnico do laboratório e especialista em assuntos aleatórios. Você faz as vezes de um irmão no dia a dia. Tem um abraço forte, uma ambulância, uma religião própria (mais uma das quais sou adepto), e uma voz alta que desperta até ondas beta em encéfalos no formol.

Daniel, estagiário que me acompanhou desde o início do doutorado, que é a companhia despretensiosa de sorriso fácil, ambos necessários tanto nos dias bons quanto nos ruins.

Para aqueles do contato diário: feliz é aquele que trabalha onde há prazer na companhia, confia nos colegas de serviço e respeita as pessoas. Muito obrigado pela companhia de todos vocês, os da Pós e os estagiários.

Os Professores colaboradores diretos, Andréa Torrão e Angelo Carpinelli. A primeira, que é uma fonte de bom humor. O segundo, que decisivamente me direcionou e me ajudou lá no passado, dessa forma me auxiliando na construção de minha identidade e no fortalecimento da minha fé.

Aos outros Professores, alunos, colaboradores, técnicos, secretários dos departamentos e das comissões, funcionários dos biotérios, da biblioteca, da limpeza e da segurança.

Agradeço, especialmente, aqueles do sorriso gratuito no corredor; aqueles que se deixam contagiar fartamente com uma risada; aqueles que passam o dia todo numa sala sem janela, respirando amônia, e ainda participam da alegria na “copa do Rui”; aqueles que sabem do que eu falo quando cito o “Bom dia meu jovem... bom dia princesa” do Seu Pena; aqueles que me informam que o Palmeiras jogou, mesmo quando meu time ganha do time deles (o que tem sido muito, muito raro); aqueles que se esforçam pelo olhar firme, lúcido e acompanhado de um leve sorriso, e não se entregam facilmente ao analítico, frio e desesperançoso olhar que irremediavelmente se volta para o chão; aqueles que pedem 1 (hum) abraço por dia e me respeitam quando digo “desculpe, hoje não dá”; aqueles que me cumprimentam, mesmo quando estou sem meu chefe ao lado; aqueles que me lembram das minhas obrigações, mesmo quando eles próprios não ganharão nada com isso; aqueles que pedem colaboração por gostarem de trabalhar com você e te fazem acreditar que trabalho em conjunto é crescimento em conjunto; aqueles que entendem realmente que toda ideia é o início do trabalho, que trabalho *dá* trabalho, e que o *paper* ou a tese são o final de...alguma coisa, mas não do raciocínio e da verdade; aqueles que não tem medo de parecerem ridículos ao dizer uma frase com tom teleológico, ou de deixar escapar que as células ou os organismos, realmente, possuem inteligência própria; aqueles generosos que distribuem ideias, ao invés de guardá-las para si, visto que não têm medo de que alguém as roube, pois não tem medo algum de que elas faltem; aqueles que acreditam que nem toda inteligência provém da palavra do homem, mas que, sem as palavras e os atos corretos, o conhecimento e a beleza contida nele se extraviam; aqueles que se orgulham mais por ter capacidade de ainda muito fazer, do que por aquilo que já fizeram; aqueles que sabem que tem capacidade de fazer muito, e nem por isso se contentam consigo mesmos ou se gabam disso; aqueles que sabem que uma motivação de âmbito maior, expressa pela palavra -dever-, anula o *orgulho* de qualquer *fazer*. Ainda, há os de conceito diferenciado sobre *Ciência*, ou seja, aqueles que já entendem que exercitar de forma estéril o raciocínio ou que -ter conhecimento pelo prazer de conhecer- pode até parecer bonito, mas é o mesmo que nivelar o cérebro a um livro riquíssimo, porém mofado, empinhocado numa estante para servir de banquete ao tempo, na espera pelo fictício acaso. Adicionalmente, sempre há aqueles que ensinam com exemplo próprio que qualquer tarefa deve render algo de bom, de dentro para fora, e se dão por satisfeitos com isso.

Sinto-me feliz por não deixar que nada disso me escapasse e, muitas vezes, num dia não tão bom em que tudo dava errado, era olhar ao redor ou dar uma volta no corredor, com olhar bem seletivo, vendo que sempre há quem cumpra suas obrigações com bom humor que eu voltava, novamente com vontade, para a surrada bancada verde-água do Dr. Britto.

Obrigado

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Examina o campo que te fornece
alimento verbal. Seja na escrita de
mãos hábeis ou na fala de pessoas
distintas, assinala o que recolhes. [...] É possível não consigas identificar,
de pronto, as intenções de quem fala;
entretanto, podes observar os
resultados positivos da ação de cada
conversador. E pelos frutos que
pendem na árvore da vida de cada
um, sabes perfeitamente a escolha
que te convém.”*

Chico Xavier

RESUMO

LEONELLI, M. **Receptores vanilóides TRPV1 na retina.** 2010. 126 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dentro da enorme diversidade de neuromediadores e neurorreceptores clonados e sequenciados nos últimos anos, destacamos neste estudo o sistema endovanilóide pelas suas complexas ações nos processos de multiplicação neuronal, maturação e modulação sináptica, resultando em uma série de respostas comportamentais e orgânicas, como o desenvolvimento neural e a excitotoxicidade, o controle da dor, o aprendizado, o controle do apetite e da temperatura corporal, entre diversas outras funções. Nossos resultados de imunoistoquímica, *immunoblotting*, RT-PCR em tempo real e DAF-2 geraram resultados a respeito do receptor de potencial receptor transiente, vanilóide 1 (TRPV1) tanto na retina íntegra como em retinas de ratos submetidos à lesão do nervo óptico. A expressão do TRPV1 começa em estágios pré-sinaptogênicos da retina. O bloqueio farmacológico desse receptor nesse período diminui a apoptose fisiológica que acontece durante esse processo, havendo possível envolvimento da sinalização de MAP-quinases. Na retina do animal adulto, observamos que a expressão de TRPV1 é amplamente difundida, envolvendo neurônios, células endoteliais e células da microglia. A ativação dos receptores TRPV1 é potencialmente citotóxica, e os mecanismos que podem estar envolvidos incluem a liberação de glutamato e a excitotoxicidade, além da liberação excessiva de NO e o estresse nitrosativo, resultando na alteração da expressão de proteínas que indicam dano celular em células gliais de Müller. Pela utilização de um modelo de axotomia do nervo óptico que mimetiza certas características encontradas no glaucoma, evidenciamos que a lesão prévia de células ganglionares sensibiliza o tecido retiniano à citotoxicidade mediada pela estimulação de TRPV1. Porém, o bloqueio de TRPV1, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, não inibiu a morte de células ganglionares axotomizadas. Esses dados sugerem que o receptor TRPV1 parece estar associado com a atividade sináptica e a manutenção da homeostase retiniana, como também pode estar envolvido indiretamente com a degeneração celular que se segue à lesão de axônios de células ganglionares.

Palavras-Chave: Retina. Receptores vanilóides. Desenvolvimento. Axotomia do nervo óptico. Óxido nítrico. Ratos.

ABSTRACT

LEONELLI, M. **Vanilloid TRPV1 receptors in the rat retina**. 2010. 126 p. Ph. D. Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Among the large number of neuromediators and neuroreceptors that have been cloned and sequenced in the past decades, we have chosen in this study the vanilloid system due to its participation in neuronal division, maturation and synaptic modulation, thus resulting in the control of several processes, such as neuronal development and excitotoxicity, pain signaling, learning, feeding and the control of the temperature. We used immunohistochemistry, immunoblotting, real time RT-PCR and DAF-2 in order to study the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in the normal and in the axotomized rat retina. TRPV1 expression in the developing retina begins before retinal synaptogenesis. TRPV1 blockade reduced the normal apoptosis in this period, and MAPK signaling seems to be involved in this process. In the adult retina, TRPV1 are expressed in neuronal, endothelial and microglial cells. The activation of those receptors is potentially cytotoxic, and glutamate release and further excitotoxicity and nitrosative stress might be also involved. Axotomized retinal ganglion cells were sensitized to TRPV1 cytotoxicity, but TRPV1 antagonism, both in vitro and in vivo, did not reduce the loss of ganglion cell after axotomy. Our results suggest that TRPV1 receptors are involved in synaptic function and homeostatic control in the retina. Moreover, TRPV1 seems to be indirectly involved in cellular degeneration that follows the section of retinal ganglion cell axons.

Key words: Retina. Vanilloid receptors. Development. Optic nerve axotomy. Nitric oxide. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12-HPETE – Ácido 12-(S)-hidroperoxi-eicosatetraenóico
4-HNE – 4-hidroxinonenal
7-NI – 7-nitroindazol
AMG – Aminoguanidine
AMT – Transportador membrânico de anandamida
ANOVA – Análise de variância de uma via
AP-5 – ácido 2R)-amino-5-fosfonoaléico
BAD – Promotor de morte associado a Bcl-xL e Bcl-2
Bcl-2 – Proteína de linfoma 2 de células B
CamKII – Quinase 2 dependente de calmodulina ligada ao cálcio
ChAT – Colina-acetiltransferase
CNGs – Canais dependentes de nucleotídeo cíclico
DAF-2 DA – 4,5-diaminofluoresceína diacetato
DAPI – Diamidino-2-phenylindole
DEPC – Dietilpirocarbonato
DMSO – Dimetilsulfóxido
DRG – Gânglio dorsal da medula
ECL – Sistema de detecção por quimioluminescência
eNOS – Isoforma endotelial da enzima de síntese do óxido nítrico
ERK1/2 – Quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
FAAH – Hidrolase de ácido graxo amidado
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GCL – Camada das células ganglionares
GDNF - Fator de crescimento derivado da glia
GFAP – Proteína fibrilar acídica glial
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico
GTP – Trifosfato de guanosina
HPRT – Hipoxantina fosforibosiltransferase
HRP – Peroxidase extraída de raiz-forte

INL – Camada nuclear interna
iNOS – Isoforma induzível da enzima de síntese do óxido nítrico
IPL – Camada plexiforma interna
JNK – Quinase N-terminal de cJun
LES – Retinas de animais com lesão do nervo óptico.
L-NIO – N5-(1-Iminoetil)-L-ornitina dihidroclorato
MAP-quinases – Quinases associadas à mitógenos
NADA – N-araquidonoil-dopamina
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH diaforase – NADPH conjugado à diaforase
NAPE-PLD – Fosfolipase-D hidrolizante de N-acil-fosfatidiletanolamidas
NBL – Camada neuroblástica
NFL – Camada das fibras nervosas
NFL-L – Neurofilamentos de baixo peso molecular
NGF – Fator de crescimento neural
nNOS – Isoforma neuronal da enzima de síntese do óxido nítrico
NO – Óxido nítrico
NOS – Enzima de síntese do óxido nítrico
OD – Densidade óptica
ON - Nervo óptico
ONH – Cabeça do nervo óptico
ONL – Camada nuclear externa
OPL – Camada plexiforme externa
PAN – Conjunto de três anticorpos contra neurofilamentos de baixo, médio e alto peso molecular
PB – Tampão fosfato 0,1 molar
PCNA – Antígeno nuclear de células proliferativas
PFA – Paraformaldeído
PKA – Quinase A de proteínas
PKC-alfa – Quinase C de proteínas, isoforma alfa
PKG – Quinase G de proteínas
RT - PCR – Reação de cadeia de polimerase e transcriptase reversa
RVM – Margem vitreal retiniana

sGC – Guanilato ciclase solúvel sGC

SNAP – S-nitroso-N-acetilpenicilamina

TNF- α - Fator de necrose tumoral tipo alfa

TRITC – Tetrametil isotiocianato de rodamina

TrkA – Receptor de tirosina-quinase tipo A

TRPV1 – Receptor de potencial transiente vanilóide-1

TUNEL – Marcação *in situ* de nucleotídeos (TdT)-dUTP marcados com biotina mediada por deoxinucleotidiltransferase terminal

ULEX – Lecitina biotinilada extraída de *Ulex europaeus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Organização celular da retina	19
1.2 TRPV1	20
1.3 Óxido nítrico e o sistema endovanilóide	22
1.4 Lesão do nervo óptico.....	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	28
3.2.1 Lesão do nervo óptico.....	28
3.2.2 Injeção intravitreal	29
3.3 Reagentes utilizados	29
3.4 Histoquímica	30
3.4.1 Fixação e crioproteção.....	30
3.4.2 Microtomia	31
3.4.3 Imunoperoxidase	31
3.4.4 Imunofluorescência	31
3.4.5 Quantificação de células e análise morfológica das retinas	32
3.4.6 Visualização de vasos.....	32
3.4.7 Fluoro-Jade B	33
3.4.8 TUNEL	33
3.4.9 Análise dos resultados	33
3.5 Immunoblotting	34
3.6 Extração de RNA e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase –Transcrição Reversa) em tempo real.....	36
3.7 Avaliação da produção de óxido nítrico em vasos retinianos.....	37
3.9 Cultura de explantes retinianos	38
3.10 Marcação retrógrada de células ganglionares	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Expressão e participação dos receptores TRPV1 durante o desenvolvimento da retina	41

4.2 Participação de receptores TRPV1 na degeneração retrógrada retiniana e possíveis mecanismos envolvidos.....	63
4.3 Ativação de receptores TRPV1 altera a atividade e expressão enzimas de síntese de óxido nítrico em retinas de ratos adultos	91
5 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS*	101
ANEXOS	123
ANEXO A - Trabalho publicado no periódico <i>International Journal of Developmental Neuroscience</i>.	123
ANEXO B - Trabalho publicado no periódico <i>Brazilian Journal of Medical Research</i>.....	124
ANEXO C - Trabalho publicado no periódico <i>Experimental eye research</i>.	125
ANEXO D - Trabalho submetido para publicação no periódico <i>International Journal of Developmental Neuroscience</i>.....	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Organização celular da retina

A retina é um excelente modelo para o estudo da comunicação neuronal, visto que possui apenas cinco tipos básicos de neurônios, que podem ser facilmente localizados em três camadas celulares. Os fotorreceptores constituem a camada nuclear externa (ONL); as células horizontais, as bipolares, e as amácrinas formam a camada nuclear interna (INL); e uma última camada leva o nome das células que a compõem, a camada das células ganglionares (GCL) (RAMÓN Y CAJAL, 1952; WASSLE e BOYCOTT, 1991). Essas células estabelecem uma grande diversidade de sinapses químicas e elétricas, utilizando-se de uma enorme quantidade de neuromoduladores, que apesar de concentrados em apenas duas camadas plexiformes, a camada plexiforme externa (OPL) e a camada plexiforme interna (IPL), geram uma exuberante gama de relações interneuronais (WASSLE e BOYCOTT, 1991).

Essas relações estendem-se também aos macroglíócitos presentes na retina, as chamadas células de Müller (NEWMAN e REICHENBACH, 1996) e os astrócitos (NORTON et al., 1992). Em estudos recentes de *immunoblotting* e ensaios funcionais para medir a produção de segundos mensageiros (KUBRUSLY et al., 2005), foi identificada a expressão de neurorreceptores ativos como os dopaminérgicos D1_A e D1_B, e dos nicotínicos de acetilcolina contendo a subunidade β -2, em culturas purificadas de células de Müller extraídas da retina de embriões de pintos. Desta forma, aumentam as evidências de que as células de Müller, além das funções de sustentação da homeostase no tecido retiniano, sofrem regulação de sua atividade também na dependência de moléculas classicamente envolvidas nos fenômenos de neurotransmissão. Recentemente, também foi demonstrado que essas células têm o potencial de adquirir características de células progenitoras da retina e, após lesão tecidual, podem servir como fonte de células para a regeneração da retina de aves (FISCHER e REH, 2003). Já os astrócitos retinianos encontram-se restritos à margem vítrea, e participam tanto da manutenção da barreira endotelial e do controle vasomotor da retina (METEA e NEWMAN, 2007), como também da manutenção de adequada comunicação interneuronal (RIDET et al., 1997).

Nos mamíferos, as células ganglionares da retina projetam a grande maioria de seus axônios para o núcleo geniculado dorsal e para o colículo superior (RAMÓN Y CAJAL, 1952), responsáveis pelo processamento central inicial da visão.

1.2 TRPV1

O receptor de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1) foi clonado em 1997 (CATERINA et al., 1997), sendo previamente conhecido por receptor vanilóide tipo 1 (VR1) ou como receptor de capsaicina (SZOLCSANYI, 2004). Atualmente, ele é agrupado na família dos receptores de potencial transiente (transient receptor potential – TRPs) que inclui os receptores vanilóides (TRPVs), os receptores canônicos (TRPCs), os receptores de melastatina (TRPMs), os receptores de mucolipinas (TRPMLs), os receptores de anquirinas (TRPAs), os receptores de policistinas (TRPPs), e os receptores C sem potencial mecanorreceptor (TRPN) (PEDERSEN; OWSIANIK; NILIUS, 2005).

A família TRPV consiste de seis membros (TRPV1 a TRPV-6). Os TRPVs formam tetrâmeros com o poro condutor de íons no centro dessa estrutura (JORDT e JULIUS, 2002), mas podem ser encontradas combinações homo e heteroméricas de até oito subunidades (KEDEI et al., 2001). Hellwig e colaboradores (HELLWIG et al., 2005), baseados em estudos de co-imunoprecipitação e ressonância de transferência de energia fluorescente, observaram que as subunidades TRPV1 a TRPV-4 formam uma quantidade muito maior de homomultímeros, enquanto que as subunidades TRPV-5 e TRPV-6 formam preferencialmente heteromultímeros. Estudos conduzidos em mamíferos indicam que as subunidades TRPV1 e o TRPV2 formam receptores heteroméricos em pequenas quantidades (HELLWIG et al., 2005; LIAPI e WOOD, 2005), o que pode modular a sensibilidade do multímero formado (CATERINA et al., 1999).

O TRPV1 foi caracterizado como um receptor ionotrópico excitatório, relativamente seletivo a cálcio e magnésio (PCa/PNa ~9,6; PMg/PNa ~4,99). O TRPV1 é um canal altamente promíscuo, e uma grande quantidade de ligantes pode ativá-lo. Os ligantes endógenos desse receptor são conhecidos como endovanilóides. Eles são ácidos graxos derivados direta ou indiretamente do ácido araquidônico. Entre eles, temos: a anandamida, que é uma etanol-amida do ácido araquidônico (DEVANE et al., 1992); a

N-araquidonoil-dopamina (NADA), que se acredita ser um conjugado direto entre ácido araquidônico e a dopamina (HU et al., 2009); e os produtos da oxidação do ácido araquidônico, como o ácido 12-(S)-hidroperoxi-eicosatetraenóico (12-HPETE) e o leucotrieno B4 (DE PETROCELLIS e DI MARZO, 2009). Alguns desses compostos, como a anandamida e o NADA, podem ainda ativar o receptor canabinóide 1 e, assim, são chamados também de endocanabinóides. O receptor TRPV1 também pode ser ativado por fatores alterados no microambiente neuronal, como o calor (temperatura maior que 43 °C), pH abaixo de 5,3 (CATERINA et al., 1997), e por estresse mecânico da membrana celular (LIEDTKE, 2007).

O controle da produção dos ligantes endógenos do TRPV1 ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que a anandamida é sintetizada sob demanda, quando da estimulação neuronal. A anandamida é produzida pelas enzimas fosfolipase-D hidrolizante de N-acil-fosfatidiletanolamidas (*N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing* – NAPE-PLD), sendo degradada pela hidrolase de ácido graxo amidado (*fatty acid amide hidrolase* – FAAH) (DI MARZO e DEUTSCH, 1998). Por ser um composto lipossolúvel, pode alcançar o meio extracelular e inclusive sítios sinápticos, onde pode ser recaptada por um transportador de membrana (*anandamide membrane transporter* – AMT) (DI MARZO e DEUTSCH, 1998). A FAAH tem expressão ampla na retina de ratos adultos, localizando-se em bastonetes, células horizontais e células amácrinas GABAérgicas, indicando um complexo sistema de liberação e degradação de anandamida na retina (YAZULLA et al., 1999). Recentemente, foi relatado que há diminuição da atividade do AMT e aumento da atividade da FAAH em retinas de ratos que sofreram lesão aguda por hipóxia (NUCCI et al., 2007), o que pode ser traduzido funcionalmente como menor disponibilidade de anandamida nessas condições.

A atividade de TRPV1 tem sido correlacionada com uma plêiade de funções tanto no sistema nervoso central como nos outros sistemas do organismo (DE PETROCELLIS e DI MARZO, 2009; PEDERSEN; OWSIANIK; NILIUS, 2005). Em sítios pré-sinápticos, o TRPV1 pode modular liberação de neurotransmissores, como o glutamato (MARINELLI et al., 2002). Estudos de imunoistoquímica (TOTH et al., 2005) e RT-PCR (MEZEY et al., 2000) indicam uma ampla distribuição do TRPV1 em áreas como o hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatório, mesencéfalo e rombencéfalo, em neurônios, em pericitos e em astrócitos, o que pode indicar múltiplas

funções deste sistema nos processos sinápticos, como também na regulação da vasculatura cerebral.

As evidências iniciais da presença de receptores TRPV1 no sistema visual surgiram com os dados de Ritter e colaboradores. Nestes experimentos, foi observado em ratos neonatos que a aplicação intraperitoneal de capsaicina, um componente das pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* e agonista exógeno de TRPV1, provocou a degeneração de células bipolares, ganglionares, de fibras axonais da retina (RITTER e DINH, 1990), bem como de regiões retinorreipientes como o núcleo supraquiasmático, o núcleo geniculado ventral e o núcleo intergeniculado (RITTER e DINH, 1991). A presença do receptor TRPV1 na retina de mamíferos só foi evidenciada em 2007 (NUCCI et al., 2007) mas a localização específica desse receptor só foi demonstrada posteriormente. Hoje, sabe-se que o receptor TRPV1 pode levar à ativação de células senescentes da microglia retiniana (SAPPINGTON e CALKINS, 2008), bem como pode participar da morte de células ganglionares expostas à alta pressão hidrostática (SAPPINGTON et al., 2009).

1.3 Óxido nítrico e o sistema endovanilóide

O óxido nítrico (NO) é um gás de meia vida curta, de apenas alguns segundos (SNYDER e BREDT, 1992). O interesse sobre a função biológica do NO cresceu muito em estudos neurobiológicos desde a década de 90, quando se descobriu que o NO atua como neuromodulador (BREDT e SNYDER, 1992). Por todo o sistema nervoso, o NO pode modular diversos processos inerentes ao neurônio, como a transmissão sináptica (BREDT e SNYDER, 1992; DAWSON e SNYDER, 1994), a potenciação de longo-prazo (HALEY; WILCOX; CHAPMAN, 1992), a plasticidade neuronal (HOLSCHER, 1997), e a apoptose (LI e WOGAN, 2005). Ainda, o NO modula a atividade citotóxica de neutrófilos e macrófagos (SCHROEDER e KUO, 1995), a agregação plaquetária (STEWART; PHAN; GRIGORIADIS, 1994), e o fluxo sanguíneo (FARACI e BRIAN JR, 1994).

A produção de NO é mediada pelas suas enzimas de síntese (NOSs). Até o momento, foram descritas três diferentes isoformas de NOS, que são a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), a isoforma endotelial (eNOS ou NOS-3), e a isoforma induzível (iNOS ou NOS-2) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; GHOSH e SALERNO,

2003). Tanto a atividade da nNOS como da eNOS estão associadas com a calmodulina acoplada ao cálcio, enquanto que a atividade de iNOS não é dependente de cálcio. Por outro lado, as isoformas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente no sistema nervoso central, enquanto que a iNOS não é expressa normalmente em neurônios (HENEKA e FEINSTEIN, 2001).

Todos os tipos de NOS utilizam a arginina para a produção de NO, e tem a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como cofator necessário para a síntese de NO (ANDREW e MAYER, 1999). Historicamente, este cofator foi muito utilizado como meio de determinação de células que produzem NO, pois o NADPH conjugado à diaforase (NADPH-diaforase) é capaz de gerar sinal observado na histologia quando da presença de NOS no tecido (GROZDANOVIC; BAUMGARTEN; BRUNING, 1992). Recentemente, desenvolveu-se um método em que a presença de NO pode ser diretamente detectada pela diaminofluoresceína (DAF-2), que gera sinal fluorescente quando reage com o NO (KOJIMA et al., 1998).

O NO atua influenciando a função de diversas proteínas. Classicamente, a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) é tida como principal alvo de ação do NO (KOESLING et al., 2004). A sGC é ativada sob influência do NO, e assim a sGC cataliza a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004). Por sua vez, o GMPc atua em diversas vias de sinalização, que inclui a ativação da quinase de proteínas do tipo G (PKG), a ativação do influxo de sódio e cálcio pelos canais dependentes de nucleotídeo cíclico (CNGs), e a ativação de diversas fosfodiesterases que limitam a ação da PKG (ESPLUGUES, 2002; KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004).

Diversos estudos reportam a presença de NO e suas enzimas de síntese na retina de vertebrados, pela utilização de métodos como a NADPH-diaforase (RIOS et al., 2000; ROUFAIL; STRINGER; REES, 1995) e a DAF-2 (BLUTE; LEE; ELDRED, 2000). Por métodos como a imunoistoquímica (KIM; OH; CHUN, 2000; KIM et al., 2000; NEUFELD; SHAREEF; PENA, 2000) e hibridação *in situ* (KIM; OH; CHUN, 2000), três subtipos de células amácrinas foram identificadas que expressam nNOS na retina de ratos, incluindo células amácrinas deslocadas, além de marcação proeminente em processos da IPL. eNOS foi encontrada na retina de ratos adultos, por imunoistoquímica, em células de Müller e em vasos sanguíneos (HAVERKAMP; KOLB; CUENCA, 1999).

Na retina, o NO pode ser encontrado modulando processos que envolvem a fototransdução, a comunicação sináptica nos plexos nervosos, ou ainda a relação entre as células nervosas e os vasos que suprem a retina, ou o epitélio pigmentar (GOLDSTEIN; OSTWALD; ROTH, 1996). Por exemplo, o NO pode alterar o processo de fototransdução ao modular a atividade da sGC, gerando maior quantidade de GMPc que pode atuar ressensibilizando os canais de sódio dependentes de GMPc dos fotorreceptores, restaurando desta forma o influxo de sódio observado nas correntes de escuro (SCHMIDT; NOLL; YAMAMOTO, 1992; TSUYAMA; NOLL; SCHMIDT, 1993). O NO pode também alterar a atividade dos fotorreceptores, ao modular a comunicação destas células com as células bipolares e horizontais da retina. Neste caso, o NO pode modular o acoplamento elétrico de células horizontais (MIYACHI; MIYAKAWA; MURAKAMI, 1991).

O NO retiniano pode ser produzido também pelas células amácrinas, que por sua vez estimulam o aumento de GMPc em células ganglionares da retina, onde modulam a atividade de CNGs (AHMAD et al., 1994). Estudos recentes apontam ainda que o NO pode mobilizar cloreto intracelular em células amácrinas da retina de animais adultos. Desta forma, há aumento momentâneo do potencial de equilíbrio do cloreto, o que converte transitoriamente a sinalização de sinapses GABAérgicas de inibitórias para excitatórias. O mecanismo envolvido para a ação do NO em células amácrinas ainda permanece desconhecido (HOFFPAUIR; MCMAINS; GLEASON, 2006).

Estudos recentes indicam uma ligação estreita entre o sistema endovanilóide e o NO. Foi demonstrado por microdiálise que a anandamida, via ativação de TRPV1, foi capaz de aumentar a produção de NO e de GMPc em vasos do mesentério de ratos (POBLETE et al., 2005). Em outro delineamento experimental, a administração sistêmica de capsaicina levou ao aumento da expressão de nNOS em células do gânglio dorsal da medula (DRG) (VIZZARD; ERDMAN; DE GROAT, 1995). Por outro lado, a indução prévia da expressão de nNOS neste tecido, pela utilização do modelo de ligadura do nervo ciático, demonstrou que as células nNOS-positivas diminuem em número absoluto no caso de desafio com capsaicina (REN e RUDA, 1995). Ainda permanece obscuro se houve diminuição do conteúdo protéico de nNOS nessas células, ou se elas morreram pela citotoxicidade causada pela capsaicina.

Desta forma, torna-se evidente a necessidade de estudos sobre a interação entre o sistema endovanilóide e o sistema nitrérgico, com a finalidade de compreender os mecanismos de inserção destes sistemas em processos fisiológicos e neuropatológicos.

1.4 Lesão do nervo óptico

O nervo óptico consiste dos axônios das células ganglionares, de astrócitos, de células microgliais e de vasos sanguíneos. As células ganglionares retinianas formam a via de saída de informação da retina, estendendo seus axônios pelo nervo óptico até seus alvos em áreas distintas do encéfalo. Os axônios das células ganglionares não são mielinizados até a passagem pela lâmina crivosa, na saída do nervo óptico do globo ocular, e em sequência tornam-se mielinizados por oligodendrócitos (RAFF; FFRENCH-CONSTANT; MILLER, 1987).

Doenças que envolvem axônios de células ganglionares são comuns, como as retinopatias diabéticas, os descolamentos de retina, as infecções virais como citomegalovirose e a neuropatia tardia causada pelo HIV, entre outros agentes causadores de lesão. Nestes casos, a perda de axônios das células ganglionares ocorre sempre em consequência de uma lesão prévia do tecido retiniano, ou pela própria morte da célula ganglionar (MILLER e NEWMAN, 2004). No caso do glaucoma, entretanto, a perda neuronal parece ser decorrente da lesão inicial do axônio da célula ganglionar, na região da lâmina crivosa (OSBORNE et al., 2004). A degeneração retrógrada seria a explicação para a perda de células ganglionares neste caso (QUIGLEY, 1999). A causa da degeneração axonal ainda é discutível, mas há grandes evidências de que o aumento progressivo da pressão intraocular pode levar a trauma na região da cabeça do nervo óptico (QUIGLEY, 1999), ou ainda causar diminuição do fluxo sanguíneo no local, culminando na degeneração do axônio por hipóxia (FLAMMER et al., 2002; OSBORNE et al., 2001). Porém, é importante ressaltar que a pressão intraocular elevada é apenas um fator predisponente para o desenvolvimento da doença (NEUFELD e LIU, 2003), que é primariamente identificada pela perda de células ganglionares da retina e consequente trauma na cabeça do nervo óptico.

Os axônios das células ganglionares não possuem grande capacidade de regeneração (OSBORNE et al., 2004), e exatamente por isso são estudados os mecanismos que a regulam em diversos modelos de lesão do nervo óptico, onde são

abordados aspectos como a reestruturação axonal (CHIERZI e FAWCETT, 2001), a formação da cicatriz glial no sítio de lesão (FRANK e WOLBURG, 1996; OHLSSON; MATTSSON; SVENSSON, 2004), a resposta da microglia (GARCIA-VALENZUELA; SHARMA; PINA, 2005), a sobrevivência de células ganglionares propriamente ditas (BERKELAAR et al., 1994; OHLSSON; MATTSSON; SVENSSON, 2004; SELLES-NAVARRO et al., 2001), e os eventos neuroplásticos observados na retina após a lesão (MIYAHARA et al., 2003). Ainda, há um grande número de evidências indicando que a reação das células gliais retinianas pode intensificar e cronificar processos lesivos primários, como os causados por traumas mecânicos (BRAY et al., 1991) e os distúrbios vasculares (BRINGMANN et al., 2006) que atinjam o tecido retiniano.

Diversos modelos que geram lesão do nervo óptico direta ou indiretamente são rotineiramente adotados na tentativa de simular a lesão observada nas células ganglionares nos casos de glaucoma. Em alguns, é utilizado o aumento da pressão intraocular pela lesão de veias que drenam o fluxo sanguíneo da retina (ATTARIWALA; JENSEN; GLUCKSBERG, 1997). Em outros, opta-se por comprimir o nervo óptico mecanicamente (SWANSON et al., 2005). Finalmente, há os métodos em que se opta pela transecção do nervo óptico intracranialmente (FRANK e WOLBURG, 1996; MOORE e THANOS, 1996; OHLSSON; MATTSSON; SVENSSON, 2004; SELLES-NAVARRO et al., 2001), ou intraorbitalmente (BERKELAAR et al., 1994; CHENG et al., 2002; FRANKLIN et al., 2006; GARCIA-VALENZUELA; SHARMA; PINA, 2005; KERMER et al., 2001; MOORE e THANOS, 1996; PERNET e DI POLO, 2006).

Neste estudo, optamos pelo modelo de lesão intraorbital do nervo óptico, por tratar-se de um modelo de simples execução e alta reprodutibilidade, e por levar a lesão axonal concreta o mais próximo possível do globo ocular, sem que haja comprometimento vascular (KERMER et al., 2001).

2 OBJETIVOS

Neste trabalho, objetivamos avaliar o possível envolvimento dos receptores TRPV1 nos processos de desenvolvimento e plasticidade do sistema visual de ratos, bem como sua interação com outros sistemas de neuromediadores, em especial o óxido nítrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os estudos de ontogenia, foram utilizadas ninhadas de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) para as idades pós parto de 1 dia (P1), P5, P15 e P60. Três fêmeas tiveram o ciclo estral acompanhado por meio de citologia vaginal e foram mantidas em gaiolas separadas de machos até o momento do estro, sendo então cobertas por machos e novamente segregadas por 19 dias, quando foram sacrificadas por deslocamento cervical, tendo seus fetos removidos para a obtenção de retinas de fetos com idade embrionária de 19 dias (E19).

Para os outros experimentos, foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, de até no máximo 4 meses de idade e 300g $\pm$ 5% de peso corporal. Todos os animais permaneceram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) em ambiente com temperatura constante de 23° $\pm$ 2 °C e sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas (acendimento das luzes artificiais às 7h), tendo livre acesso à água e dieta padrão composta por ração comercial. Os animais dos grupos que não recebem nenhum tratamento, seja farmacológico ou cirúrgico (animais *naïve*) permaneceram nos mesmos ambientes que os animais tratados ou operados, durante o período que esses ali ficaram. Os ratos foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os experimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

3.2.1 Lesão do nervo óptico

A lesão do nervo óptico é realizada unilateralmente em ratos anestesiados com quetamina (10mg/100g de peso corporal, ip) e xilazina (1mg/100g de peso corporal, ip) e o nervo óptico é exposto após cantotomia lateral como descrito anteriormente (KERMER et al., 2001; NITZAN et al., 2006). É realizada uma incisão lateral na superfície temporal da conjuntiva, na borda da córnea. Os músculos externo e retrator

do bulbo são incisados e o globo ocular é gentilmente tracionado com o auxílio de uma pinça, expondo o nervo óptico. Em seguida, é realizada a lesão do nervo óptico com uma agulha 27,5G, que é inserida transversalmente no nervo óptico a aproximadamente 4mm do globo ocular, com o cuidado de evitar lesão na artéria oftálmica. Em seguida, é cortado o nervo óptico com uma tesoura oftalmológica. Posteriormente, é aplicado à superfície ocular uma pomada oleosa de cloridrato de ciprofloxacino a 3,5%, que previne o ressecamento da córnea e a proliferação de bactérias no local da lesão. Os animais são recolocados na gaiola e observados até o momento em que despertem, sendo então levados novamente ao biotério. Os ratos falso-operados (*sham*) recebem o mesmo tratamento descrito excluindo-se o corte do nervo óptico.

3.2.2 Injeção intravitreal

O protocolo seguido para a injeção intravitreal é muito utilizado experimentalmente (KERMER et al., 2001). Resumidamente, os animais são anestesiados como descrito acima. Os compostos de interesse são injetados no espaço intravitreal com a utilização de uma agulha 32G acoplada a uma seringa Hamilton via um tubo de silicone preenchido com água. Todo o sistema é vedado com silicone em pasta para garantir a exatidão da quantidade administrada. A agulha é inserida no globo ocular logo abaixo da junção entre a córnea e a esclera, com o cuidado de evitar danos nos vasos que suprem a região límbica do globo ocular (MORRISON et al., 1995). São injetados lentamente 3µl em volume de droga ou da solução controle, e a agulha é deixada no local por 2 minutos, sendo delicadamente retirada após este período. Os animais são recolocados na gaiola e observados até o momento em que despertem, sendo então levados novamente ao biotério.

3.3 Reagentes utilizados

Os fármacos utilizados foram obtidos do fabricante Tocris (Baldwin, MO), com exceção do AP-5, que foi obtido da Sigma (Saint Louis, Mi). Todas as substâncias foram pré-diluídas e posteriormente foram aliquotadas e estocadas em temperatura de -20 °C, de acordo com as instruções do fabricante. As soluções de trabalho foram obtidas pela diluição da solução de estoque em solução salina a 0,9%, obtendo-se assim as

concentrações finais desejadas. O agonista de TRPV1, a capsaicina (cat # 0462), e o antagonista de TRPV1, a capsazepina (cat # 0464) foram diluídas em etanol absoluto. O doador de NO (S)-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP; cat # 0598), e o inibidor de nNOS e eNOS, o 7-nitroindazol (7-NI, cat # 0602), foram diluídos em DMSO, enquanto o inibidor específico de eNOS, o N5-(1-Iminoetil)-L-ornitina dihidrocloreto (L-NIO; cat #0546), a aminoguanidina (AMG; cat #0787), e o inibidor de canais NMDA, o ácido 2R)-amino-5-fosfonoaléxico (AP-5; Sigma, cat #A5282) foram diluídos em água. As concentrações finais foram obtidas imediatamente antes do uso, diluindo as soluções estoque em salina 0,9%. A solução controle (veículo) foram feita imediatamente antes do uso em salina 0,9% com etanol 0,2%, DMSO 0,2% ou a combinação de ambos, o que foi escolhido tendo em vista as drogas utilizadas em todas as condições de cada experimento.

A relação de anticorpos utilizados nesta fase do projeto encontra-se na Tabela 1. Tanto os anticorpos como as drogas acima têm sido rotineiramente testados em nosso laboratório e estão disponíveis comercialmente.

Para a avaliação da produção *in situ* de NO na retina de ratos, utilizamos a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2; Calbiochem, San Diego, CA), que foi aliquoteada e mantida em geladeira (4 °C) protegida da luz até o momento dos experimentos.

3.4 Histoquímica

3.4.1 Fixação e crioproteção

Os ratos são anestesiados profundamente com quetamina (20mg/100g de peso corporal, ip) e xilazina (2mg/100g de peso corporal, ip). O tórax é aberto e aplica-se heparina sódica no coração para diminuir a formação de trombos. Posteriormente, os animais são perfundidos transcardiacamente com solução salina tamponada (PBS) e solução fixadora de paraformaldeído a 2% (PFA 2%) em tampão fosfato 0,1M (PB) com pH 7,4. É realizada a enucleação, com os olhos obtidos sendo mantidos para pós-fixação na mesma solução de PFA 2% em PB por 1,5 hora, e então transferidos para a solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB por um período de 12 horas. Os olhos assim obtidos são dissecados e as retinas retiradas são armazenadas novamente na solução crioprotetora até o processamento.

3.4.2 Microtomia

Para a obtenção de cortes transversais, as retinas são incluídas em meio de congelação (Triangle Biomedical Sciences; Durham, NC) e cortadas em plano transversal (12µm de espessura) em criostato, obtendo-se cortes de várias regiões retinianas em lâminas gelatinizadas. As lâminas permanecem em placa aquecida a 37 °C por 30 minutos. Após este período estas são mantidas a -20 °C para posterior reação.

3.4.3 Imunoperoxidase

Os cortes são incubados com os anticorpos comerciais contra as proteínas de interesse nas concentrações indicadas na Tabela 1. Os anticorpos são diluídos em PB contendo 0,3% de Triton X-100, por períodos de 12 a 14 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens (10 minutos cada) em PB, os cortes são incubados por 1,5h com anticorpos secundários biotinilados (Tab 1) diluídos em PB contendo 0,3% de Triton X-100, em ambos os casos. Os cortes são lavados como anteriormente em PB, com posterior incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite, Vector Labs; Burlingame, CA) por 1 hora. Segue uma reação com 0,05% de 3-3' diaminobenzidina e solução 0,01% de peróxido de hidrogênio em PB, com nova lavagem dos cortes após o processo. A coloração dos cortes é intensificada por tetróxido de ósmio por 30 segundos com posterior desidratação em uma bateria de crescentes concentrações de álcool e finalmente em xilol, sendo então cobertos com uma lamínula usando-se Permount (Fischer, Pittsburg, PA).

3.4.4 Imunofluorescência

Os cortes são incubados com anticorpos primários diluídos em Triton X-100 a 0,3% em PB, nas concentrações indicadas na Tabela 1, por no mínimo 12 horas. Após 3 lavagens (10 minutos cada) em PB, os cortes são incubados por 2 horas com os anticorpos secundários (Tabela 1) marcados com os fluoróforos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC) dirigidos contra a IgG dos animais onde os anticorpos primários foram produzidos. A seguir, os cortes são

lavados 3 vezes em PB e cobertos com glicerol e tampão carbonato, ou alternativamente com Vectashield com DAPI ou iodeto de propídeo, dois marcadores de núcleos celulares (Vector Labs; Burlingame, CA) e lamínulas. Algumas retinas também foram coradas com uma coloração de Nissl fluorescente, o Neurotrace 640/660 (*deep red fluorescent Nissl stain*; Molecular Probes; Carlsbad, CA) para a identificação de neurônios (BAREYRE et al., 2005).

3.4.5 Quantificação de células e análise morfológica das retinas

A quantificação de subtipos celulares específicos da retina foi realizada como descrito anteriormente (KITAOKA et al., 2006). Resumidamente, as retinas foram tratadas para histoquímica e reagidas para imunoperoxidase ou para imunofluorescência. Regiões distantes 0,5 a 2 mm do nervo óptico foram analisadas (cinco imagens por retina; n=4). As médias de cada retina baseiam-se no dados de cinco secções transversais dessa mesma retina. O comprimento da área analisada em cada experimento está descrito nas legendas das figuras e nas tabelas. Os valores das médias foram comparados utilizando-se o teste *t de Student*.

A análise morfológica do tecido retiniano foi realizada em secções transversais de áreas centrais da retina, distantes 0,5 a 1mm do nervo óptico. As secções foram coradas com Nissl fluorescente ou DAPI. O comprimento máximo vertical corresponde à distância entre os processos externos dos fotorreceptores e a margem vitreal da retina (cinco imagens por retina; n=4). Os valores das médias foram comparados utilizando-se o teste *t de Student*.

3.4.6 Visualização de vasos

Para a visualização de vasos, as lâminas preparadas como descrito anteriormente são incubadas com a lecitina ULEX biotinilada extraída de *Ulex europaeus* (Vector Labs; Burlingame, CA) em concentração de 1:200, revelada por streptavidina conjugada a um fluoróforo (AMCA; ABC Elite, Vector Labs; Burlingame, CA).

3.4.7 Fluoro-Jade B

As lâminas obtidas são completamente secas em estufa a 50 °C. Em seguida, as lâminas são imersas em etanol absoluto por 3 minutos, seguido de etanol 70 ° por 1 minuto e água deionizada por 1 minuto. Posteriormente as lâminas são imersas em uma solução de 0,06% permanganato de potássio em água deionizada, por 15 minutos sob agitação. Após nova lavagem das lâminas em água deionizada por 1 minuto, elas são incubadas na solução de 0,001 % de Fluoro-Jade B (Histochem; Jefferson, AK) em água deionizada com 0,1 % de ácido acético por 30 minutos sob agitação, no escuro. As lâminas são lavadas três vezes em água deionizada e banhadas 2 vezes em xilol, por 1 minuto, sendo então cobertas com DPX (EMS; Fort Washington, PA) e lamínulas.

3.4.8 TUNEL

A apoptose celular foi avaliada pela técnica de TUNEL (*in situ terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated (TdT) dUTP-biotin nick-end labeling*) que detecta a fragmentação de DNA, o que é característico de células apoptóticas. Resumidamente, os cortes de retinas foram preparados como descrito anteriormente e deixados secar em placa aquecida a 37 °C por 1 hora. O tecido então foi permeabilizado em solução gelada de PB 0,05M com TritonX-100 0,1% e com citrato de sódio 0,1% por 2 minutos. O tecido foi incubado por 1 hora a 37 °C com a enzima TdT e com dATP, marcados com fluoresceína ou rodamina (1:5; GIBCO-Invitrogen). Os cortes foram então lavados em PB 0,1M e corados com iodeto de propídeo ou DAPI. As retinas foram novamente lavadas em PB 0,1M (3x). Dado o alto grau de marcação inespecífica de TUNEL no tecido retiniano (informação do fabricante), apenas a marcação de TUNEL que condizia com núcleos visualizados com alguma das outras colorações foram quantificados.

3.4.9 Análise dos resultados

Os cortes são analisados em microscópio óptico, observando-se intensidade da imunorreatividade produzida pelos anticorpos. Em alguns casos, é realizada análise serial dos cortes com o programa ImageJ 4.37 (National Institutes of health, USA), e os

quadros de imagens são montados utilizando-se o programa Adobe Photoshop. Segue-se análise estatística através de análise de variância de uma via com pós teste de Tukey com o uso do software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, Ca). Imagens digitais são obtidas por meio de uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio Nikon E100, e as figuras correspondentes são montadas com o programa Adobe Photoshop.

Alternativamente, as lâminas são analisadas em microscópio confocal (Carl Zeiss, Morris Plains, NJ, USA) e imagens são obtidas em secções ópticas de 2µm. Para a quantificação da fluorescência é utilizado o programa ImageJ, e as figuras correspondentes são montadas com o programa Adobe Photoshop.

3.5 Immunoblotting

Os animais doadores de material para *immunoblotting* são profundamente anestesiados com halotano e sacrificados por deslocamento cervical. As amostras de interesse são homogeneizadas em sonicador em tampão de extração (100 mM de Tris pH7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,01 mg/ml de aprotinina), Posteriormente são incubadas com 1% de Triton-X 100 por 30 minutos a 4 °C, e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante é utilizada para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria, utilizando-se o reagente para ensaio de proteína (*BioRad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate*; Melville, NY), e utilizamos curva padrão de albumina como referência. O restante do sobrenadante é diluído em tampão Laemmli (azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%) contendo 200 mM de DTT (ditiotretol), em proporção de 5:1 e é fervido por 5 minutos. As amostras assim obtidas são congeladas e mantidas a -20 °C até sua utilização.

Cerca de 60 µg de proteína total são submetidos a eletroforese em gel bifásico (gel de empilhamento e gel de resolução 8%) em aparelho para minigel de poliacrilamida (Mini-Protean®, Bio-Rad; Melville, NY), juntamente com marcador de peso molecular pré-corado disponível comercialmente (Bio-Rad; Melville, NY). A quantidade de proteína aplicada nos géis para a detecção de TRPV1 que gerou relativa linearidade com o sinal detectado foi em torno de 40 e 80 µg. Assim, aplicamos 60 µg. de proteína também nos casos de detecção de TRPV1 (Figura 1C). A transferência das

proteínas é feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ), utilizando aparato para transferência semi-seca (Bio-Rad; Melville, NY) e realizada durante 2 horas a 120V em gelo, banhada com tampão de transferência.

Após a transferência, as membranas são incubadas com solução bloqueadora constituída de 5% de leite desnatado diluído em solução basal (10 mM de Tris, 150mM de NaCl e 0,02% de Tween 20) a 4 °C *overnight* ou à temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida, as membranas são lavadas 4 vezes durante 5 minutos com solução basal sob agitação. Posteriormente, são incubadas com o anticorpo específico da proteína pesquisada *overnight*, a 4 °C, de acordo com a Tabela 1.

Após incubação, as membranas são lavadas 3 vezes durante 10 minutos com solução basal sob agitação e incubadas, à temperatura ambiente, com anticorpos secundários anti-IgG ligados à peroxidase (HRP – Tabela 1) , por 1 hora. A seguir, as membranas são lavadas com solução basal sob agitação e reveladas. Para revelação utilizamos o kit de quimioluminescência ECL (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) ou o *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). As soluções 1 e 2 do kit são adicionadas na proporção 1:1, recobrando as membranas e após 1 minuto de reação as membranas são secas em papel de filtro, ensacadas e expostas (protegidas da luz) a filme de raio-X.

A intensidade das bandas reativas formadas são quantificadas por densitometria óptica (*Scion Image – Release Beta 3b, NIH, USA*) e corrigidas pela densidade observada para a α -tubulina ou para a β -actina, considerando-se as amostra dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados. Optou-se por correr amostras de gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos em conjunto com nossas amostras de interesse, devido a esse tecido possuir grandes quantidades de TRPV1, sendo assim utilizado como controle da expressão desse receptor. A análise estatística para a imunorreatividade das bandas reveladas é realizada através de análise de variância de uma via com pós teste de Tukey com o uso do software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, Ca).

3.6 Extração de RNA e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase –Transcrição Reversa) em tempo real

Para a extração dos RNAs totais das retinas é utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido é inicialmente homogeneizado com o reagente Trizol até completa solubilização. Em seguida, é incubado durante 5min a temperatura ambiente, acrescido de 0,2 mL de clorofórmio a cada 1 mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante é separado por centrifugação (12.000 g, 15min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e dissolvido em água deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os RNAs obtidos são quantificados por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A seguir, as amostras são submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, para análise da integridade do RNA.

As amostras (cerca de 15 µL) são preparadas com tampão de amostra (63 µL de água bidestilada previamente tratada com DEPC, 81 µL de formaldeído, 48 µL de glicerol com azul de bromofenol, 48 µL de MOPS 10X, 0,5 µL de brometo de etídio a 10 mg/mL), aplicadas em gel de agarose e é iniciada a eletroforese (100 V por 60 minutos). Após a separação por eletroforese, a visualização das bandas é realizada por exposição do gel à luz ultravioleta.

Cada amostra de 3 µg de RNA é submetida à reação de transcrição reversa com *primers* randômicos. A cada tubo são adicionados 3 µg do RNA total, tampão DNase 10X e DNase (1U/µL). Após incubação de 25 minutos a 25 °C a DNase foi inibida com EDTA (25 mM), em seguida foram adicionados *primers* randômicos (146 ng/ µL) e os reagentes tampão RT 5X, DTT (100 mM) e dNTP mix (10 mM). A enzima transcriptase reversa superscript III é adicionada e as amostras são incubadas. A reação é realizada utilizando termociclador Multicycler PTC-0200 (Mj Researc. Inc, Walhan, MA, USA).

A expressão gênica é avaliada pela PCR em tempo real utilizando o equipamento ROTOR GENE 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) e o SYBR GREEN (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para quantificação fluorométrica. A expressão da HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferase) é determinada em paralelo

como controle da reação. A quantificação relativa do valor de cada gene alvo é analisada utilizando o método do Ct (cycle threshold) comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O valor do Ct é o número de ciclos calculado onde o sinal de fluorescência emitido está significativamente acima dos níveis basais. A expressão do RNA para cada gene é normalizada pela expressão do gene constitutivo. O par de primers para amplificação do TRPV1 (sense 5' TTGAACGGCGGAACATGAC 3'; antisense 5' TAGCCGCAGCCTGGACAT 3') de interesse foram desenhados à partir das sequências depositadas no Genbank.

3.7 Avaliação da produção de óxido nítrico em vasos retinianos

Os ratos são sacrificados por deslocamento cervical e seus olhos são removidos. Os olhos são dissecados, com completa remoção da câmara anterior, preservando-se apenas um disco de cerca de 8 mm de diâmetro composto de esclera, epitélio pigmentar e retina, com o disco óptico no centro. A porção da esclera é então colada sobre uma lâmina com uma fina camada de cola acrílica (super bonder; Henckel Loctite Corp., Itapevi, SP), no meio de um poço feito previamente com DPX, que é imediatamente preenchido com tampão Krebs-Hanseleit com 10 mM de glicose, com pH acertado com CO₂, tamponado, e aquecido a 37 °C (tampão Krebs) que contém 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 24 mM NaHCO₃, 1 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂. Seguem-se duas trocas de tampão com intervalo de 5 minutos, e em seguida o tecido é incubado com DAF-2 DA (4,5-diaminofluoresceína diacetato; Alexis Biochemicals, San Diego, CA) diluído a 1:250 em tampão Krebs por 2 horas, protegido da luz em uma câmara úmida alocada em estufa a 37 °C. As retinas são então lavadas três vezes de cinco minutos em tampão Krebs aquecido.

As lâminas que contêm as retinas carregadas com DAF-2 são então colocadas em placa aquecida a 37 °C montada sobre a platina de um microscópio Nikon acoplado a uma câmera. Como controle, algumas retinas permanecem expostas às mesmas condições de luz incidente, porém sem o acréscimo de drogas. As retinas são incubadas com capsaicina a 100µM diluída em tampão Krebs aquecido, ou com a mistura de capsaicina 100µM e capsazepina 100µM, por um período de 15 minutos. As imagens são obtidas a cada minuto, com objetiva de 10x, compondo 5 imagens capturadas previamente à incubação com as drogas, e 15 capturadas após a infusão. As imagens

assim obtidas são analisadas com o programa ImageJ (National Institutes of health, USA), e os quadros de imagens são montados utilizando-se o programa Adobe Photoshop. Segue-se análise estatística através de análise de variância de uma via com pós teste de Tukey com o uso do software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, CA).

3.9 Cultura de explantes retinianos

Os animais foram decapitados e as retinas foram dissecadas imersas em Krebs-Hanseleit com 10 mM de glicose. Os explantes retinianos foram colocados em placas de cultura com a camada das células ganglionares voltadas para baixo, e foram mantidas em estufa a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado meio basal de Eagle (Invitrogen, Gaithersburg, MD), com 1% de glutamina (Invitrogen), 5% de soro fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Os explantes foram então mantidos por até dois dias em cultura.

3.10 Marcação retrógrada de células ganglionares

Resumidamente, os animais utilizados para a contagem de células ganglionares foram profundamente anestesiados, e uma abertura foi feita no crânio logo acima do colículo superior. Em seguida, um pedaço de espuma de colágeno embebida em solução aquosa (0,9% de NaCl) com *fluorogold* a 2% foi colocada recobrendo apenas um dos colículos superiores. (KERMER et al., 2001). Os animais foram utilizados experimentalmente após 7 dias desse procedimento.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de imunoistoquímica e *immunoblotting* e suas respectivas concentrações.

(continua)				
Proteínas	Animal de origem	Peroxidase	Fluorescência	Immunoblotting
TRPV1 (SC-12498; Santa Cruz Biotechnology- Santa Cruz, CA)	Cabra	1:250	1:100	1:1.000
eNOS (610297 – BD Biosciences – San Jose, CA)	Camundongo	1:250	1:250	1:2.000
nNOS (N-2280; Sigma – Saint Louis, Mi)	Camundongo	1:1000	1:100	1:500
iNOS (610329 – BD Biosciences – San Jose, CA)	Camundongo	1:500	-	-
GFAP (G-3893; Sigma – Saint Louis, Mi)	Camundongo	1:1000	-	-
OX-42 (550299 – BD Biosciences – San Jose, CA)	Camundongo	1:2000	-	-
α -Tubulina (32-2500 – Zymed – San Francisco, CA)	Camundongo	-	-	1:2.000
β -actina (A 5316 Sigma – Saint Louis, Mi)	Camundongo	-	-	1:10.000
BAD (SC-8044; Santa Cruz Biotechnology- Santa Cruz, CA)	Camundongo	-	-	1:1.000
Bcl-2 (SC-7382; Santa Cruz Biotechnology- Santa Cruz, CA)	Camundongo	-	-	1:1.000
Calbindin (C-8666 Sigma – Saint Louis, Mi)	Camundongo	-	1:2.000	1:1.000
Calretinin (Ab5054 Sigma – Saint Louis, Mi)	Coelho	-	1:10.000	1:5.000
Caspase-3 (8G10 Cell signaling - Danvers, MA)	Coelho	-	-	1:2.000
ChAT (Ab144P Chemicon – Temecula, CA)	Coelho	1:1.000	1:1.000	-
GABA (NT108 Protos Biotech – New York, NY)	Porco da índia	1:2.000	1:2.000	-
GFAP (410745 Immunon – Pittsburgh, PA)	Camundongo	1:20.000	1:20.000	1:10.000
Ki-67 (VP-RM04 Vector Labs - Burlingame, CA)	Camundongo	1:1.000	1:1.000	-
NFL-1 (N-5139 – Saint Louis, Mi)	Camundongo	-	-	1:5.000
Parvalbumin (P3171Sigma – Saint Louis, Mi)	Camundongo	1:1.000	1:1.000	1:1.000

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos experimentos de imunistoquímica e *immunoblotting* e suas respectivas concentrações.

Proteínas	Animal de origem	(conclusão)		
		Peroxidase	Fluorescência	Immunoblotting
PCNA (M0879 DakoCytomation – Glostrup, Dinamarca)	Camundongo	-	-	1:500
Phospho ERK 1/2 (9101 Cell signaling - Danvers, MA)	Coelho	-	-	1:1.000
Phospho-JNK (sc-6254; Santa Cruz Biotechnology- Santa Cruz, CA)	Camundongo	-	-	1:500
Phospho-p38 MAPK (9211 Cell signaling - Danvers, MA)	Coelho	-	-	1:500
PKC-alpha Amersham (V0P74) – não está mais disponível para venda	Camundongo	-	1:200	-
Synapsin I Chemicon (Ab1543)	Coelho	-	-	1:500
Synaptophysin (A0010 DakoCytomation – Glostrup, Dinamarca)	Coelho	-	-	1:500
Vimentin (M0725 DakoCytomation – Glostrup, Dinamarca)	Camundongo	1:20.000	1:20.000	1:10.000
Monoclonal anti-NT (MAB 5404; Chemicon- Temecula, CA)	Coelho	-	1:100	1:500
Policlonal anti-4HNE (HNE11-S; Alpha diagnostics – Sto. Antonio, Tx)	Camundongo	-	1:100	-
Biotinilados anti-cabra, anti-coelho, anti-guinea pig e anti camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Jumento	1:200	-	-
Rodamina anti-cabra, anti-coelho, anti-guinea pig e anti camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Jumento	1:100	-	-
Fluoresceína anti-cabra, anti-coelho, anti-guinea pig e anti camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Jumento	1:100	-	-
HRP anti-camundongo (Amersham Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Coelho	-	-	1:1000
HRP anti-coelho (Amersham Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Camundongo	-	-	1:1000
HRP anti-cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Coelho	-	-	1:1500

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e participação dos receptores TRPV1 durante o desenvolvimento da retina

No início deste estudo, não havia nenhum dado de literatura em que fosse descrita a localização dos receptores TRPV1 na retina de ratos. Para tanto, realizamos experimentos de imunoistoquímica, *immunoblotting* e RT-PCR com a finalidade de descrever o padrão da expressão desses receptores tanto na retina de animais adultos quanto durante o desenvolvimento desse tecido. Esses resultados fizeram parte do artigo “*Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina*” que foi publicado no *International Journal of Developmental Neuroscience* em meados de 2009 (ANEXO A).

Os resultados de *immunoblotting* (Figura 1) indicam que a expressão proteica total de TRPV1 é praticamente constante durante o desenvolvimento retiniano, desde a idade embrionária de 19 dias (E19) até aos 15 dias após o nascimento (P15), havendo aumento significativo apenas em P60 (maior 105% do que o valor de E19, $p < 0,05$). Os dados de RT-PCR indicam que a expressão de RNA de TRPV1 é constante durante todo o desenvolvimento. Esses resultados sugerem que a expressão de TRPV1 é possivelmente regulada por mecanismos pós-transcricionais, regulando dessa forma a expressão final da proteína. O fato de que a expressão proteica de TRPV1 pode ser modulada independentemente da expressão de mRNA já foi demonstrado em diversos estudos realizados com tecido oriundo da medula espinhal (JI et al., 2002; SANCHEZ; KRAUSE; CORTRIGHT, 2001; TOHDA et al., 2001; VOILLEY et al., 2001). Entretanto, ainda não estão esclarecidos por quais mecanismos ocorre o controle da expressão de TRPV1.

Em E19 e P1, a expressão de TRPV1 foi detectada na camada neuroblástica da retina (NBL), assim como no epitélio pigmentar (Figura 2). Em P5, alguns poucos corpos celulares na GCL da retina periférica também apresentaram marcação para TRPV1. Foi observado também que, entre P5 e P60, a presença de TRPV1 é maior em áreas periféricas em comparação com áreas centrais da retina. Em P15, encontramos fraca marcação para TRPV1 na ONL, na OPL e também na IPL, bem como em alguns corpos celulares na camada nuclear interna INL e na GCL. Na retina do animal adulto, o

padrão de marcação encontrado é puntiforme e apenas alguns corpos celulares marcados foram observados na INL e na GCL. A expressão de TRPV1 albergou quase todas as regiões do tecido retiniano, sendo parcamente distribuído na ONL e OPL e havendo maior intensidade de marcação na IPL e em corpos celulares na INL e GCL (Figura 2).

Realizamos também experimentos de duplas e triplas marcações com o intuito de identificar os tipos celulares em que há expressão de TRPV1 na retina do animal adulto. Verificamos que o receptor TRPV1 é expresso em astrócitos (Figura 3F), microgliócitos (Figura 3I) e células endoteliais da retina (Figura 3F), além de também estar presente em botões pré-sinápticos (Figura 3O), revelados pela marcação de sinaptofisina (MANDELL et al., 1990; VON KRIEGSTEIN et al., 1999), e em axônios de células ganglionares (Figura 3K), revelados pela imunomarcação contra neurofilamentos. A análise da colocalização entre TRPV1 e neurofilamentos indica que há maior colocalização entre TRPV1 e esse marcador axonal na porção inicial, ou seja, na porção intraocular das fibras das células ganglionares, o que parece ser devido a maior expressão de TRPV1 nesse local. Não foi achada colocalização entre TRPV1 e vimentina, um marcador para células de Müller (Figura 3C).

Figura 1 - Expressão de receptores TRPV1 durante o desenvolvimento da retina de ratos. **A** Expressão gênica de TRPV1. As médias das idades E19, P1, P5, P10 e P15 foram normalizadas baseadas nos níveis da expressão do adulto (P60). A expressão gênica de TRPV1 não é alterada durante o desenvolvimento. **B** A expressão gênica de GAPDH foi utilizada como controle interno das reações de RT-PCR. **C** e **D** *Immunoblottings* da expressão protéica de TRPV1 nas retinas de ratos. **C** Diversas concentrações de proteína de ratos adultos foram utilizadas para padronizar a quantidade protéica a ser aplicada nos géis de immunoblotting. Apenas com concentrações entre 50 e 80 μ g de proteína foi encontrada linearidade entre a quantidade de proteína aplicada nos géis e o sinal obtido com as bandas. **D** A expressão protéica do receptor TRPV1 é constante durante as fases iniciais do desenvolvimento da retina, aumentando na retina de ratos adultos. Gráficos representam a densidade óptica das bandas normalizadas pelos respectivos valores encontrados na retina do animal adulto e correspondem à média de cinco experimentos independentes. As barras representam media $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ vs. P60.

Figura 2 - Expressão de receptores TRPV1 durante o desenvolvimento da retina. Cortes transversais da retina de ratos foram coradas com DAPI e reagidas com anticorpo específico contra TRPV1 (FITC). Foi observada maior marcação para TRPV1 nas regiões periféricas da retina, apresentando maior número de células na GCL (cabeças de seta). Setas indicam corpos celulares marcados na INL. Pode ser visto o padrão pontual de marcação para TRPV1 em maior aumento (abaixo e à esquerda), assim como corpos celulares da INL (cabeça de seta) e na GCL (setas). A pré-incubação do anticorpo com o peptídeo de controle (1:5) resultou na ausência de marcação da imunorreatividade (abaixo e à direita). As legendas indicam a localização aproximada da camada neuroblástica (NBL), da camada nuclear externa (ONL), da camada plexiforme externa (OPL), da camada nuclear interna (INL), camada plexiforme interna (IPL), e da camada das células ganglionares (GCL).

Figura 3 - Análise de receptores TRPV1 com diversos marcadores celulares em cortes transversais da retina de ratos adultos. Experimentos de dupla marcação com o anticorpo anti-TRPV1 revelaram que esse receptor não é expresso em células de Müller, evidenciadas com o anticorpo contra vimentina (Vim, TRITC; **B-C**). Os receptores TRPV1 podem ser encontrados em células endoteliais (ULEX, AMCA; setas) e também em células da glia retiniana, presentes na margem vitreal (GFAP, TRITC; cabeças de setas; **E-F**). Os receptores TRPV1 também puderam ser localizados em processos e em corpos celulares de células da microglia retiniana, marcadas com o anticorpo contra a proteína OX-42 (TRITC; cabeças de seta; **H-I**). O receptor TRPV1 foi encontrado em processos axonais de células ganglionares, revelados pelo anticorpo anti-neurofilamentos (PAN, TRITC; **K**). Nesse material (n=4) foi realizada uma análise de intensidade de marcação com o programa ImageJ, com a finalidade de evidenciar os pontos de dupla marcação entre o receptor TRPV1 e axônios de células ganglionares, tanto na retina como no nervo óptico. A quantificação indica que a expressão de TRPV1 é muito mais intensa na margem vitreal da retina e na cabeça do nervo óptico, e diminui gradualmente ao longo do nervo óptico (**L**). A análise de colocalização também indicou que a expressão de TRPV1 é maior nas porções de fibras axonais de da cabeça do nervo óptico. Também encontramos marcação para

TRPV1 em vesículas sinápticas, como demonstrado pela sua colocalização com sinaptofisina (setas em **O**). Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada plexiforme externa (OPL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL), da camada das células ganglionares (GCL), da camada de fibras nervosas (NFL), da cabeça do nervo óptico (ONH), do nervo óptico (ON) e da margem vitreal retiniana (RVM).

A presença de TRPV1 na retina já foi detectada na retina de roedores e de outros vertebrados. Na retina de peixes, a expressão de TRPV1 foi encontrada na OPL, especificamente em terminais sinápticos de fotorreceptores (ZIMOV e YAZULLA, 2004). Na retina de peixe dourado, a expressão de TRPV1 também foi encontrada em células amácrinas na INL e em duas lâminas da IPL (ZIMOV e YAZULLA, 2007). Nesses animais, a expressão de TRPV1 foi encontrada em colocalização com a FAAH, a enzima de degradação da anandamida. Na retina de ratos, a expressão proteica de TRPV1 foi primeiramente detectada por experimentos de filtragem rápida (NUCCI et al., 2007). Em seguida, a expressão de TRPV1 foi detectada diretamente em células microgliais da retina (SAPPINGTON e CALKINS, 2008) e em células ganglionares da retina de ratos e camundongos (SAPPINGTON et al., 2009). Entretanto, a evidência indireta da presença desse receptor na retina foi feita originalmente por Ritter e Dinh, em 1990 (RITTER e DINH, 1990). Nesse estudo, a injeção intraperitoneal em ratos neonatos do agonista prototípico de TRPV1, a capsaicina, causou a degeneração de neurônios e de fibras nervosas em diversas regiões do sistema nervoso central, incluindo a retina, principalmente nas camadas internas da retina. Posteriormente, foi demonstrado que a capsaicina causa morte de células ganglionares, o que diminui o transporte da toxina colérica para áreas mais centrais do sistema visual (RITTER e DINH, 1991).

Identificamos na retina de ratos adultos que a expressão de TRPV1 em células neuronais é restrita a células na INL e, em menor número, a células da GCL e seus processos, bem como em terminais sinápticos na IPL e OPL. A expressão de TRPV1 também foi identificada na IPL e OPL de ratos e camundongos adultos (SAPPINGTON et al., 2009). Em ambas as camadas plexiformes, encontramos que os receptores TRPV1 são coexpressos com o marcador pré-sináptico sinaptofisina. A presença de receptores TRPV1 em sítios pré-sinápticos já foi descrita anteriormente (BAE et al., 2004; LI; CHEN; PAN, 2004; TOTH et al., 2005; ZIMOV e YAZULLA, 2004). A atividade desses receptores tem sido correlacionada com a liberação de neurotransmissores, incluindo a potenciação da liberação de glutamato (LI; CHEN; PAN, 2004; MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008) e de GABA e glicina (FERRINI et al., 2007). Assim, nossos dados são sugestivos de que a função dos receptores TRPV1 pode estar associada com o controle da liberação de neurotransmissores na retina.

No corno dorsal da medula espinhal de ratos, esse receptor é expresso em uma pequena população de astrócitos positivos para GFAP (DOLY et al., 2004). Por

microscopia eletrônica, também foi demonstrado que esses receptores são expressos em astrócitos que envolvem pequenos vasos sanguíneos e também em pericitos (TOTH et al., 2005). Nossos dados, em conjunto com dados da literatura, indicam que a atividade de TRPV1 pode ser importante para o controle vascular do tecido retiniano. Por exemplo, a ativação de TRPV1 previamente a uma lesão causada por isquemia e reperfusão da retina diminuiu a morte de células na GCL (NUCCI et al., 2007). Em modelos de isquemia e reperfusão, a primeira região onde pode ser observada morte celular é a porção periférica da GCL (OSBORNE et al., 2001), onde nós achamos maior expressão desse receptor. Assim, acreditamos que a ativação de TRPV1 previamente a uma lesão isquêmica pode proteger o tecido retiniano por causar vasodilatação das arteríolas, elevando o aporte e estocagem de nutrientes e oxigênio, dessa forma protegendo as células ganglionares contra a hipóxia e a hipoglicemia causadas pela isquemia.

Corroborando com isso o fato de que a ativação de receptores TRPV1 em vasos sanguíneos (MOVAHED et al., 2005; POBLETE et al., 2005) ou em pericitos (HELYES et al., 2007) causa vasodilatação. A ativação de TRPV1 em astrócitos e em pericitos leva à liberação de CGRP, que por sua vez causa vasodilatação (AKERMAN; KAUBE; GOADSBY, 2004; WANG et al., 2006). Essas células estão envolvidas no controle vasomotor da retina (METEA e NEWMAN, 2006, 2007). Por outro lado, a ativação de TRPV1 quando presente diretamente nos vasos sanguíneos também pode provocar vasodilatação. A ativação desse receptor causou influxo de cálcio nas células endoteliais do mesentério de ratos, havendo liberação de NO e formação de GMP cíclico nesse tecido (POBLETE et al., 2005). Assim, nossos dados sugerem que esse receptor pode modular vias sinalizadoras envolvidas na comunicação glial e endotelial da retina, dessa forma regulando o fluxo sanguíneo nesse tecido.

Encontramos expressão de TRPV1 nas células da microglia retiniana, confirmando dados recentes da literatura (SAPPINGTON e CALKINS, 2008). Nessas células, a função de TRPV1 parece estar ligada com a ativação celular. Recentemente, foi demonstrado que a ativação *in vitro* de células da microglia por estímulos hidrostáticos é bloqueada pelo antagonista de TRPV1, a iodo-resiniferatoxina. Esse composto diminuiu a translocação de NFkappaB ao núcleo, diminuindo dessa forma a expressão e liberação de interleucina 6 (IL-6) em um modelo de glaucoma que leva a aumento da pressão intraocular (SAPPINGTON e CALKINS, 2008).

Dando sequência aos nossos estudos, avaliamos como o bloqueio de receptores TRPV1 pode influenciar no desenvolvimento da retina de ratos. Esses resultados fizeram parte do artigo “*TRPV1 receptors modulate retinal development*” que foi recentemente submetido para publicação no jornal *International Journal of Developmental Neuroscience* (ANEXO D). O início do desenvolvimento da retina é caracterizado por intensa proliferação e apoptose (OPPENHEIM, 1991). Diversas moléculas extracelulares podem sinalizar o início do processo apoptótico, entre elas, alguns neurotransmissores. Esses, ao agirem em seus receptores, podem mobilizar cálcio direta ou indiretamente, modulando, dessa forma, diversas vias intracelulares que são dependentes de cálcio (LINDEN; MARTINS; SILVEIRA, 2005). Os receptores TRPV1 podem mobilizar cálcio (CATERINA et al., 1997) e sua atividade tem sido extensivamente correlacionada com apoptose em células diferenciadas e não diferenciadas.

Assim, para avaliar os possíveis efeitos do bloqueio de TRPV1 sobre a proliferação celular (Figura 4), realizamos a análise da expressão de Ki67 e PCNA. O PCNA é uma proteína expressa por células em proliferação que alcança sua expressão máxima durante a fase de síntese do ciclo celular (MOLDOVAN; PFANDER; JENTSCH, 2007), e o Ki67 é uma proteína associada ao ciclo celular que é descrita como um marcador de mitose na retina (IKEDA et al., 2005). O número de células positivas para Ki67 foi similar em explantes retinianos tratados com solução controle e em retinas tratadas com capsazepina ($6,9 \pm 0,8$ células em retinas controle; $7,4 \pm 1,0$ células após tratamento com capsazepina $10\mu\text{M}$; $p > 0,05$). A média do conteúdo proteico de PCNA foi estatisticamente similar após a incubação com capsazepina $10\mu\text{M}$ ($89,6 \pm 10,8\%$ dos valores do controle; $p > 0,05$). Dessa forma, descartamos a participação do TRPV1 no controle da proliferação celular retiniana.

Em seguida, avaliamos os efeitos do bloqueio de TRPV1 sobre a apoptose que ocorre fisiologicamente durante as fases iniciais do desenvolvimento da retina. Para tanto, utilizamos a técnica de TUNEL, que identifica fragmentação de DNA. Incubamos explantes retinianos de animais de 4 dias de idade com capsazepina ($1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) durante 6 horas. Não houve alteração do número de células marcadas para TUNEL em qualquer das áreas analisadas (Figura 5A). Entretanto, a incubação de explantes retinianos por 12 horas (Figura 5B) na presença de capsazepina reduziu o número de células apoptóticas na NBL e na INL ($6,0 \pm 1,1$ células nas retinas controle e $2,4 \pm 0,6$

células nos explantes tratados com capsazepina 1 μ M e $3,0 \pm 0,4$ células nos explantes tratados com capsazepina 10 μ M; $p < 0,05$ em ambas as condições). A incubação dos explantes retinianos com capsazepina 10 μ M também reduziu o número de células apoptóticas na GCL ($3,4 \pm 0,7$ células nas retinas controle e $1,7 \pm 0,5$ células nos explantes tratados com capsazepina 10 μ M; $p < 0,05$).

Figura 4 - Avaliação da expressão de marcadores de ciclo celular em explantes retinianos de animais P4. As retinas foram incubadas com veículo ou com capsazepina 10 μ M. As retinas foram cultivadas durante 12 horas e foram então preparadas para *immunoblotting* ou para imunistoquímica. **A** Células Ki67-positivas foram achadas na camada neuroblástica da retina (NBL). As células foram contadas em campos de 210 μ m lineares da retina central (cinco imagens de cada retina; n=4). **B** Expressão protéica de PCNA. A densidade óptica foi analisada com o software ImageJ. As médias foram comparadas com teste *t* de Student (n=6). Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias. As barras representam média $\pm$ erro padrão.

A - Capsazepina por 6 horas

	Controle	CPZ 1 μ m	CPZ 10 μ m	
NBL e INL	8,2 $\pm$ 0,65	8,1 $\pm$ 0,80	7,8 $\pm$ 0,72	$p > 0,05$ para todas as comparações
GCL	3,4 $\pm$ 0,40	3,8 $\pm$ 0,56	3,3 $\pm$ 0,46	

B - Capsazepina por 12 horas

Figura 5 - Avaliação da apoptose em retinas de animais P4. Os explantes retinianos foram incubados com veículo ou com capsazepina 1-10 μ M. As retinas foram cultivadas por 4 (A) ou 12 horas (B) e então foram preparadas para o ensaio de TUNEL. As células foram contadas em campos de 170 μ m lineares da retina central. Os valores (cinco imagens para cada retina; n=4) foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey.

Nossos resultados evidenciaram que a atividade de TRPV1 pode estar correlacionada com a morte celular que é observada durante o desenvolvimento da retina. Em outros estudos, foi demonstrado que a ativação desse receptor causa apoptose de células derivadas de neuroblastomas (LAM et al., 2007; MACCARRONE et al., 2000), linfoma (MACCARRONE et al., 2000), glioma (AMANTINI et al., 2007; CONTASSOT et al., 2004), assim como de neurônios de animais adultos provenientes de gânglio da raiz dorsal (CHARD et al., 1995), do córtex cerebral (SHIRAKAWA et al., 2008), e na retina (LEONELLI et al., 2009; RITTER e DINH, 1990). O bloqueio de TRPV1 reduziu a apoptose nas mesmas camadas retinianas onde encontramos a expressão desse receptor (Figura 2). Por outro lado, o agonista de TRPV1, a capsaicina, causou morte celular também na INL e na GCL da retina de ratos pré-púberes (RITTER e DINH, 1990). Durante o desenvolvimento da retina, a atividade de TRPV1 poderia levar à morte celular por diversos mecanismos. Um deles seria o alto influxo de cálcio que esse receptor permite quando ativado. O excesso de cálcio pode ser tamponado pela mitocôndria, levando assim à perda do potencial transmembrânico mitocondrial (DEDOV e ROUFOGALIS, 2000). Esses fatores são conhecidos por causar dano mitocondrial e induzir apoptose dependente de caspases (DEMAUREX e DISTELHORST, 2003). Ainda, diversos neurotransmissores podem regular a apoptose na retina (LINDEN; MARTINS; SILVEIRA, 2005). O glutamato, por exemplo, é um conhecido mediador excitatório que pode causar excitotoxicidade. Sua ativação pode levar à morte celular na INL retiniana em desenvolvimento (ROCHA; MARTINS; LINDEN, 1999). Associado ao fato de que a ativação de TRPV1 pode levar à exocitose de vesículas de neurotransmissores (LAM et al., 2007), incluindo o glutamato (MARINELLI et al., 2002; MUSELLA et al., 2009; PALAZZO et al., 2002), suspeitamos que o bloqueio de TRPV1 pode ter reduzido a liberação de alguns neurotransmissores que também são responsáveis pelo controle da apoptose na retina em desenvolvimento.

Visto que o tratamento dos explantes retinianos com o antagonista de TRPV1 diminuiu o número de células apoptóticas na retina, decidimos investigar a expressão de algumas proteínas envolvidas em vias que participam do controle da sobrevivência, divisão e morte celular. Os explantes retinianos foram incubados mais uma vez na presença de capsazepina (1 μ M e 10 μ M) por 12 horas e então foram preparados para *immunoblotting*. A expressão da proteína pró-apoptótica BAD, da proteína anti-

apoptótica Bcl-2, e também das frações não-clivada (32 kDa) e clivada da caspase 3 (17 e 19 kDa) foi semelhante em todas as condições experimentais em comparação com os valores dos controles (Figura 6A; $p>0,05$). Dessa forma, nossos dados evidenciam que a função de TRPV1 durante o desenvolvimento da retina não envolve a modulação de caspase 3 ou de proteínas contrarreguladoras de caspase 3. Isso foi observado previamente em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, onde a apoptose causada pela ativação de TRPV1 não foi correlacionada com a atividade das caspases (DAVIES et al., 2010).

Nesse mesmo tecido, analisamos a ativação de algumas proteínas da família das MAP-quinases (Figura 6B). Nas retinas tratadas com o antagonista de TRPV1 capsazepina, a fosforilação de ERK1/2 encontrou-se grandemente aumentada ($293,9 \pm 2,3\%$ dos valores controle para capsazepina $1\mu\text{M}$, e $531,6 \pm 29,3\%$ dos valores controle para capsazepina $10\mu\text{M}$). A fosforilação de p38 também estava aumentada após o tratamento com capsazepina ($118,3 \pm 3,1\%$ dos valores controle para capsazepina $1\mu\text{M}$, e $123,0 \pm 1,2\%$ dos valores controle para capsazepina $10\mu\text{M}$). Por outro lado, a fosforilação de JNK estava reduzida para o peso molecular de 46 kDa ($47,7 \pm 11,7\%$ dos valores controle para capsazepina $10\mu\text{M}$), enquanto que os valores para o outro peso molecular esperado, de 54 kDa, estava similar em todas as condições experimentais.

Com a intenção de verificar se o bloqueio agudo de TRPV1 causou alguma alteração aguda no desenvolvimento de alguns subtipos celulares, nós comparamos a expressão proteica de alguns marcadores proteicos bem conhecidos de subpopulações específicas de neurônios (Figura 6C). Os explantes retinianos foram incubados mais uma vez na presença de capsazepina ($10\mu\text{M}$) por 24 horas e então foram preparados para *immunoblotting*. O tratamento com o antagonista de TRPV1 reduziu o conteúdo proteico de calretinina ($50,1\% \pm 8,0$ dos valores do controle; $p<0,05$). A expressão de calbindina e parvalbumina não estava alterada na condição experimental em comparação com os controles.

Figura 6 - Avaliação da expressão de proteínas envolvidadas na via apoptótica da caspase 3, na sinalização de MAP-quinases, e de proteínas ligantes de cálcio. Os explantes retinianos foram tratados por 12 (**A** e **B**) e por 24 horas (**C**) com o antagonista de TRPV1 capsazepina, em diferentes concentrações (1-10μM) e foram preparados posteriormente para *immunoblotting* (n=4 para cada condição). **A** Avaliação da via apoptótica que envolve a capsapase 3. Os *immunoblottings* para BAD, BCL-2, caspase 3 e caspase 3 clivada são apresentados. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. **B** Análise da ativação por fosforilação de diversas MAP quinases. Os *immunoblottings* para fosfo-p38, fosfo-JNK e fosfo-ERK1/2 são apresentados. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. **C** Análise comparativa da expressão de algumas proteínas ligantes de cálcio. As médias foram comparadas com teste *t* de Student. Todas as médias foram consideradas significativamente diferentes quando o valor de *p* era menor do que 0,05. A expressão de β-actina foi utilizada como controle interno.

Nossos resultados indicam que o bloqueio de TRPV1 modula a fosforilação de diversas MAP-quinases durante o desenvolvimento da retina. A sinalização por MAP-quinases é regulada por diversas outras vias de sinalização, cuja origem pode ser um estímulo disparador extracelular ou intracelular, resultando na modulação da transcrição gênica ou em modificações que ocorrem antes ou depois da tradução de proteínas e, dessa forma, controlando um número muito grande de eventos celulares associados à divisão celular, diferenciação, crescimento e apoptose (JUNTILA; LI; WESTERMARCK, 2008). Especificamente, as JNKs estão envolvidas com a regeneração e o desenvolvimento do sistema nervoso central (HAEUSGEN et al., 2009), onde elas são moléculas essenciais em processos como a migração de neurônios em desenvolvimento (GDALYAHU et al., 2004; KAWAUCHI et al., 2003) e na morte celular (KUAN et al., 1999). Durante o desenvolvimento, a ativação de p38 é correlacionada com o crescimento de neuritos, com a diferenciação celular (MOROOKA e NISHIDA, 1998), e com a morte celular programada (CAMPOS; BEDARD; LINDEN, 2006; OLIVEIRA et al., 2008), enquanto que a ERK1/2 tem sido correlacionada com a proliferação (MELOCHE e POUYSSÉGUR, 2007) e a sobrevivência celular (JUNTILA; LI; WESTERMARCK, 2008).

Nesse estudo, o antagonismo de TRPV1 reduziu a fosforilação de JNK, o que sugere que o tônus vanilóide 1 pode regular a atividade de JNK durante o desenvolvimento da retina. Reforça essa ideia o fato de que a ativação de TRPV1 pela capsaicina ou pelo agonista ultrapotente resiniferatoxina aumentou a fosforilação de JNK em células Jurkat (MACHO et al., 1998). Também encontramos que o bloqueio de TRPV1 aumentou a fosforilação de p38 e da ERK 1/2. Foi demonstrado recentemente que a fosforilação dessas duas proteínas é modulada dinamicamente durante o desenvolvimento da retina (OLIVEIRA et al., 2008). Interessantemente, há um pico de fosforilação de p38 em P4, exatamente a idade em que há maior intensidade de morte celular na retina em desenvolvimento, enquanto que é baixa a fosforilação de ERK1/2 nesse mesmo período (BEAZLEY et al., 1987). Já na retina do animal adulto, a ativação de p38 é elevada, assim como a de ERK 1/2. Assim, o efeito pró-apoptótico de p38 parece ser proeminente na retina em desenvolvimento, enquanto que a ERK1/2 parece contrabalancear esses efeitos na retina do animal adulto.

Também de grande importância é o fato de que há grande interação nas vias de sinalização de p38 e ERK1/2. Foi demonstrado em células PC12 que a morte celular

programada causada pela ausência de NGF é acompanhada de diminuição da fosforilação de ERK1/2, enquanto que há aumento da atividade da p38 (XIA et al., 1995). Em células HeLa, a inibição de ERK1/2 levou a aumento da ativação da p38, bem como também causou morte celular por apoptose (BERRA; DIAZ-MECO; MOSCAT, 1998). Corroborando com nossos resultados, foi demonstrado que a ativação de TRPV1 levou a morte de células de glioma (AMANTINI et al., 2007; CONTASSOT et al., 2004), o que parece ser dependente da ativação de p38 (AMANTINI et al., 2007). Assim, embora não se saiba ainda todos os processos que traduzem as alterações do metabolismo de cálcio na modulação das vias das MAP-quinases, nossos resultados são altamente sugestivos de que a sinalização por MAP-quinases são pelo menos parcialmente dependentes da atividade de TRPV1. Ainda, embora tenha havido aumento da fosforilação de p38 nas retinas tratadas com capsazepina, o grande aumento da fosforilação de ERK1/2 parece ser o responsável pela diminuição de células positivas para TUNEL em nossos experimentos.

A expressão de calretinina estava diminuída nos explantes retinianos expostos à capsazepina. A calretinina é uma proteína tamponante de cálcio de 29kDa, que é altamente expressa na retina (RODRIGUES et al., 1988). Essa proteína é expressa em células amácrinas, na grande maioria das células ganglionares e em três bandas da IPL (MOJUMDER; WENSEL; FRISHMAN, 2008; PASTEELS et al., 1990). Na retina, a expressão de calretinina inicia bem cedo durante o desenvolvimento, assim que há o aparecimento das células amácrinas e ganglionares (LOELIGER e REES, 2005; NAG e WADHWA, 1999). Não há dados na literatura em que sejam evidenciados os mecanismos de controle da expressão de calretinina. Entretanto, foi demonstrado que a expressão de calretinina aumenta no período em que as conexões sinápticas se tornam funcionais e a atividade espontânea se inicia no núcleo magnocelular do tronco encefálico (HACK et al., 2000). Assim, nossos resultados sugerem que a atividade de TRPV1 pode ser importante para a modulação da expressão da calretinina na retina.

Em seguida, analisamos na retina de ratos adultos (P60) os efeitos a longo prazo do tratamento com capsazepina durante o desenvolvimento da retina. Para tanto, ratos P4 receberam 3 doses diárias de solução controle ou de 40mg de capsazepina, intraperitonealmente. Avaliamos a morfometria das camadas das retinas dos animais adultos (Figura 7). Como pode ser observado, o comprimento vertical da retina total e das diversas camadas retinianas não foi alterado significativamente pelo tratamento.

Com retinas de ratos tratados de forma semelhante, avaliamos a expressão de diversos marcadores celulares em cortes transversais da retina central, por imunoperoxidase e por imunofluorescência. Esses dados encontram-se resumidos na Tabela 2. O número de células amácrinas parvalbuminéricas (Figura 8A e B) estava aumentado nas retinas de ratos tratados com capsazepina ($208,4 \pm 5,5$ células nas retinas de ratos controles $228,0 \pm 6,9$ nas retinas de ratos tratados com capsazepina; 1 mm de retina linear; $p < 0,05$). Não foi encontrada alteração na contagem de células marcadas para calretinina (Figura 8C e D), calbindina (Figura 8E e F), ChAT (Figura 8G e H), vimentina (Figura 8I e J), PKC-alfa (Figura 8M e N), e GABA (Figura 8O e P). A expressão de GFAP foi analisada com o intuito de avaliar se o tratamento com capsazepina resultou em alguma reação detectável de células de Müller. Como pode ser observado, o sinal para GFAP não estava alterado nas retinas tratadas e nas retinas controle (Figura 8K e L).

Em animais tratados de forma semelhante, avaliamos comparativamente o conteúdo proteico de alguns marcadores celulares por *immunoblotting* (Figura 9). O conteúdo proteico de calbindina e parvalbumina se apresentou aumentado nas retinas tratadas com capsazepina ($220,10 \pm 42,3\%$ dos valores controle para calbindina; $261,0 \pm 27,6\%$ dos valores controle para parvalbumina; $p < 0,001$). A expressão de sinaptofisina Ib também estava aumentada nas retinas de ratos tratados com capsazepina ($169,3 \pm 18,8\%$ dos valores controle; $p < 0,05$). O conteúdo protéico de calretinina, vimentina, GFAP, sinapsina Ia, e de neurofilamentos de baixo peso molecular (NFL-L) não foi alterado pelo tratamento com capsazepina ($p > 0,05$).

Esses resultados sugerem que a diminuição da apoptose causada pelo bloqueio de TRPV1 durante as fases iniciais do desenvolvimento repercute na organização da retina do animal adulto. A calbindina é um conhecido marcador de células horizontais, mas ela também pode ser encontrada em células amácrinas e em umas poucas células ganglionares da retina de ratos (HAMANO et al., 1990; PASTEELS et al., 1990). A parvalbumina é expressa na grande maioria das células amácrinas e em algumas células ganglionares (HAMANO et al., 1990). As sinaptofisinas são proteínas pré-sinápticas (WIEDENMANN e FRANKE, 1985) que podem ser encontradas na INL e na IPL (BRANDSTATTER et al., 1996).

É sabido que a sobrevivência de células amácrinas é dependente da sinalização de ERK1/2 (KUNZEVITZKY; ALMEIDA; GOLDBERG, 2010), mas os mecanismos

envolvidos permanecem obscuros. Alguns achados interessantes indicam que a ERK1/2 pode ser modulada pela despolarização sináptica (FIORE et al., 1993). Nesse contexto, a ERK1/2 parece modular a plasticidade sináptica (THOMAS e HUGANIR, 2004), aumentando o número de arborizações dendríticas (WU; DEISSEROTH; TSIEN, 2001) e o tráfico local de algumas proteínas sinápticas (ENGERT e BONHOEFFER, 1999; TONI et al., 1999). Entretanto, nossos resultados indicam que o bloqueio de TRPV1 aumenta a fosforilação de ERK1/2. Nossos resultados parciais e ainda não quantificados indicam que praticamente não há expressão de TRPV1 em células que expressam a parvalbumina ou a calbindina. Na INL, sabe-se que essas células são majoritariamente interneurônios hiperpolarizantes (CUEVA et al., 2002; VERSAUX-BOTTERI; POCHET; NGUYEN-LEGROS, 1989), que recebem sinais excitatórios (CHAVEZ e DIAMOND, 2008; HANKINS e IKEDA, 1991). Baseado no fato de que os receptores TRPV1 são expressos em terminais pré-sinápticos da retina (Figura 3), e que a atividade deles tem sido correlacionada com a liberação de neurotransmissores excitatórios (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008; SIKAND e PREMKUMAR, 2007; XING e LI, 2007), nós acreditamos que o bloqueio de TRPV1 durante o desenvolvimento poderia reduzir os sinais excitatórios para aqueles neurônios inibitórios que expressam parvalbumina e calretinina, assim reduzindo a sua atividade e a liberação de neurotransmissores inibitórios. Isso poderia permitir um maior número de sinais excitatórios que poderiam funcionar como sinais tróficos e de sobrevivência na retina.

Figura 7 - Efeitos do antagonista de TRPV1 capsazepina na histogênese da retina de ratos. Ratos de idade P4 receberam doses diárias de veículo (salina com DMSO 0,1%) ou capsazepina (40mg/Kg; IP) por três dias, e foram mantidos até os 2 meses de idade. Foi realizada a análise morfométrica das diversas camadas da retina central (n=5 retina, 4 animais). As médias foram comparadas com teste *t* de Student (n=4). As barras representam média $\pm$ erro padrão. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias. As legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL) e da camada das células ganglionares (GCL).

Tabela 2 - Quantificação de subtipos celulares específicos identificados com imunistoquímica em retinas de ratos adultos que foram tratados com capsazepina e solução controle durante o início da vida pós-natal.

Marcador	<i>Subtipos celulares /camadas da retinas</i>	Controle	Capsazepina
Parvalbumina	<i>Células amácrinas</i>	208,4 ± 5,5	228,0 ± 6,9 *
PKC-alfa	<i>Células bipolares de bastonetes</i>	257,4 ± 7,8	254,8 ± 6,1
GABA	<i>Células amácrinas</i>	68,4 ± 4,4	75,5 ± 2,2
	<i>GCL</i>	28,0 ± 1,8	26,7 ± 2,2
Calretinina	<i>INL</i>	133,5 ± 3,8	127,5 ± 3,5
	<i>GCL</i>	75,0 ± 1,8	76,0 ± 3,3
Calbindina	<i>Células horizontais</i>	31,0 ± 1,4	35,0 ± 1,8
	<i>amacrine cells</i>	147,0 ± 2,2	147,3 ± 3,5
ChAT	<i>Células amácrinas</i>	25,8 ± 1,0	25,5 ± 1,0
	<i>Células amácrinas deslocadas</i>	13,8 ± 0,5	14,5 ± 0,8
Vimentina	<i>Células de Müller</i>	697,4 ± 7,8	707,8 ± 10,4

Figura 8 - Cortes transversais da retina de ratos adultos marcados com o método de imuno-peroxidase para parvalbumina (A e B), calretinina (C e D), calbindina (E e F), ChAT (G e H), vimentina (I e J), e GFAP (K e L), e com imuno-fluorescência para PKC-alfa (M e N; verde) ou GABA (O e P; verde) e Nissl fluorescente (Neurotrace 640/660, vermelho). Ratos de idade P4 receberam doses diárias de veículo (salina com DMSO 0,1%) ou capsazepina (40mg/Kg; IP) por três dias, e foram mantidos até os 2 meses de idade. As legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL) e da camada das células ganglionares (GCL). Barra de escala = 50 µm.

Figura 9 - Análise comparativa de diversos marcadores celulares na retina de ratos adultos. Ratos de idade P4 receberam doses diárias de veículo (salina com DMSO 0,1%) ou capsazepina (40mg/Kg; IP) por três dias, e foram mantidos até os 2 meses de idade. O peso molecular estimado de cada proteína é indicado. As médias foram comparadas com teste *t* de Student. Todas as médias foram consideradas significativamente diferentes quando o valor de *p* era menor do que 0,05. A expressão de β-actina foi utilizada como controle interno.

4.2 Participação de receptores TRPV1 na degeneração retrógrada retiniana e possíveis mecanismos envolvidos

Nesse conjunto de experimentos, nossa intenção foi observar como a função de TRPV1 pode influenciar ou ser influenciada durante a fase aguda após a lesão do nervo óptico na retina de ratos adultos. Parte desses resultados fizeram parte do artigo “*TRPV1 receptors are involved in protein nitration and Müller cell reaction in the acutely axotomized rat retina*” que foi publicado no *Experimental Eye Research* em meados de 2010 (ANEXO C).

O procedimento escolhido neste estudo para realizar a axotomia em células ganglionares é amplamente utilizado (KERMER et al., 2001), e é aceito como mais uma ferramenta utilizada para estudar e compreender a patogênese do glaucoma (MCKINNON; SCHLAMP; NICKELLS, 2009). Foi demonstrado que a secção do nervo óptico próximo ao globo ocular resulta em morte de células ganglionares, que se inicia após cinco dias da lesão. No período entre 7 e 10 dias após a lesão há morte maciça das células ganglionares, atingindo aproximadamente 50% do total de células. Esse é o período agudo após a lesão, e é seguido pela fase crônica de morte na camada GCL, que perdura até o 21 dia após a lesão (BERKELAAR et al., 1994). Assim, nossa intenção original era a de avaliar como a atividade dos receptores TRPV1 pode influenciar ou ser influenciada durante a fase aguda após a lesão do nervo óptico.

A imunorreatividade para TRPV1 nas retinas de ratos adultos pode ser observada na Figura 10A. A expressão de TRPV1 alberga todas as camadas nucleares e plexiformes da retina, podendo ser encontrada principalmente IPL, na GCL e na INL. Após 7 dias da lesão do nervo óptico, a expressão de TRPV1 estava levemente aumentada na NFL e na GCL, enquanto que o sinal gerado pela imunoperoxidase estava levemente diminuído em comparação com as retinas controle. Aos 21 dias após a lesão do nervo óptico a expressão de TRPV1 na margem vitreal da retina estava aumentada. Entretanto, ao realizarmos a contagem de células positivas para TRPV1 em cortes transversais, foi observado que o número de células na GCL diminuiu nas retinas após 21 dias da lesão do nervo óptico ($32,3 \pm 2,7$ células na GCL de retinas com lesão e $51,3 \pm 2,1$ células em retinas de animais falso-operados; $p < 0,001$). Retinas de ratos *naïve* apresentaram $53,3 \pm 1,8$ células positivas para TRPV1, com morfologia semelhante a de neurônios na GCL, e $107 \pm 7,2$ de células na INL.

Nós também realizamos triplas marcações com o intuito de verificar em que tipos celulares havia modulação da expressão de TRPV1 após 21 dias da lesão do nervo óptico (Figura 10B). Como observado anteriormente, foi observado que diversos subtipos celulares da retina de ratos adultos expressam TRPV1. Como pode ser visto nas imagens de retinas previamente lesionadas, a expressão de TRPV1 estava aumentada na camada GCL remanescente, e a imunorreatividade para esse receptor pode ser encontrada apenas quando colocalizada com o marcador astrocitário GFAP, o marcador de células de microglia OX-42, ou em axônios positivos para neurofilamentos.

Como o GFAP é também expresso nos pés terminais de células de Müller e, em retinas lesionadas, nos corpos celulares das células de Müller, realizamos duplas marcações com anticorpos específicos contra TRPV1 e vimentina, que é um marcador específico de células de Müller. Não houve sobreposição para o sinal para TRPV1 e vimentina tanto nas retinas com lesão quanto nas retinas controle. A expressão de TRPV1 estava levemente aumentada na NFL, assim como na INL, na IPL e na GCL, principalmente em células da microglia. Utilizamos a calretinina e o Neurotrace, que é uma coloração de Nissl fluorescente, para localizar TRPV1 em neurônios, mas, em retinas lesionadas, essa colocalização foi achada apenas na IPL e na INL.

A análise de *immunoblotting* para a expressão proteica de TRPV1 (Figura 10C) demonstrou que o conteúdo total de TRPV1 estava estatisticamente similar durante a fase aguda após a lesão do nervo óptico, i. e., 7 dias após a lesão do nervo ($p = 0,99$), enquanto que estava diminuída aos 21 dias após a lesão do nervo óptico quando comparada com as retinas de animais falso-operados ou *naïve* ($66,2\% \pm 7,5$ dos valores de retinas de animais *naïve*; $p < 0,01$).

Figura 10 - Análise da distribuição e expressão de TRPV1 na retina de ratos. **A** Distribuição da expressão de receptores TRPV1 na retina interna após a lesão de nervo óptico. A contagem de células TRPV1 positivas foi realizada nas regiões centrais de cortes transversais totais da retina (n=4 por retina, 5 retinas). Setas indicam células na INL, e cabeças de setas indicam células na GCL. Os valores foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. As barras representam média $\pm$ erro padrão. **B** Análise da colocalização de receptores TRPV1 durante o desenvolvimento com diferentes marcadores celulares em cortes transversais de retinas controle e de retinas axotomizadas. Foram realizadas triplas marcações com um anticorpo anti-TRPV1 (FITC) e astrócitos retinianos (GFAP, TRITC), células da microglia (OX-42, TRITC), a camada de fibras de células ganglionares (PAN, TRITC) e a calretinina (TRITC). Os cortes também foram corados com Nissl fluorescente (Neurotrace 640/660, azul) para identificação de neurônios. Cabeças de seta indicam células na GCL. **C** *Immunoblottings* de retinas controle e de retinas previamente axotomizadas. Dados plotados nos gráficos expressam a densidade óptica (OD) das bandas, normalizadas pelos valores encontrados nas retinas de ratos *naive* (P60; n=5). As barras representam média $\pm$ erro padrão. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. As legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada das células ganglionares (GCL), e da camada de fibras nervosas (NFL). SHAM, retinas de animais falso-operados, e LES, retinas de animais com lesão do nervo óptico.

A transecção do nervo óptico diminuiu o conteúdo de TRPV1 na retina. O mesmo efeito foi observado nos gânglios da raiz dorsal da medula após a lesão do nervo ciático (MICHAEL e PRIESTLEY, 1999). A expressão de TRPV1 pode ser modulada por fatores de crescimento, como o NGF, o fator de crescimento derivado da glia (GDNF) e a neurotrofina 3 (ANAND et al., 2006; PRIESTLEY et al., 2002). Especificamente, a ativação do receptor TrkA de NGF pode promover a expressão de TRPV1 por meio da ativação da MAP-quinase p38 (PUNTAMBEKAR et al., 2005). Entretanto, nossas observações indicam que a expressão total de TRPV1 diminuiu progressivamente após a secção do nervo óptico. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que há grande expressão desse receptor nas células ganglionares da retina (LEONELLI et al., 2009; SAPPINGTON et al., 2009), que morrem progressivamente após a axotomia do nervo óptico. No modelo de axotomia que utilizamos é esperado que praticamente todas as células ganglionares tivessem degenerado após 21 dias da lesão (BERKELAAR et al., 1994) e, assim, as células positivas para TRPV1 encontradas após 21 dias da lesão na margem vitreal da retina possivelmente correspondem a células da microglia (GARCIA-VALENZUELA; SHARMA; PINA, 2005; ZHANG e TSO, 2003), que também expressam receptores TRPV1 (LEONELLI et al., 2009; SAPPINGTON e CALKINS, 2008) ou, ainda, podem ser células amácrinas deslocadas (WILLIAMS et al., 2001). Essa última hipótese é reforçada por nossos resultados, visto que um grande número de células positivas para TRPV1 também estavam marcadas para calretinina, que é um marcador de células ganglionares de subpopulações específicas de células amácrinas (LEE; LEE; JEON, 2010; VERUKI e WASSLE, 1996).

Em seguida avaliamos por Fluoro-Jade B se a modulação de TRPV1 causaria degeneração celular em retinas de animais controle ou de animais lesionados. No nosso estudo, optamos pelo Fluoro-Jade B para avaliar a extensão do processo degenerativo que ocorreu durante a fase aguda após a lesão do nervo óptico. O Fluoro-Jade B é um derivado aniônico de fluoresceína que identifica poliaminas catiônicas em células em degeneração (SCHMUED e HOPKINS, 2000). Esse marcador tem sido utilizado para identificar células degenerativas no sistema nervosa central. Na retina, uma molécula de geração anterior, o Fluoro-Jade A (SCHMUED; ALBERTSON; SLIKKER, 1997), detectou apenas debris axonais após lesões de esmagamento do nervo óptico. Nos nossos experimentos, não houve marcação para Fluoro-Jade B em retinas de animais

naïve (dados não mostrados), nos animais falso-operados e nas retinas tratadas com veículo (Figura 11A). Após 7 dias da lesão do nervo óptico, as retinas apresentaram uma fraca marcação na NFL, e raras células degenerativas foram observadas na GCL ($1,3 \pm 0,5$ célula por corte transversal). Após dois dias da injeção intraocular do agonista de TRPV1, a capsaicina, ($100\mu\text{M}$; $3\mu\text{L}$), detectamos algumas células degenerativas na GCL ($2,8 \pm 1,0$; $p < 0,05$) e na INL ($3,3 \pm 1,0$; $p < 0,05$) das retinas sem lesão do nervo óptico. O Fluoro-Jade B também marcou a NFL dessas retinas e alguns pequenos processos ao redor dos vasos sanguíneos da retina interna. Interessantemente, a lesão prévia do nervo óptico aumentou o número de células degenerativas induzida pela capsaicina na GCL ($5,2 \pm 0,8$; $p < 0,05$) e na INL ($10,3 \pm 1,7$; $p < 0,05$). Nas retinas de animais falso-operados, a combinação de capsaicina e capsazepina resultou em pequeno aumento no número de células marcadas na GCL ($0,5 \pm 0,5$; $p < 0,05$) e na INL ($1,3 \pm 0,3$; $p < 0,05$). O mesmo ocorreu nas retinas com lesão prévia do nervo óptico, na GCL ($1,0 \pm 0,8$; $p < 0,05$) e na INL ($1,3 \pm 0,5$; $p < 0,05$). As retinas que foram tratadas com capsazepina não apresentaram marcação para Fluoro-Jade B não apresentaram marcação em comparação com as retinas controle.

As retinas de animais com lesão prévia do nervo óptico não apresentaram nenhuma alteração estrutural em comparação com as retinas controle (7 dias após a lesão; Figura 11B). Entretanto, observamos uma pequena diminuição na espessura interna da retina de animais tratados intraocularmente com capsaicina ($\sim 5.0\%$ menor que as retinas controle; $p < 0,05$), enquanto que observamos uma diminuição ainda maior na espessura das retinas que receberam capsaicina após a lesão do nervo óptico ($\sim 6.2\%$ menor que as retinas controle; $p < 0,01$). A injeção simultânea de capsazepina e capsaicina reverteu os efeitos da capsaicina, enquanto que a capsazepina sozinha não causou nenhuma alteração da estrutura da retina interna.

Figura 11 - Morte celular induzida pela ativação de TRPV1. Retinas de animais falso-operados (SHAM) e de animais que sofreram lesão prévia do nervo óptico (5 dias antes) receberam injeções intraoculares do agonista de TRPV1 capsaicina (CAP, 100μM; 3μL), do antagonista capsazepina (CPZ, 100μM; 3μL) ou a combinação de ambos. Os animais foram sacrificados 48 horas após as injeções. **A** Fluoro-Jade B foi utilizado para avaliar células em degeneração (cabeças de setas) e processos neuronais. Alguns processos semelhantes a processos de astrócitos também foram marcados por Fluoro-Jade B, principalmente em regiões perivasculares (setas). A contagem celular foi realizada tanto na camada GCL como na INL (n=4 por retina, 5 retinas) de cortes transversais de *ora serrata* a *ora serrata* da retina. A intensidade da marcação da camada de fibras nervosas foi realizada em cortes centrais da retina (n=5 por retina) usando o software ImageJ. **B** Análise morfométrica da retina central (n=5 por retina, 4 animais) mensurada entre a OPL e a NFL. As barras representam média ± erro padrão **p* < 0,05, e ****p* < 0,001 em análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. As legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear interna (INL), da camada das células ganglionares (GCL), e da camada de fibras nervosas (NFL).

Após uma lesão inicial, as células ganglionares parecem morrer principalmente pelo desbalanço metabólico e consequente excitotoxicidade ocorrida pela menor recaptação de neurotransmissores por células microgliais e de Müller, pelo desequilíbrio aniônico e pela produção de fatores inflamatórios, como o TNF- α , por células da microglia. Dada a expressão preferencial de TRPV1 nessa região e o maior número de células em degeneração que observamos quando da ativação de TRPV1 no tecido previamente lesionado, sugerimos que: (1) pode estar havendo sensibilização dos receptores TRPV1 presentes nesse tecido ou (2) o tecido está mais sensível à excitabilidade mediada pelo cálcio (OSBORNE et al., 2001).

Os receptores TRPV1 podem estar sensibilizados em processos neuroinflamatórios (DI MARZO; BLUMBERG; SZALLASI, 2002). Estruturalmente, o TRPV1 pode ser sensibilizado pela ação de várias vias que culminam em sua fosforilação em resíduos de treonina e serina (JUNG et al., 2004). Particularmente, o resíduo de S502 é essencial para a ativação do TRPV1, pois, apesar de a sensibilização desse receptor poder ocorrer em diferentes graus na dependência do número de sítios fosforilados, não há sensibilização de TRPV1 sem a fosforilação de S502 (JUNG et al., 2004). Diversos estímulos podem levar à fosforilação de TRPV1, que incluem a ativação das vias da PKA, PKC (VARGA et al., 2006) e a ativação da quinase 2 dependente de calmodulina ligada ao cálcio (CamKII) (JUNG et al., 2004). Em contrapartida, o TRPV1 pode ser dessensibilizado pela sua ligação com a calmodulina (NUMAZAKI et al., 2003), bem como pela sua desfosforilação pela calcineurina (JUNG et al., 2004). Por exemplo, a ativação de receptores TrkA pelo NGF parece mediar a fosforilação de TRPV1 e assim sensibiliza esse receptor (VAN DEN WORM; NIJKAMP; ENGELS, 2004). Recentemente, foi demonstrado que a incubação de células ganglionares em câmaras hiperbáricas leva a alto influxo de cálcio e morte celular, que pode ser revertido pelo bloqueio de TRPV1 (SAPPINGTON et al., 2009). Embora a pressão intraocular seja apenas um fator predisponente para a lesão observada no glaucoma, a maior sensibilidade de TRPV1 ocasionada por uma lesão axonal pregressa poderia agravar o quadro lesivo ocasionado pelo aumento da pressão intraocular, o que poderia explicar o avanço paulatino do glaucoma. Ainda, vale lembrar que os receptores TRPV1 são também sensíveis a estresse mecânico da membrana celular (LIEDTKE, 2007). Outro mecanismo que pode estar envolvido é a ativação direta pode levar a liberação de glutamato (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008;

SIKAND e PREMKUMAR, 2007; XING e LI, 2007), o que poderia, por sua vez, levar à excitotoxicidade. Ainda, o NO, um modulador que pode ser encontrado em grandes concentrações após a lesão do nervo óptico (GROPPE et al., 2003; LEE et al., 2003; VIDAL et al., 2006), pode aumentar o transporte pela membrana do ligante endógeno de TRPV1, a anandamida, tornando a disponibilidade desse composto no meio intracelular mais elevada. Assim, a concentração de anandamida poderia ser maior exatamente onde reside o sítio de ligação desse composto nos receptores TRPV1 (DE PETROCELLIS et al., 2001; GLASER; KACZOCHA; DEUTSCH, 2005). Essas hipóteses serão discutidas mais profundamente adiante, após a apresentação de alguns dados que concernem a esse tópico.

Já foi demonstrado que a ativação de TRPV1 leva à morte de neurônios (CHARD et al., 1995; HIURA, 2000; HIURA e ISHIZUKA, 1989; JANCOS et al., 1984; LAM et al., 2007; SUGIMOTO; XIAO; ICHIKAWA, 1998), astrócitos (AMANTINI et al., 2007; QIAO et al., 2005), e de células da micróglia (KIM et al., 2006) o que pode ser ocasionado por apoptose ou necrose (HAIL JR, 2003; HIURA; NAKAE; NAKAGAWA, 2002). Os mecanismos que parecem estar envolvidos na morte celular mediada por TRPV1 são a ativação de p38 (AMANTINI et al., 2007) e o estresse oxidativo mediado por peróxido de nitrito (MACHO et al., 1999; QIAO et al., 2005). Entretanto, não pode ser descartado o fato de que já foi descrito que a capsaicina e outros vanilóides podem causar morte celular independentemente da ação em TRPV1, por meio de bloqueio da função mitocondrial (ATHANASIOU et al., 2007). Porém, nossos resultados indicam que a capsazepina reverte significativamente os efeitos deletérios da capsaicina, invalidando essa última hipótese. Ainda, o fato de que houve marcação para Fluoro-Jade B em retinas expostas à capsaicina e à capsazepina simultaneamente pode ser resultado do metabolismo da capsazepina, que é considerado rápido em comparação com o da capsaicina, o que poderia permitir maior tempo de contato do agonista com o tecido (GAO et al., 2000).

Em células ganglionares axotomizadas, a morte celular é precedida por alto influxo de cálcio, enquanto que as células que sobrevivem à fase aguda de morte celular apresentam apenas um aumento moderado da concentração intracelular desse cátion (PRILLOFF et al., 2007). Esse fato tem sido amplamente associado com a ativação de receptores NMDA de glutamato (HARTWICK; HAMILTON; BALDRIDGE, 2008; SUCHER; LEI; LIPTON, 1991). Entretanto, apenas o bloqueio de receptores de NMDA

não é capaz de inibir totalmente a perda de células ganglionares que ocorre após a lesão axonal das células ganglionares (OSBORNE et al., 2004). Assim, o desbalanço da sinalização glutamatérgica na retina pode não ser o único mecanismo envolvido na excitotoxicidade que ocorre após a axotomia. Como citado anteriormente, a injeção intraperitoneal de capsaicina induziu a morte celular na retina de ratos jovens, principalmente na GCL e na INL (RITTER e DINH, 1990). Em culturas primárias, a capsaicina levou a morte de células ganglionares da retina (SAPPINGTON et al., 2009). Ainda, visto que os receptores TRPV1 podem ser sensibilizados por vias ativadas pelo NGF (VAN DEN WORM; NIJKAMP; ENGELS, 2004), e que o NGF está aumentado na retina após a lesão do nervo óptico (CHIDLOW et al., 2005), decidimos testar se o bloqueio da atividade de TRPV1 em retinas axotomizadas é capaz de proteger as células ganglionares.

Com a intenção de avaliar se o bloqueio de TRPV1 de alguma forma protegia as células ganglionares da morte causada pela axotomia, procedemos a marcação retrógrada das células ganglionares com *fluorogold*. Cinco dias após a lesão do nervo óptico, as retinas foram removidas e o explante foi mantido em cultura. Após 48 horas na cultura, não foi observada alteração no número de células ganglionares quando comparamos as retinas tratadas com solução salina e as retinas tratadas com capsazepina (1 μ M), tanto na retina central quanto na retina periférica (Figura 12A).

Também avaliamos a morte celular por apoptose com a utilização da técnica de TUNEL. As retinas foram removidas 6 dias após a lesão do nervo óptico e foram mantidas em cultura por mais 24 horas na presença ou ausência de capsazepina (1 μ M). Novamente, não foi encontrada diferença entre o número de células marcadas para TUNEL nas retinas controle e nas retinas tratadas com capsazepina (Figura 12B).

Figura 12 - **A** Ratos adultos foram submetidos à marcação de células ganglionares com o traçador retrógrado *fluorogold* (2%). A lesão unilateral do nervo óptico foi realizada 7 dias após o procedimento. Os animais foram decapitados 5 dias após a lesão do nervo óptico e suas retinas mantidas em cultura por 48 horas, na presença de capsazepina (CPZ, 1 μ M; n=5). As retinas foram então montadas horizontalmente e observadas no microscópio. O meio de cultura foi substituído a cada 8 horas. As retinas foram montadas horizontalmente em lâminas. Barras representam média $\pm$ erro padrão. **B** Ratos adultos foram submetidos à lesão do nervo óptico e foram decapitados 6 após o procedimento. As retinas foram extraídas e mantidas em cultura por 24 horas na presença de solução controle ou de capsazepina (CPZ, 1 μ M). As retinas foram então preparadas para TUNEL (azul) e contraincoradas com iodeto de propídeo (vermelho). Os núcleos apoptóticos foram contados manualmente na camada das células ganglionares (GCL), em regiões centrais da retina, em abrangendo 430 μ m de retina linear (n=6 por retina, 5 retinas). Barras representam média $\pm$ erro padrão.

Nossos experimentos de *fluorogold*, TUNEL e Fluoro-Jade B indicaram que a atividade de TRPV1 pode não ser relevante na morte neuronal observada na fase aguda após a lesão do nervo óptico. Colaboram com isso as observações feitas em outro modelo de lesão retiniana, causado por isquemia e reperfusão, onde as concentrações de anandamida, o ligante endógeno de TRPV1, encontravam-se diminuídas (NUCCI et al., 2007). Ainda, em pacientes com glaucoma em estágio avançado, a anandamida foi encontrado nas mesmas concentrações que em pacientes sem glaucoma (CHEN et al., 2005).

Visto que o tratamento de células com antagonistas de TRPV1 não protegeu as células ganglionares da morte induzida pela axotomia, verificamos em seguida se a modulação de TRPV1 causou alguma alteração da resposta de células de Müller. Os astrócitos da retina expressam grandes quantidades de GFAP normalmente, enquanto que as células de Müller apresentam baixas concentrações dessa proteína, havendo, porém, maior concentração dela nas regiões onde as células de Müller fazem contato com a GCL (BRINGMANN et al., 2006). No sistema nervoso central, a reação astrocitária leva à hiperplasia dessas células e induz a expressão de GFAP (KENNEDY, 1982), o que também pode ser observado em astrócitos e células de Müller da retina (BRINGMANN et al., 2006; LEWIS e FISHER, 2003; SCHMIDT-KASTNER et al., 1993). Nos primeiros momentos após uma lesão, a reação iniciada pelos astrócitos e pelas células de Müller protegem os neurônios pela produção de citocinas, fatores neurotróficos e antioxidantes (OKU et al., 2002; RIDET et al., 1997; SCHUTTE e WERNER, 1998). Ainda, as células de Müller podem proteger as células ganglionares por depurar glutamato do meio extracelular e também por metabolizar NO liberado pelas células ganglionares (KAWASAKI; OTORI; BARNSTABLE, 2000). Assim, durante as neuropatias que acometem a retina, a disfunção das células de Müller e dos astrócitos pode levar a dano neuronal (NEUFELD e LIU, 2003), o que justifica seu estudo.

Realizamos experimentos de imunoperoxidase para detectar o GFAP em retinas lesionadas (Figura 13A). Retinas de ratos *naïve* (dados não mostrados) e falso-operados apresentaram astrócitos positivos para GFAP localizados na margem vitreal da retina e também alguns raros processos muito finos de células de Müller, que atingiam até a OPL, também foram marcados. O veículo ou a capsazepina não alterou o padrão de marcação para GFAP em comparação com os controles. A capsaicina (100µM) induziu

um aumento significativo no número de células de Müller GFAP-positivas (388,2%; $p<0,001$). Em seguida, analisamos por *immunoblotting* o conteúdo proteico de GFAP em extratos de retinas, com a intenção de avaliar a menor quantidade de capsaicina necessária para induzir a expressão de GFAP (Figura 13B). Observamos que concentrações de capsaicina de 1 μ M e 10 μ M não alteraram o conteúdo de GFAP, enquanto que 100 μ M e 1mM aumentou a expressão de GFAP (156,4%, $p<0,05$; e 197,1%, $p<0,001$, respectivamente, comparados com o valor dos animais falso-operados). O tratamento de capsaicina com capsazepina bloqueou o aumento de GFAP (100 μ M) induzido pela ativação de TRPV1 com capsaicina tanto nos experimentos de imunoperoxidase (Figura 13A) quanto nos experimentos de *immunoblotting* (Figura 13B).

Em todas as retinas de olhos com lesão do nervo óptico, foi observado grande aumento na marcação de células de Müller com GFAP (Figura 13). Interessantemente, o tratamento com capsazepina em retinas com lesão prévia do nervo óptico reduziu o número de processos de células de Müller marcados para GFAP (72,5%; $p<0,05$).

Figura 13 - A Imunorreatividade para GFAP em células de Müller na retina de ratos. Olhos de animais falso-operados e de animais com lesão do nervo óptico foram tratados 5 dias após do procedimento cirúrgico com injeções intravitreais de veículo (salina 0,9%; 3μL), capsaicina (100μM; 3μL), capsazepina (100μM; 3μL), ou uma mistura de capsaicina e capsazepina. Os animais foram perfundidos 2 dias após a injeção intraocular e as retina foram preparadas para imunohistoquímica. Os processos de células de Müller que atingiam a OPL foram contados manualmente em regiões centrais da retina, em campos de 160μm lineares (n=6 por retina, 5 retinas). **B** Efeito da ativação de TRPV1 na expressão de proteína de GFAP. Os animais receberam uma única injeção intravitreal (3μL) de veículo, diferentes concentrações de capsaicina entre 1μM a 1mM, ou a combinação de capsazepina e capsaicina (100 μM; 3μL). Os animais foram sacrificados por decapitação e as retina foram preparadas para *immunoblotting* (n=5). Barras representam média ± erro padrão. * $p < 0,05$, e *** $p < 0,001$ em análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey.

Já foi reportado que a ativação de TRPV1 é capaz de induzir gliose em outras áreas do encéfalo, como o núcleo arqueado e a eminência mediana (OKERE e WATERHOUSE, 2004). Ainda, não podemos descartar a hipótese de que as células marcadas por Fluoro-Jade B eram células gliais da retina, visto que a capsaicina já provou ser danosa a células da glia (AMANTINI et al., 2007; KIM et al., 2006). Observamos que o bloqueio de TRPV1 em retinas com lesão do nervo óptico diminuiu a expressão de GFAP tanto *in vivo* como *in vitro*. Esse fato reforça nossas suspeitas de que a sinalização vanilóide está aumentada ou sensibilizada após a lesão do nervo óptico. Adicionalmente, astrócitos retinianos e células de Müller são sensíveis a aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HU e VAN ELDIK, 1996). Por exemplo, a indução da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células de Müller, pelo seu cultivo em meio em glicose, induziu a nitratação de diversas proteínas, incluindo canais de potássio voltagem dependentes (ZHAN et al., 2008). Os astrócitos da retina podem ainda produzir NO pela iNOS, que é expressa nessas células mediante lesões, como foi observado em retinas de humanos com glaucoma (LIU e NEUFELD, 2000).

Visto que já foi relatado que a lesão experimental do nervo óptico pode levar a aumento da formação de NO e consequente nitratação de proteínas (KOEBERLE; GAULDIE; BALL, 2004), e que nossos dados são sugestivos de que há maior atividade de TRPV1 nas retinas axotomizadas, suspeitamos que a função de TRPV1 poderia levar à maior produção de NO e nitratação proteica. Ainda, na retina, a expressão da isoforma nNOS e iNOS aumenta após a lesão do nervo óptico, porém apenas a atividade de nNOS parece ser danosa para o tecido retiniano após a lesão axonal (KOEBERLE e BALL, 1999; PANG et al., 2005). Apesar de termos observado pouca colocalização entre TRPV1 e nNOS (dados discutidos adiante), suspeitamos que a produção de NO pela nNOS pode ser mediada por glutamato, uma vez que nossos dados funcionais sugerem íntima relação entre o sistema glutamatérgico e os receptores TRPV1 (dados discutidos adiante).

Nossos dados de *immunoblotting* (n=4) indicam houve aumento da expressão de nNOS nas retinas com lesão do nervo óptico (Figura 14A; ~72% maior que o valor controle; $p < 0,05$), o que não foi bloqueado pela injeção conjunta com capsazepina. A expressão de eNOS na retina de ratos não é alterada 7 dias após a lesão do nervo óptico.

Tampouco a injeção intravítrea da capsazepina alterou a expressão de eNOS nas retinas previamente lesionadas.

Nas retinas com lesão do nervo óptico pode ser observado grande aumento da expressão de nNOS na margem vítrea da retina, correspondente a fibras na NFL, bem como grande aumento de número de corpos celulares na GCL (Figura 14B). Há aumento da intensidade da neuropila marcada na IPL, mas não é evidente diferença de intensidade ou número de células marcadas na INL. O bloqueio de TRPV1 com capsazepina não alterou o sinal observado na marcação de células da GCL nos casos de lesão do nervo óptico e de filamentos da NFL e da IPL.

Este aumento da expressão de nNOS após lesão axonal das células ganglionares já foi observado em modelo de lesão total do nervo óptico (LEE et al., 2003), ocorrendo inicialmente após 3 dias da lesão e com pico de expressão da nNOS após 5 dias de lesão, momento em que optamos pela injeção intraocular dos vanilóides. Nesse estudo, houve decaimento gradual da expressão de nNOS, que retornou ao nível basal de expressão após 28 dias da lesão. Em outro modelo de lesão de células ganglionares da retina, onde foi induzido o aumento da pressão intraocular pela cauterização de vasos episclerais de ratos, também foi observado grande aumento da expressão de nNOS nas camadas mais internas da retina (VIDAL et al., 2006). Também pudemos observar tal diminuição da marcação de nNOS na GCL e NFL em retinas de animais com 21 dias de lesão do nervo óptico. Estes dados estão de acordo com dados recolhidos em outros estudos em que também foi demonstrado aumento da expressão da enzima nNOS como resposta a lesões axonais, como, por exemplo, em modelos de lesão neuropática que inclui a ligadura do nervo ciático (CIZKOVA et al., 2002; LEVY e ZOCHODNE, 1998).

Não foi encontrada marcação para iNOS nas retinas de animais sem lesão do nervo óptico que receberam injeções intraoculares de solução salina (Figura 14C). A marcação para iNOS está presente nas retinas com lesão de nervo óptico que receberam solução salina, principalmente nas camadas mais internas da retina. O tratamento com capsazepina dos olhos previamente lesionados não alterou a intensidade da imunomarcação de iNOS presente nas retinas lesionadas que receberam solução salina.

Não observamos expressão de iNOS em condições basais, assim como já foi relatado previamente (PANG et al., 2005; VIDAL et al., 2006). Devido a isso, escolhemos a imunoistoquímica para avaliar a expressão de iNOS nas retinas. Essa

técnica possui maior resolução do que o *immunoblotting* em detectar baixas concentrações de proteínas (PANG et al., 2005). Nos quadros com lesão do nervo óptico por 7 e por 21 dias, porém, é evidente o aparecimento de fibras positivas para a iNOS na retina interna. Em outro modelo, onde foi induzido o aumento da pressão intraocular, também foi observado grande aumento da expressão de iNOS nas camadas mais internas da retina (VIDAL et al., 2006). Porém, em um segundo trabalho utilizando modelo semelhante de aumento da pressão intraocular, não foi observada indução da expressão de iNOS na retinas e no nervo óptico (PANG et al., 2005) .

A - immunoblotting

B - nNOS

C - iNOS

Figura 14 - O efeito da ativação e do bloqueio de TRPV1 na nitração de proteínas na retina. Retinas de animais falso-operados e de animais com lesão do nervo óptico foram tratadas 5 dias após o procedimento cirúrgico com injeções intraoculares do agonista de TRPV1 capsaicina (CAP, 100 μ M; 3 μ L), do antagonista capsazepina (CPZ, 100 μ M; 3 μ L) ou a combinação de ambos. Os animais foram sacrificados 48 horas após as injeções e as retinas foram preparadas para imunistoquímica (n=6 por retina, 5 retinas). O sinal em tonalidades de cinza obtido pela imunomarcacão foi convertido para uma escala de cores. As barras representam media $\pm$ erro padrão. Foi utilizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey. As legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL), e da camada das células ganglionares (GCL).

O aumento da atividade das diversas isoformas da NOS já foi avaliada pela utilização de eletrodos sensíveis ao NO (GROPPE et al., 2003). Nestes experimentos, as retinas de ratos submetidos à axotomia foram avaliadas, e os resultados são semelhantes aos observados pelos métodos que quantificaram a proteína nNOS, ou seja, há aumento da produção de NO após 3 dias da lesão, com pico de produção por volta do dia 5, com retorno dos níveis basais de NO por volta do 13º dia após a lesão.

Foi demonstrado que o aumento da produção de NO é particularmente prejudicial para a recuperação do tecido retiniano após a lesão do nervo óptico. O bloqueio das enzimas iNOS e nNOS pelos antagonistas inespecíficos de NOS, o L-NAME e o NOLA, resultou em aumento da sobrevivência de células ganglionares retinianas e diminuição da degeneração de fibras do nervo óptico. Ainda, o uso de antagonistas seletivos para iNOS, o L-N6-(I-iminoetil) hidrocloreto de lisina, ou o antagonista de nNOS, a L-tiocitrulina, demonstrou que o maior dano axonal é causado pela isoforma nNOS (KOEBERLE e BALL, 1999; PANG et al., 2005). Colabora ainda com estes dados a observação de que o NO inibiu a formação de novos brotamentos sinápticos em motoneurônios após lesão no nervo hipoglosso, o que foi revertido pela ação do inibidor de nNOS, o L-NAME (SUNICO et al., 2005). Suspeita-se que essas ações induzidas pelo NO são executadas pelo GMPc e pela alta nitração de proteínas intracelulares observadas neste caso de lesão.

Em seguida, avaliamos a nitração de proteínas pela detecção de resíduos de nitrotirosina (NT) por imunofluorescência. A nitração de proteínas é utilizada amplamente para detectar a presença de peroxinitrito (ASLAN; CORT; YUCEL, 2008), um composto derivado das espécies reativas de oxigênio NO e superóxido (BECKMAN et al., 1990). O peroxinitrito pode reagir, formando radicais hidroxila e nitrato, e este último pode oxidar ou nitrar diversas moléculas (adicionar NO₂[·]). Como exemplo temos a tirosina e resíduos de tirosina que estão presentes em moléculas, que podem formar NT (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007) que, por sua vez, podem ser detectados por anticorpos (ASLAN; CORT; YUCEL, 2008).

A marcação que encontramos para NT nas retinas de animais *naïve* ou falso-operados foi um padrão difuso, mais intenso na região dos processos externos dos fotorreceptores e nas camadas plexiformes da retina, assim como em diversas células brilhantes na margem interna da INL e nas células da GCL (Figura 15). Os olhos de animais sem lesão de nervo óptico tratados com veículo ou com capsazepina

apresentaram o mesmo padrão de marcação. Entretanto, o tratamento com capsaicina em retinas de animais falso-operados gerou aumento do sinal para NT, principalmente nas camadas mais internas da retina. Nesses casos, diversas células arredondadas puderam ser observadas na GCL, assim como na INL. Semelhante padrão de marcação também foi encontrado nas retinas de animais com lesão prévia do nervo óptico, tratadas ou não com solução salina. Nessas retinas, houve ainda aumento de marcação da NFL, na GCL e na IPL, assim como já foi descrito anteriormente em modelo semelhante de lesão do nervo óptico (KOEBERLE; GAULDIE; BALL, 2004) e em um modelo de pressão intraocular elevada (ASLAN et al., 2006). Ainda, o tratamento com capsazepina bloqueou parcialmente a formação de NT nessas camadas da retina, correspondendo a 75,7% ($p<0,001$) quando comparadas a retinas lesionadas tratadas com veículo. O tratamento com capsaicina não alterou o padrão de marcação para NT nas retinas com lesão prévia do nervo óptico.

A ideia de que há relação entre o sistema vanilóide e o sistema nitrérgico da retina foi enfatizada por nossos experimentos *in vitro*. Avaliamos os efeitos da ativação de TRPV1 sobre a formação de NT, por meio de *immunoblotting* (Figura 16A). Em explantes retinianos tratados com capsaicina (100 μ M), a formação de NT foi muito maior em comparação com as retinas controle (326,1%; $p<0,001$). A capsazepina (1 μ M) bloqueou completamente o efeitos da capsaicina. Ainda, o 7-NI (1mM), um bloqueador específico de nNOS e eNOS reduziu em 33,6% a nitratação de proteínas causada pela capsaicina ($p<0,01$). A aminoguanidina (1 mM), um inibidor específico da iNOS, também reduziu os efeitos da capsaicina sobre a formação de NT (58,5%; $p<0,01$). Como controle positivo, utilizamos o SNAP (1mM), um doador de NO, que, mesmo na presença de 7-NI causou grande aumento na formação de NT (463,6%; $p<0,001$). Também avaliamos o conteúdo de GFAP nos explantes retinianos (Figura 16B). Observamos que a capsaicina (100 μ M) aumentou o conteúdo de GFAP na retina (651%; $p<0,01$), o que foi bloqueado pela capsazepina (1 μ M). Entretanto, o 7-NI apenas bloqueou em parte a indução da expressão de GFAP, que ainda foi maior que nas retinas controle (424,1%; $p<0,05$). Por outro lado, a aminoguanidina reduziu o conteúdo de NT aos valores do controle. Novamente utilizamos SNAP como controle positivo, em combinação com 7-NI. Nesse caso, também houve grande aumento na expressão de GFAP (1.191,4%; $p<0,001$).

Figura 15 - Olhos com e sem lesão do nervo óptico receberam injeção intravitreal com salina 0,9% (3μL), ou capsazepina (100 μM; 3μL) 5 dias após a lesão do nervo óptico. Os animais foram perfundidos ou decapitados 2 dias após as injeções intraoculares e suas retinas foram preparadas para imunistoquímica ou *immunoblotting*, respectivamente. **A** Análise do conteúdo protéico de nNOS e eNOS na retina. Foi utilizado o valor basal da retina contralateral em todos os casos para comparação com os valores obtidos dos olhos tratados. * indica $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey. Os valores do gráfico representam densidade óptica normalizada pelo conteúdo de β-actina e representam média ± erro padrão. **B** Imagens digitais de cortes histológicos transversais de retinas processados para visualizar nNOS. **C** Imagens digitais de cortes histológicos transversais de retinas processados para visualizar iNOS. As intensidades de luminosidade cada imagem de imunoperoxidase foram transformadas segundo escala de cores.

Figura 16 - Efeitos da ativação de TRPV1 concomitantemente com a inibição específica das sintases de NO sobre a nitração protéica e a expressão de GFAP em extratos protéicos retinianos (n=5) Os animais foram sacrificados por decapitação e as retinas foram rapidamente dissecadas e mantidas em cultura por 24 horas com veículo (salina 0.9%, DMSO 0,2 % and etanol 0,2%) ou as seguintes drogas: capsaicina (CAP, 100μM); capsaicina (100μM) e capsazepina (CPZ, 1μM), capsaicina (100μM) e 7-nitroindazol (7-NI, 1mM); capsaicina e aminoguanidina (AMG, 1μM); SNAP (1mM) e 7-NI (1mM). **A** Nitração protéica avaliada por *immunoblotting*. A densidade óptica total de cada arraste foi considerada. **B** Expressão de GFAP em explantes de retina. Barras representam média ± erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$ em análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de comparações pareadas com teste de Tukey.

A nitração de proteínas causada pela capsaicina foi reduzida pela inativação das três isoformas de NOS; contudo, aparentemente há maior impacto da isoforma iNOS sobre a nitração de proteínas nas retinas tratadas com capsaicina. Colabora com isso o fato de que a reação de células de Müller também foi diminuída grandemente apenas mediante a inibição dessa isoforma. A iNOS é conhecida por produzir quantidades de NO muito superiores à nNOS e eNOS e, a partir da sua expressão proteica, ela não necessita de estímulos para induzir a sua atividade (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). A expressão da iNOS em microgliócitos e em astrócitos leva a produção de NO em concentrações que chegam a 1 μ M (BROWN e NEHER, 2010), que é aproximadamente mil vezes superior à produção máxima de um terminal neuronal (GARTHWAITE, 2008). Funcionalmente, esses dados podem ser indicativos de que a ativação local de TRPV1, modulando a atividade de eNOS e nNOS, é potencialmente menos danoso para o tecido retiniano do que a ativação desse receptor em células da microglia, o que pode levar a ativação dessas células (SAPPINGTON e CALKINS, 2008) e a danos mais abrangentes. A capsaicina aumentou a nitração de proteínas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No último caso, o aumento da nitração de proteínas causado pela capsaicina foi parcialmente revertido pelo bloqueio das NOS constitutivas e totalmente pelo bloqueio da iNOS. Essa observação pode estar relacionada com o fato de que o TRPV1 é expresso em astrócitos e em células da microglia da retina (LEONELLI et al., 2009; SAPPINGTON e CALKINS, 2008), onde a expressão da iNOS pode ser encontrada após a axotomia do nervo óptico (KOEBERLE e BALL, 1999) e em retinas glaucomatosas (LIU e NEUFELD, 2000; NEUFELD; SAWADA; BECKER, 1999). Em células da microglia isoladas da retina, a atividade de TRPV1 foi relacionada também com a translocação de NF-kappaB ao núcleo celular (SAPPINGTON e CALKINS, 2008), onde ele poderia ativar a transcrição da iNOS (GELLER e BILLIAR, 1998). Nossas observações (dados discutidos adiante) também mostram que a ativação de TRPV1 retiniano pela capsaicina induz a expressão de iNOS, o que poderia contribuir com o aumento do sinal para NT observado nas retinas tratadas com capsaicina. Também foi demonstrado na linhagem C6 de glioma que a capsaicina induz a expressão de iNOS, havendo consequente produção de NO e diminuição da expressão da enzima depuradora de superóxido, a superóxido dismutase. Ambos os efeitos são responsáveis por causar morte celular, que parece ser parcialmente dependente de toxicidade mediada por peroxinitrito (QIAO et al., 2005).

A nitração de proteínas foi parcialmente reduzida pelo bloqueio de TRPV1 com capsazepina nas camadas internas da retina, o que pode ser devido à diminuição da atividade de TRPV1 em células que expressam a eNOS ou a nNOS, ou ainda pode ser devido à supressão da expressão de iNOS desencadeada pela ativação de TRPV1. Visto que nossos dados indicam que a colocalização entre nNOS e TRPV1 é baixa (dados discutidos adiante), e que o bloqueio de TRPV1 não preveniu a morte de células ganglionares na fase aguda após a axotomia do nervo óptico, é possível que os receptores TRPV1 possam estar envolvidos na fase crônica de perda lenta de células ganglionares após a axotomia, ou que ainda a função desse receptor possa sensibilizar as células ganglionares à morte conduzida pela excitotoxicidade ou pelo estresse oxidativo.

A interação entre a ativação de TRPV1 poderia ser mediada pela liberação de algum neuromediador, e este poderia ser o responsável tanto pela morte neuronal causada pela capsaicina, quanto pelo aumento da nitração de proteínas. De fato, diversos estudos indicam que a ativação do receptor TRPV1 pode modular a liberação de neurotransmissores, dentre eles o glutamato (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008; SIKAND e PREMKUMAR, 2007; XING e LI, 2007) que por sua vez pode levar a excitotoxicidade ou à liberação de NO.

Para testar essa hipótese, mantivemos explantes retinianos de ratos adultos em cultura por 24 horas, onde foram cultivados na presença do agonista de TRPV1, a capsaicina, ou na presença do bloqueador de receptores NMDA de glutamato, o AP-5. Em sequência, as retinas foram processadas para TUNEL para a visualização de núcleos de células apoptóticas (Figura 17). Nos explantes tratados com capsaicina (100 μ M) observamos morte celular na INL e na ONL, bem como na camada das células ganglionares. O bloqueio seletivo de receptores NMDA com AP-5 (1mM) reduziu totalmente a apoptose observada nas camadas nucleares interna e externa, porém reduziu apenas parcialmente na GCL (16,5% do valor das retinas tratadas apenas com capsaicina; $p < 0,05$). O antagonista de TRPV1, a capsazepina, bloqueou completamente a morte neuronal induzida por capsaicina.

Com esse mesmo delineamento experimental, avaliamos ainda a nitração de proteínas e a peroxidação lipídica. Para avaliar a peroxidação de lipídeos, optamos pela detecção de 4-hidroxinonenal (4-HNE), que é um composto formado em situações em que há estresse oxidativo e que pode ser detectado por imunomarcção (ASLAN; CORT; YUCEL, 2008). A ativação de TRPV1 em retinas mantidas em cultura levou a

aumento no sinal para 4-HNE (Figura 18), diferentemente do que foi observado no tecido *in vivo* (dados não mostrados). O bloqueio de receptores NMDA preveniu parcialmente a peroxidação lipídica causada pela ativação de TRPV1. O bloqueio seletivo de receptores NMDA com AP-5 reduziu totalmente a formação de 4-HNE nas camadas INL e ONL, mas reduziu parcialmente na GCL (88,8% do valor das retinas tratadas apenas com capsaicina; $p<0,01$). O antagonista de TRPV1 capsazepina bloqueou completamente a formação de 4-HNE causada pela capsaicina.

O 4-HNE participa de diversas vias de sinalização intracelular (FORMAN e DICKINSON, 2004) e é esperado que sua depuração em outros compostos seja de apenas alguns segundos, o que inviabilizaria a detecção desse composto após 48 horas de um estímulo potencialmente gerador de estresse oxidativo (AWASTHI et al., 2004). Esse aumento transitório de espécies reativas de oxigênio poderia ser explicado pela própria ativação do receptor TRPV1. Recentemente, foi demonstrado que o influxo celular de cálcio mediado por TRPV1 leva a sequestro de cálcio intramitocondrial (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008), o que pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio nessa organela (STARKOV; CHINOPOULOS; FISKUM, 2004). Ainda, a ativação de TRPV1 com consequente liberação glutamato e ativação de receptores NMDA também poderia levar a grande influxo de cálcio para as mitocôndrias, fato que explicaria parcialmente o aumento de espécies reativas de oxigênio observado durante a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (STARKOV; CHINOPOULOS; FISKUM, 2004). Por outro lado, é possível que alguns mecanismos depuradores de espécies reativas de oxigênio podem ter sua atividade diminuída nesse caso. Foi demonstrado recentemente que a ativação de TRPV1 reduz, por um mecanismo ainda desconhecido, a concentração de glutatona em neurônios (MACCARRONE et al., 2008), o que pode também explicar em parte o aumento observado de peroxidação lipídica desencadeado pela capsaicina.

A ativação de TRPV1 por capsaicina (100 μ M) levou também a grande aumento na nitração de proteínas nas camadas nuclear e plexiforme internas da retina, bem como na GCL (Figura 19). O bloqueio seletivo de receptores NMDA com AP-5 (1mM) reduziu parcialmente a nitração proteica nas camadas nuclear e plexiforme interna (75% do valor das retinas tratadas apenas com capsaicina; $p<0,01$), porém reduziu completamente a nitração de proteínas na camada das células ganglionares. O

antagonista de TRPV1 capsazepina bloqueou completamente a nitratação de proteínas causada pela capsaicina.

Resumidamente, nossos dados indicaram que a expressão de TRPV1 cai após a axotomia de células ganglionares. Entretanto, a ativação desse receptor em retinas axotomizadas mostrou ser mais deletéria em comparação com a mesma ativação na retina de ratos saudáveis. O bloqueio desse receptor não protege as células ganglionares da morte observada agudamente após a axotomia, mas reduz significativamente a resposta de células de Müller e a formação de nitrotirosina nas camadas mais internas da retina. Ainda, nossos dados mostram que a excitotoxicidade mediada por TRPV1 inclui a ativação de receptores NMDA de glutamato, o que deve ocorrer possivelmente pela ativação de receptores TRPV1 pré-sinápticos levando à liberação de glutamato. Assim, fica claro que novos estudos são necessários para avaliar qual o impacto da atividade de TRPV1 em neurônios da retina, bem como a interação desse receptor com outros sistemas de mediação da comunicação celular.

Figura 17 - Bloqueio de receptores NMDA inibe parcialmente a morte neuronal causada pela ativação de TRPV1. Explantes retinianos foram mantidos em cultura por 24 horas e tratados com capsaicina (100 μ M), capsazepina (1 μ M), AP-5 (1mM) ou a combinação entre os fármacos. As retinas foram posteriormente processadas para TUNEL para a visualização de núcleos de células apoptóticas (**A**, em verde). Os cortes foram corados com iodeto de propídeo para a visualização das camadas retinianas (em vermelho). **B** A contagem celular foi realizada manualmente por campo de 40x (n=4; 4 campos por retina). Os valores do gráfico representam o número de células contadas e representam média $\pm$ erro padrão. Comparações de médias com $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey foram consideradas significativamente diferentes. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), e da camada das células ganglionares (GCL).

Figura 18 - Bloqueio de receptores NMDA previne parcialmente a peroxidação lipídica causada pela ativação de TRPV1. Explantes retinianos foram mantidos em cultura por 24 horas e tratados com capsaicina (100 μ M), capsazepina (1 μ M), AP-5 (1mM) ou a combinação entre as drogas. As retinas foram posteriormente processadas para imunofluorescência para a visualização de 4-HNE (**A**, em verde). Os cortes foram corados com iodeto de propídeo para a visualização das camadas retinianas (em vermelho). **B** A contagem celular foi realizada manualmente por campo de 40x (n=4; 4 campos por retina). Os valores do gráfico representam o número de células contadas e representam média $\pm$ erro padrão. Comparações de médias com $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey foram consideradas significativamente diferentes. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), e da camada das células ganglionares (GCL).

Figura 19 - Bloqueio de receptores NMDA previne parcialmente a nitração protéica causada pela ativação de TRPV1. Explantes retinianos foram mantidos em cultura por 24 horas e tratados com capsaicina (100 μ M), capsazepina (1 μ M), AP-5 (1mM) ou a combinação entre as drogas. As retinas foram posteriormente processadas para imunofluorescência para a visualização de resíduos de nitrotirosina (**A**, em verde). Os cortes foram corados com iodeto de propídeo para a visualização das camadas retinianas (em vermelho). **B** A contagem celular foi realizada manualmente por campo de 40x (n=4; 4 campos por retina). Os valores do gráfico representam o número de células contadas e representam média $\pm$ erro padrão. Comparações de médias com $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey foram consideradas significativamente diferentes. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), e da camada das células ganglionares (GCL).

4.3 Ativação de receptores TRPV1 altera a atividade e expressão enzimas de síntese de óxido nítrico em retinas de ratos adultos

Conduzimos experimentos de imunofluorescência para avaliar o grau de colocalização entre o receptor TRPV₁ e as enzimas de síntese de NO nNOS, eNOS e iNOS na retina de ratos adultos. Os resultados encontram-se na Figura 20. Pode ser observada colocalização entre a marcação de TRPV1 e nNOS na retina de ratos saudáveis (Figura 20A). A população de células que expressa essas duas proteínas é restrita a poucas células amácrinas, e a região de expressão do TRPV1 nessas células é restrita à saída dos processos dessas células em direção à IPL (Figura 20A). Não foi observada colocalização de TRPV₁ e nNOS em células da GCL. A quantificação da colocalização entre TRPV1 e nNOS mostrou que essas duas proteínas não possuem grande percentual de colocalização, restringindo-se a uma pequena população de células amácrinas. Esse padrão de marcação observado para nNOS foi encontrado previamente em estudos anteriores em que se utilizaram a imunoistoquímica (KIM; OH; CHUN, 2000; KIM et al., 2000; NEUFELD; SHAREEF; PENA, 2000), a hibridação *in situ* (KIM; OH; CHUN, 2000), a NADPH-diaforase (RIOS et al., 2000; ROUFAIL; STRINGER; REES, 1995), ou DAF-2, um indicador da produção de NO (BLUTE; LEE; ELDRED, 2000).

A expressão protéica de eNOS mostrou-se restrita ao endotélio, e podemos observar que há também marcação para TRPV1 nessas estruturas (Figura 20B). A expressão de eNOS foi verificada previamente em retinas de diversos mamíferos, e ao contrário dos nossos resultados, parece estar localizada também em células de Müller e astrócitos radiais (HAVERKAMP; KOLB; CUENCA, 1999). Porém, esses dados ainda não foram reproduzidos e publicados por outros grupos.

As células que podem expressar a iNOS na retina são os microgliócitos (células OX-42 positivas) e astrócitos (JACQUEMIN et al., 1996). Como visto anteriormente, há expressão de TRPV1 nesses dois tipos celulares. Em retinas tratadas previamente com lipopolissacarídeo (LPS), observamos intensa expressão de iNOS. Essas células são microgliócitos ativados, que se caracterizam por serem rombóides e não apresentarem processos celulares. Nessas células, verificamos que também há expressão de TRPV1 (Figura 20C).

Figura 20 - Imagens digitais obtidas de cortes histológicos de retinas de ratos adultos. O tecido foi processado pelo método de imunoistoquímica. **A** Imagens de cortes transversais (a) e horizontais (b e c) indicam uma pequena população de células marcadas com TRPV1 na INL (a; setas em b. Em outro plano de corte, a marcação para TRPV1 pode ser encontrada em diminuto número de células que expressam a nNOS (cabeças de setas em c). A quantificação de células que coexpressam a nNOS e o TRPV1 foi realizada em cortes horizontais da retina central (n=5 por olho, 4 animais). Apenas 6,23% das células nNOS positivas da camada INL também expressam o receptor TRPV1. **B** Foi encontrada colocalização entre TRPV1 e eNOS, presente em células endoteliais da retina. **C** Também foi encontrada marcação para o receptor TRPV1 em células e processos celulares positivos para OX-42, característicos de células microgliais. A indução da expressão de iNOS foi alcançada pela ativação de células de microglia. Para isso, foi realizada com a aplicação de injeção intraocular de LPS (10 μ M; 3 μ L). O animal foi perfundido 6 horas após essa injeção e a retina foi preparada para imunoistoquímica. As células que expressam iNOS são em sua maioria rombóides, e também localizamos TRPV1 nessas células. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), da camada plexiforme interna (IPL), e da camada das células ganglionares (GCL).

Com o intuito de avaliar os efeitos da ativação do receptor TRPV1 sobre a expressão de NOS, tratamos ratos adultos com injeções intraoculares de capsaicina (100 μ M) ou capsaicina com capsazepina (100 μ M). Os animais foram sacrificados 7 e 21 dias após o tratamento e suas retinas foram preparadas para imunoistoquímica ou *immunoblotting*. O tratamento de retinas com capsaicina levou a diminuição sutil da imunomarcagem de nNOS na GCL, bem como na IPL (Figura 21A). O tratamento conjunto de capsaicina e capsazepina em retinas não alterou o padrão encontrado nas retinas controles. Para avaliar a densidade de células nNOS-positivas na camada INL, realizamos imunoistoquímica em cortes horizontais de retina de ratos tratados ou não com capsaicina, 2 e 21 dias antes de sacrificar os animais (Figura 21B). Em nenhum caso houve alteração do número de células que expressam a nNOS na camada INL da retina (n=4).

Visto que o tratamento de retinas de ratos adultos com ativadores de TRPV1 resulta em diminuição aparente da imunorreatividade de nNOS, realizamos experimentos de *immunoblotting* para avaliar se as alterações da expressão de nNOS observadas são permanentes ou não (Figura 22A). A análise temporal da expressão de nNOS nos mostra que injeções intravitreais de capsaicina (100 μ M) resultaram em queda na expressão de nNOS a partir do segundo dia pós-injeção (~ 27,7% do controle ao 2º dia; $p<0,01$ e ~ 57,9% do controle ao 7º dia; $p<0,05$), e que os níveis basais de nNOS retornam 21 dias após a injeção. Nesse mesmo material observamos que a expressão protéica de eNOS aumenta após o 7º dia pós-lesão (~ 129,3% do controle ao 7º dia; $p<0,05$ e ~ 155,3% do controle ao 14º dia; $p<0,01$), e que também retorna aos níveis basais após 21 dias da injeção (Figura 22B).

Figura 21 - Efeitos da ativação de TRPV1 sobre a expressão de nNOS. Ratos adultos receberam injeção ocular unilateral de solução salina (0,9%;3µL), capsaicina (CAP, 100µM; 3µL), ou a combinação de capsaicina e capsazepina (CPZ, 100µM; 3µL). Os animais foram perfundidos 2 e 21 dias após a injeção e as retinas foram preparadas para imunoistoquímica. **A** Imagens digitais de cortes histológicos transversais de retinas processados para visualizar nNOS. **B** Imagens digitais de cortes histológicos horizontais, evidenciando a camada nuclear interna das retinas de ratos adultos. A contagem celular foi realizada manualmente em cada retina (n=6) e as médias foram analisadas com teste t de student. Os valores do gráfico representam o número de células contadas por campo de 40x e representam média $\pm$ erro padrão. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), e da camada das células ganglionares (GCL).

Figura 22 - Análise do conteúdo proteico de nNOS **A** e eNOS **B** na retina de ratos tratados intraocularmente com capsaicina (100 μ M) após diversos dias de sobrevivência. Foi utilizado o valor basal da retina contralateral em todos os casos para comparação com os valores obtidos dos olhos tratados. * indica $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey. Os valores do gráfico representam densidade óptica normalizada pelo conteúdo de β -actina e representam média $\pm$ erro padrão.

Os dados apresentados na Figura 23 indicam a intensidade de fluorescência obtida pelo DAF-2 na retina de ratos. Nossos experimentos de DAF-2 mostram que a incubação de retinas com capsaicina (100 μ M) gerou aumento na produção de NO em vasos retinianos (pico com ~84,5% maior do que o valor controle; $p < 0,001$). O aumento na intensidade do sinal gerado pelo DAF-2 nas retinas tratadas com capsaicina iniciou-se logo após a incubação e teve grande aumento até o tempo de 4 minutos; em seguida, houve progressão comparável aos valores das retinas tratadas com solução salina. O tratamento concomitante das retinas com capsazepina a 100 μ M não foi capaz de gerar sinal diferente das retinas tratadas com solução salina. A utilização do bloqueador específico de eNOS, o L-NIO, a 100 nM, foi capaz de bloquear também a ação de capsaicina. Nos experimentos com DAF-2, houve pequeno incremento da fluorescência basal nas retinas tratadas com solução salina e nas retinas tratadas com a combinação com capsaicina e capsazepina. Isso se deve à oxidação da sonda, bem como isso pode ser decorrente da própria produção basal de NO pelo tecido (KIMURA et al., 2004). Ainda, o bloqueador específico de eNOS inibiu completamente a produção de NO induzida por capsaicina, o que indica a necessidade da ativação dessa isoforma para que haja a produção de NO induzida por capsaicina. Até o momento, apenas um trabalho evidenciou a presença de NO utilizando-se de DAF-2, na retina de tartarugas (BLUTE; LEE; ELDRED, 2000).

Na retina, sabe-se que a atividade da eNOS pode atuar na preservação do tecido neuronal quando do desafio contra lesões como as isquêmicas ou traumáticas ao provocar vasodilatação e aumento da perfusão tecidual (YU et al., 2005). Recentemente, demonstrou-se que a anandamida, via ativação de TRPV1, pode aumentar a produção de NO no mesentério de ratos (POBLETE et al., 2005). O bloqueio não seletivo de nNOS e eNOS provou ser deletério na recuperação do fluxo sanguíneo retiniano após a lesão por isquemia e reperfusão, bem como reduziu a sobrevivência de células na GCL e INL (HANGAI et al., 1999). Ainda, temos o fato de que a ativação prévia de TRPV1 diminuiu a perda neuronal observada no mesmo modelo de lesão retiniana (NUCCI et al., 2007). Aliados a isso, os nossos resultados, ao evidenciarem aumento na produção de NO em vasos retinianos após a incubação com capsaicina, podem ser indicativos de que esse sistema pode modular o fluxo sanguíneo e atuar, dessa forma, indiretamente na manutenção da homeostase retiniana.

Figura 23 - Imagens digitais da face vitreal de explantes de retinas de ratos adultos. O tecido foi pré-incubado por duas horas com tampão Krebs-Hanseleit contendo DAF-2 diluído a 1:250, em câmara úmida escura a 37 °C. Posteriormente, os tecidos foram lavados e transferidos para o microscópio, onde permaneceram sob placa aquecida a 37 °C. As imagens foram capturadas, com tempo de exposição de 1s, com intervalo de 1 minuto, iniciando-se 5 minutos antes e terminando 15 minutos após incubação com as soluções: controle (Krebs-Hanseleit); capsaicina a 100 µM em Krebs-Hanseleit; e a combinação de capsaicina e capsazepina (100 µM para ambas), ou de capsaicina com L-NIO (1 µM). As regiões de interesse foram delimitadas baseando-se na morfologia observada dos vasos. Os dados contidos no gráfico indicam o incremento da intensidade de fluorescência observado nos diferentes tempos, baseado na intensidade inicial de tempo de -5 min. * indica $p < 0,05$ em análise de variância de uma via com pós teste de Tukey. Valores representam média $\pm$ erro padrão.

Não foi encontrada marcação para iNOS nas retinas de animais que receberam injeções intraoculares de solução salina (Figura 24). Porém, pode ser visualizada marcação para iNOS nas camadas mais internas das retinas dos olhos tratados intraocularmente com capsaicina (100 μ M). Como demonstrado neste estudo e trabalho anterior (SAPPINGTON e CALKINS, 2008), o receptor TRPV1 é expresso em células da microglia da retina. Nessas células, ativação de TRPV1 pode levar à translocação de Nf- κ B ao núcleo (SAPPINGTON e CALKINS, 2008), o que poderia levar à transcrição da iNOS (GELLER e BILLIAR, 1998).

Observamos grande diminuição da expressão de nNOS e na retina interna de ratos tratados com capsaicina. Contrariamente, as retinas desses mesmos animais apresentaram maior quantidade de iNOS nessas regiões. Interessantemente, o LPS, que é conhecido como indutor da expressão de diversas proteínas inflamatórias, induziu a expressão de iNOS em cérebros de ratos, e levou a grande diminuição da expressão de nNOS (BANDYOPADHYAY; CHAKDER; RATTAN, 1997). Assim, não podemos descartar uma possível interregulação da expressão dessas duas isoformas de NOS, inclusive na retina, ou que as vias que controlam a expressão de ambas respondem de forma diferente a alguns estímulos. Diversos estudos em outros modelos experimentais apontam para o aumento da expressão das isoformas da NOS causado por capsaicina. A administração sistêmica de capsaicina resultou em aumento da expressão de nNOS em células no núcleo da raiz dorsal de ratos (VIZZARD; ERDMAN; DE GROAT, 1995) e de gatos (PILYAVSKII et al., 2005), além de aumentar a expressão de iNOS em células derivadas de feocromocitoma humano (PC12).

Nossos dados indicam, dessa forma, que a atividade dos receptores TRPV1 ou, de uma forma mais abrangente, a modulação do equilíbrio de cálcio pode regular a expressão das isoformas das enzimas de síntese de óxido nítrico. Assim, o sistema vanilóide parece modular não só a função dessas proteínas, como também sua expressão.

Figura 24 - Efeitos da ativação de TRPV1 sobre a expressão de iNOS. Ratos adultos receberam injeção ocular unilateral de solução salina (0,9%; 3 μ L), capsaicina (CAP, 100 μ M; 3 μ L), ou a combinação de capsaicina e capsazepina (CPZ, 100 μ M; 3 μ L). Os animais foram perfundidos 2 e 21 dias após a injeção e as retinas foram preparadas para imunohistoquímica para revelar iNOS. As intensidades de luminosidade de cada imagem de imunoperoxidase foram transformadas segundo escala de cores. Legendas indicam a localização aproximada da camada nuclear externa (ONL), da camada nuclear interna (INL), e da camada das células ganglionares (GCL).

5 CONCLUSÕES

Nossos resultados com imunoistoquímica, *immunoblotting*, DAF-2, TUNEL, *fluorogold* e Fluoro-Jade B geraram diversos dados a respeito do sistema endovanilóide na retina de ratos. Foi demonstrada a presença dos receptores TRPV1 durante o desenvolvimento retiniano, e que sua função está correlacionada com o controle da ativação de MAP-quinases, assim controlando a apoptose na retina em desenvolvimento. Também foi demonstrado que a ativação de TRPV1 pode levar à morte celular, o que parece ser dependente tanto da liberação de glutamato e da ativação de receptores NMDA, como também do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Ainda, a ativação de TRPV1 pode levar a alteração da síntese de proteínas envolvidas com mecanismos plásticos da retina, como a nNOS e a iNOS. Além disso, nossos dados iniciais com DAF-2 indicaram uma importante participação do receptor TRPV1 na modulação da produção de NO em vasos retinianos. Verificamos que o receptor TRPV1 parece não estar envolvido na morte aguda de células ganglionares axotomizadas. Entretanto, visto que o bloqueio de TRPV1 reduziu a nitração proteica e a reação de células de Müller, não podemos descartar um possível papel secundário desse receptor na morte celular de células ganglionares. Finalmente, a lesão prévia do nervo óptico parece sensibilizar o receptor TRPV1 nas camadas nuclear interna e ganglionar da retina, o que, associado com a alta pressão intraocular observada em grande parte dos casos de glaucoma, poderia predispor as células que expressam o receptor TRPV1 à morte celular.

REFERÊNCIAS*

- AHMAD, I. et al. Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. **Neuron**, v. 12, n. 1, p. 155-165, 1994.
- AKERMAN, S.; KAUBE, H.; GOADSBY, P. J. Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 8, p. 1354-1360, 2004.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357, n. 1, pt. 3, p. 593-615, 2001.
- AMANTINI, C. et al. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. **J. Neurochem.**, v. 102, n. 3, p. 977-990, 2007.
- ANAND, U. et al. The effect of neurotrophic factors on morphology, TRPV1 expression and capsaicin responses of cultured human DRG sensory neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 399, n. 1-2, p. 51-56, 2006.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p. 521-531, 1999.
- ASLAN, M.; CORT, A.; YUCEL, I. Oxidative and nitrative stress markers in glaucoma. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, n. 4, p. 367-376, 2008.
- ASLAN, M. et al. Nitrotyrosine formation and apoptosis in rat models of ocular injury. **Free Radic. Res.**, v. 40, n. 2, p. 147-153, 2006.
- ATHANASIOU, A. et al. Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 354, n. 1, p. 50-55, 2007.
- ATTARIWALA, R.; JENSEN, P. S.; GLUCKSBERG, M. R. The effect of acute experimental retinal vein occlusion on cat retinal vein pressures. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, n. 13, p. 2742-2749, 1997.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002.

AWASTHI, Y. C. et al. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 5, p. 607-619, 2004.

BAE, Y. C. et al. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. 478, n. 1, p. 62-71, 2004.

BANDYOPADHYAY, A.; CHAKDER, S.; RATTAN, S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 6, pt. 1, p. C1790-1797, 1997.

BAREYRE, F. M. et al. Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury. **Nat. Med.**, v. 11, n. 12, p. 1355-1360, 2005.

BEAZLEY, L. D. et al. An investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. **Brain Res.**, v. 430, n. 2, p. 169-184, 1987.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BERKELAAR, M. et al. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 4368-4374, 1994.

BERRA, E.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 17, p. 10792-10797, 1998.

BLUTE, T. A.; LEE, M. R.; ELDRED, W. D. Direct imaging of NMDA-stimulated nitric oxide production in the retina. **Vis. Neurosci.**, v. 17, n. 4, p. 557-566, 2000.

BRANDSTATTER, J. H. et al. Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. **J. Comp. Neurol.**, v. 370, n. 1, p. 1-10, 1996.

BRAY, G. M. et al. Neuronal and nonneuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth, and connectivity after axotomy. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 633, p. 214-228, 1991.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1992.

BRINGMANN, A. et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 25, n. 4, p. 397-424, 2006.

BROWN, G. C.; NEHER, J. J. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. **Mol. Neurobiol.**, v. 41, n. 2-3, p. 242-247, 2010.

CAMPOS, C. B.; BEDARD, P. A.; LINDEN, R. Requirement of p38 stress-activated MAP kinase for cell death in the developing retina depends on the stage of cell differentiation. **Neurochem. Int.**, v. 49, n. 5, p. 494-499, 2006.

CATERINA, M. J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 436-441, 1999.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CHARD, P. S. et al. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. **Neuroscience**, v. 65, n. 4, p. 1099-1108, 1995.

CHAVEZ, A. E.; DIAMOND, J. S. Diverse mechanisms underlie glycinergic feedback transmission onto rod bipolar cells in rat retina. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 31, p. 7919-7928, 2008.

CHEN, J. et al. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 330, n. 4, p. 1062-1067, 2005.

CHENG, L. et al. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 10, p. 3977-3986, 2002.

CHIDLOW, G. et al. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. **Mol. Vis.**, v. 11, p. 387-396, 2005.

CHIERZI, S.; FAWCETT, J. W. Regeneration in the mammalian optic nerve. **Restor. Neurol. Neurosci.**, v. 19, n. 1-2, p. 109-118, 2001.

CIZKOVA, D. et al. Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. **Brain Res. Bull.**, v. 58, n. 2, p. 161-171, 2002.

CONTASSOT, E. et al. Arachidonylethanolamide induces apoptosis of human glioma cells through vanilloid receptor-1. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 63, n. 9, p. 956-963, 2004.

CUEVA, J. G. et al. Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. **J. Comp. Neurol.**, v. 445, n. 3, p. 227-237, 2002.

DAVIES, J. W. et al. Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population. **Br. J. Anaesth.**, v. 104, n. 5, p. 596-602, 2010.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 9, p. 5147-5159, 1994.

DE PETROCELLIS, L. et al. The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 16, p. 12856-12863, 2001.

DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signalling. **Cell Calcium**, v. 45, n. 6, p. 611-624, 2009.

DEDOV, V. N.; ROUFOGALIS, B. D. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 183-188, 2000.

DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 65-67, 2003.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DI MARZO, V.; BLUMBERG, P. M.; SZALLASI, A. Endovanilloid signaling in pain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 12, n. 4, p. 372-379, 2002.

DI MARZO, V.; DEUTSCH, D. G. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. **Neurobiol. Dis.**, v. 5, n. 6, pt. B, p. 386-404, 1998.

DOLY, S. et al. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. **Neurosci. Lett.**, v. 357, n. 2, p. 123-126, 2004.

ENGERT, F.; BONHOEFFER, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. **Nature**, v. 399, n. 6731, p. 66-70, 1999.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 5, p. 1079-1095, 2002.

FARACI, F. M.; BRIAN JR, J. E. Nitric oxide and the cerebral circulation. **Stroke**, v. 25, n. 3, p. 692-703, 1994.

FERRINI, F. et al. Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse. **Pain**, v. 129, n. 1-2, p. 195-209, 2007.

FIORE, R. S. et al. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate receptor stimulation in rat primary cortical cultures. **J. Neurochem.**, v. 61, n. 5, p. 1626-1633, 1993.

FISCHER, A. J.; REH, T. A. Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 70-76, 2003.

FLAMMER, J. et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 21, n. 4, p. 359-393, 2002.

FORMAN, H. J.; DICKINSON, D. A. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 5, p. 594-596, 2004.

FRANK, M.; WOLBURG, H. Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve. **Glia**, v. 16, n. 3, p. 227-240, 1996.

FRANKLIN, T. B. et al. Enriched environment during adolescence changes brain-derived neurotrophic factor and TrkB levels in the rat visual system but does not offer neuroprotection to retinal ganglion cells following axotomy. **Brain Res.**, v. 1095, n. 1, p. 1-11, 2006.

GAO, Z. G. et al. Determination of capsazepine in rat plasma by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 12, p. 1865-1872, 2000.

GARCIA-VALENZUELA, E.; SHARMA, S. C.; PINA, A. L. Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. **Mol. Vis.**, v. 11, p. 225-231, 2005.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur. J. Neurosci.**, v. 27, n. 11, p. 2783-2802, 2008.

GDALYAHU, A. et al. DCX, a new mediator of the JNK pathway. **EMBO J.**, v. 23, n. 4, p. 823-832, 2004.

GELLER, D. A.; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 17, n. 1, p. 7-23, 1998.

GHOSH, D. K.; SALERNO, J. C. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. **Front. Biosci.**, v. 8, p. d193-209, 2003.

GLASER, S. T.; KACZOCHA, M.; DEUTSCH, D. G. Anandamide transport: a critical review. **Life Sci.**, v. 77, n. 14, p. 1584-1604, 2005.

GOLDSTEIN, I. M.; OSTWALD, P.; ROTH, S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. **Vision Res.**, v. 36, n. 18, p. 2979-2994, 1996.

GROPPE, M. et al. Measurement of nitric oxide production by the lesioned rat retina with a sensitive nitric oxide electrode. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 6, p. 797-807, 2003.

GROZDANOVIC, Z.; BAUMGARTEN, H. G.; BRUNING, G. Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. **Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. 225-235, 1992.

HACK, N. J. et al. Developmental changes in the subcellular localization of calretinin. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 7, p. RC67, 2000.

HAEUSGEN, W. et al. Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. **Neuroscience**, v. 161, n. 4, p. 951-959, 2009.

HAIL JR, N. Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 251-262, 2003.

HALEY, J. E.; WILCOX, G. L.; CHAPMAN, P. F. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **Neuron**, v. 8, n. 2, p. 211-216, 1992.

HAMANO, K. et al. Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. **J. Comp. Neurol.**, v. 302, n. 2, p. 417-424, 1990.

HANGAI, M. et al. Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 2, p. 450-458, 1999.

HANKINS, M. W.; IKEDA, H. Non-NMDA type excitatory amino acid receptors mediate rod input to horizontal cells in the isolated rat retina. **Vision Res.**, v. 31, n. 4, p. 609-617, 1991.

HARTWICK, A. T.; HAMILTON, C. M.; BALDRIDGE, W. H. Glutamatergic calcium dynamics and deregulation of rat retinal ganglion cells. **J. Physiol.**, v. 586, n. 14, p. 3425-3446, 2008.

HAVERKAMP, S.; KOLB, H.; CUENCA, N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is localized to Muller cells in all vertebrate retinas. **Vision Res.**, v. 39, n. 14, p. 2299-2303, 1999.

HELLWIG, N. et al. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. **J. Cell Sci.**, v. 118, pt. 5, p. 917-928, 2005.

HELYES, Z. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 292, n. 5, p. L1173-1181, 2007.

HENEKA, M. T.; FEINSTEIN, D. L. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. **J. Neuroimmunol.**, v. 114, n. 1-2, p. 8-18, 2001.

HIURA, A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 63, n. 3, p. 199-215, 2000.

HIURA, A.; ISHIZUKA, H. Changes in features of degenerating primary sensory neurons with time after capsaicin treatment. **Acta Neuropathol. (Berl)**, v. 78, n. 1, p. 35-46, 1989.

HIURA, A.; NAKAE, Y.; NAKAGAWA, H. Cell death of primary afferent nerve cells in neonatal mice treated with capsaicin. **Anat Sci Int**, v. 77, n. 1, p. 47-50, 2002.

HOFFPAUIR, B.; MCMAINS, E.; GLEASON, E. Nitric oxide transiently converts synaptic inhibition to excitation in retinal amacrine cells. **J. Neurophysiol.**, v. 95, n. 5, p. 2866-2877, 2006.

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 7, p. 298-303, 1997.

HU, J.; VAN ELDIK, L. J. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1313, n. 3, p. 239-245, 1996.

HU, S. S. et al. The biosynthesis of N-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 81, n. 4, p. 291-301, 2009.

IKEDA, H. et al. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 32, p. 11331-11336, 2005.

JACQUEMIN, E. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in the eye from endotoxin-induced uveitis rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 37, n. 6, p. 1187-1196, 1996.

JANCSO, G. et al. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. **Brain Res.**, v. 295, n. 2, p. 211-216, 1984.

Ji, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2002.

JORDT, S. E.; JULIUS, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 421-430, 2002.

JUNG, J. et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 8, p. 7048-7054, 2004.

JUNTILA, M. R.; LI, S. P.; WESTERMARCK, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. **FASEB J.**, v. 22, n. 4, p. 954-965, 2008.

KAWASAKI, A.; OTORI, Y.; BARNSTABLE, C. J. Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, n. 11, p. 3444-3450, 2000.

KAWAUCHI, T. et al. The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. **EMBO J.**, v. 22, n. 16, p. 4190-4201, 2003.

KEDEI, N. et al. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 30, p. 28613-28619, 2001.

KENNEDY, P. G. Neural cell markers and their applications to neurology. **J. Neuroimmunol.**, v. 2, n. 1, p. 35-53, 1982.

KERMER, P. et al. Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo. **Brain Res. Brain Res. Protoc.**, v. 7, n. 3, p. 255-260, 2001.

KIM, I. B.; OH, S. J.; CHUN, M. H. Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina. **Microsc. Res. Tech.**, v. 50, n. 2, p. 112-123, 2000.

KIM, K. Y. et al. The immunocytochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the developing rat retina. **Exp. Brain Res.**, v. 133, n. 4, p. 419-424, 2000.

KIM, S. R. et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. **J. Immunol.**, v. 177, n. 7, p. 4322-4329, 2006.

KIMURA, C. et al. Constitutive nitric oxide production in bovine aortic and brain microvascular endothelial cells: a comparative study. **J Physiol**, v. 554, n. 1, pt. 3, p. 721-730, 2004.

KITAOKA, Y. et al. TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, n. 4, p. 1448-1457, 2006.

KOEBERLE, P. D.; BALL, A. K. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. **Exp. Neurol.**, v. 158, n. 2, p. 366-381, 1999.

KOEBERLE, P. D.; GAULDIE, J.; BALL, A. K. Effects of adenoviral-mediated gene transfer of interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta on the survival of axotomized retinal ganglion cells. **Neuroscience**, v. 125, n. 4, p. 903-920, 2004.

KOESLING, D. et al. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. **Neurochem. Int.**, v. 45, n. 6, p. 813-819, 2004.

KOJIMA, H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Anal. Chem.**, v. 70, n. 13, p. 2446-2453, 1998.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res. Bull.**, v. 62, n. 6, p. 505-515, 2004.

KUAN, C. Y. et al. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. **Neuron**, v. 22, n. 4, p. 667-676, 1999.

KUBRUSLY, R. C. et al. Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. **Brain Res.**, v. 1038, n. 2, p. 141-149, 2005.

KUNZEVITZKY, N. J.; ALMEIDA, M. V.; GOLDBERG, J. L. Amacrine cell gene expression and survival signaling: differences from neighboring retinal ganglion cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 51, n. 7, p. 3800-3812, 2010.

LAM, P. M. et al. Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases $[Ca^{2+}]_i$, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. **J. Neurochem.**, v. 102, n. 3, p. 801-811, 2007.

LEE, E. J. et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in the axotomized ganglion cells of the rat retina. **Brain Res.**, v. 986, n. 1-2, p. 174-180, 2003.

LEE, E. S.; LEE, J. Y.; JEON, C. J. Types and density of calretinin-containing retinal ganglion cells in mouse. **Neurosci. Res.**, v. 66, n. 2, p. 141-150.

LEONELLI, M. et al. Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 27, n. 7, p. 709-718, 2009.

LEVY, D.; ZOCHODNE, D. W. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, n. 5, p. 1846-1855, 1998.

LEWIS, G. P.; FISHER, S. K. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. **Int. Rev. Cytol.**, v. 230, p. 263-290, 2003.

LI, C. Q.; WOGAN, G. N. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. **Cancer Lett.**, v. 226, n. 1, p. 1-15, 2005.

LI, D. P.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. VR1 receptor activation induces glutamate release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus. **J. Neurophysiol.**, v. 92, n. 3, p. 1807-1816, 2004.

LIAPPI, A.; WOOD, J. N. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. **Eur. J. Neurosci.**, v. 22, n. 4, p. 825-834, 2005.

LIEDTKE, W. Role of TRPV ion channels in sensory transduction of osmotic stimuli in mammals. **Exp. Physiol.**, v. 92, n. 3, p. 507-512, 2007.

LINDEN, R.; MARTINS, R. A.; SILVEIRA, M. S. Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 24, n. 4, p. 457-491, 2005.

LIU, B.; NEUFELD, A. H. Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. **Glia**, v. 30, n. 2, p. 178-186, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOELIGER, M.; REES, S. Immunocytochemical development of the guinea pig retina. **Exp. Eye Res.**, v. 80, n. 1, p. 9-21, 2005.

MACCARRONE, M. et al. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 41, p. 31938-31945, 2000.

MACCARRONE, M. et al. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. **Nat. Neurosci.**, v. 11, n. 2, p. 152-159, 2008.

MACHO, A. et al. Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require de novo gene transcription and activator protein 1 activity. **Cell Growth Differ.**, v. 9, n. 3, p. 277-286, 1998.

MACHO, A. et al. Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium. **Cell Death Differ.**, v. 6, n. 2, p. 155-165, 1999.

MANDELL, J. W. et al. Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. **Neuron**, v. 5, n. 1, p. 19-33, 1990.

MARINELLI, S. et al. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **J Physiol**, v. 543, n. 1, pt. 2, p. 531-540, 2002.

MCKINNON, S. J.; SCHLAMP, C. L.; NICKELLS, R. W. Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. **Exp. Eye Res.**, v. 88, n. 4, p. 816-824, 2009.

MEDVEDEVA, Y. V.; KIM, M. S.; USACHEV, Y. M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 20, p. 5295-5311, 2008.

MELOCHE, S.; POUYSSEGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3227-3239, 2007.

METEA, M. R.; NEWMAN, E. A. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 11, p. 2862-2870, 2006.

METEA, M. R.; NEWMAN, E. A. Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. **Exp. Physiol.**, v. 92, n. 4, p. 635-640, 2007.

MEZEY, E. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 7, p. 3655-3660, 2000.

MICHAEL, G. J.; PRIESTLEY, J. V. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 5, p. 1844-1854, 1999.

MILLER, N. R.; NEWMAN, N. J. The eye in neurological disease. **Lancet**, v. 364, n. 9450, p. 2045-2054, 2004.

MIYACHI, E.; MIYAKAWA, A.; MURAKAMI, M. Modulation of electrical coupling between retinal horizontal cells by intracellular messengers. **Neurosci. Res. Suppl.**, v. 15, p. S41-49, 1991.

MIYAHARA, T. et al. Gene microarray analysis of experimental glaucomatous retina from cynomolgous monkey. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, n. 10, p. 4347-4356, 2003.

MOJUMDER, D. K.; WENSEL, T. G.; FRISHMAN, L. J. Subcellular compartmentalization of two calcium binding proteins, calretinin and calbindin-28 kDa, in ganglion and amacrine cells of the rat retina. **Mol. Vis.**, v. 14, p. 1600-1613, 2008.

MOLDOVAN, G. L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 665-679, 2007.

MOORE, S.; THANOS, S. Differential increases in rat retinal ganglion cell size with various methods of optic nerve lesion. **Neurosci. Lett.**, v. 207, n. 2, p. 117-120, 1996.

MOROOKA, T.; NISHIDA, E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 38, p. 24285-24288, 1998.

MORRISON, J. C. et al. Limbal microvasculature of the rat eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 36, n. 3, p. 751-756, 1995.

MOVAHED, P. et al. Vascular effects of anandamide and N-acylvanillylamines in the human forearm and skin microcirculation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 2, p. 171-179, 2005.

MUSELLA, A. et al. TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 40, n. 1, p. 89-97, 2009.

NAG, T. C.; WADHWA, S. Developmental expression of calretinin immunoreactivity in the human retina and a comparison with two other EF-hand calcium binding proteins. **Neuroscience**, v. 91, n. 1, p. 41-50, 1999.

NEUFELD, A. H.; LIU, B. Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. **Neuroscientist**, v. 9, n. 6, p. 485-495, 2003.

NEUFELD, A. H.; SAWADA, A.; BECKER, B. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 17, p. 9944-9948, 1999.

NEUFELD, A. H.; SHAREEF, S.; PENA, J. Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina. **J. Comp. Neurol.**, v. 416, n. 2, p. 269-275, 2000.

NEWMAN, E.; REICHENBACH, A. The Muller cell: a functional element of the retina. **Trends Neurosci.**, v. 19, n. 8, p. 307-312, 1996.

NITZAN, A. et al. Examination of cellular and molecular events associated with optic nerve axotomy. **Glia**, v. 54, n. 6, p. 545-556, 2006.

NORTON, W. T. et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochem. Res.**, v. 17, n. 9, p. 877-885, 1992.

NUCCI, C. et al. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 48, n. 7, p. 2997-3004, 2007.

NUMAZAKI, M. et al. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 13, p. 8002-8006, 2003.

OHLSSON, M.; MATTSSON, P.; SVENSSON, M. A temporal study of axonal degeneration and glial scar formation following a standardized crush injury of the optic nerve in the adult rat. **Restor Neurol Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2004.

OKERE, C. O.; WATERHOUSE, B. D. Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. **Neuroreport**, v. 15, n. 2, p. 255-258, 2004.

OKU, H. et al. Gene expression of neurotrophins and their high-affinity Trk receptors in cultured human Muller cells. **Ophthalmic Res.**, v. 34, n. 1, p. 38-42, 2002.

OLIVEIRA, C. S. et al. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 26, n. 3-4, p. 355-362, 2008.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 14, p. 453-501, 1991.

OSBORNE, N. N. et al. Optic nerve and neuroprotection strategies. **Eye**, v. 18, n. 11, p. 1075-1084, 2004.

OSBORNE, N. N. et al. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 10, p. 1252-1259, 2001.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PALAZZO, E. et al. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 439, n. 1-3, p. 69-75, 2002.

PANG, I. H. et al. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, n. 4, p. 1313-1321, 2005.

PASTEELS, B. et al. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. **Vis. Neurosci.**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 1990.

PEDERSEN, S. F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. TRP channels: an overview. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 233-252, 2005.

PERNET, V.; DI POLO, A. Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo. **Brain**, v. 129, n. 1, pt. 4, p. 1014-1026, 2006.

PILYAVSKII, A. I. et al. Capsaicin-induced effects on c-fos expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 521, n. 1-3, p. 70-78, 2005.

POBLETE, I. M. et al. Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. **J Physiol**, v. 568, n. 1, pt. 2, p. 539-551, 2005.

PRIESTLEY, J. V. et al. Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, n. 5, p. 495-505, 2002.

PRILLOFF, S. et al. Two faces of calcium activation after optic nerve trauma: life or death of retinal ganglion cells in vivo depends on calcium dynamics. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 11, p. 3339-3346, 2007.

PUNTAMBEKAR, P. et al. Essential role of Rac1/NADPH oxidase in nerve growth factor induction of TRPV1 expression. **J. Neurochem.**, v. 95, n. 6, p. 1689-1703, 2005.

QIAO, S. et al. Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Neurosci. Res.**, v. 51, n. 2, p. 175-183, 2005.

QUIGLEY, H. A. Neuronal death in glaucoma. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 18, n. 1, p. 39-57, 1999.

RAFF, M. C.; FFRENCH-CONSTANT, C.; MILLER, R. H. Glial cells in the rat optic nerve and some thoughts on remyelination in the mammalian CNS. **J. Exp. Biol.**, v. 132, p. 35-41, 1987.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Histologie du systeme nerveux de l'homme & des vertebres**. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Instituto Ramon y Cajal, 1952.

REN, K.; RUDA, M. A. Nitric oxide synthase-containing neurons in sensory ganglia of the rat are susceptible to capsaicin-induced cytotoxicity. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 505-511, 1995.

RIDET, J. L. et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 12, p. 570-577, 1997.

RIOS, H. et al. Development of nitric oxide neurons in the chick embryo retina. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 120, n. 1, p. 17-25, 2000.

RITTER, S.; DINH, T. T. Capsaicin-induced neuronal degeneration in the brain and retina of preweanling rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 296, n. 3, p. 447-461, 1990.

RITTER, S.; DINH, T. T. Prior optic nerve transection reduces capsaicin-induced degeneration in rat subcortical visual structures. **J. Comp. Neurol.**, v. 308, n. 1, p. 79-90, 1991.

ROCHA, M.; MARTINS, R. A.; LINDEN, R. Activation of NMDA receptors protects against glutamate neurotoxicity in the retina: evidence for the involvement of neurotrophins. **Brain Res.**, v. 827, n. 1-2, p. 79-92, 1999.

RODRIGUES, M. et al. Retinal insulin receptors: localization using a polyclonal anti-insulin receptor antibody. **Brain Res.**, v. 443, n. 1-2, p. 389-394, 1988.

ROUFAIL, E.; STRINGER, M.; REES, S. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina. **Brain Res.**, v. 684, n. 1, p. 36-46, 1995.

SANCHEZ, J. F.; KRAUSE, J. E.; CORTRIGHT, D. N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 373-381, 2001.

SAPPINGTON, R. M.; CALKINS, D. J. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 7, p. 3004-3017, 2008.

SAPPINGTON, R. M. et al. TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca²⁺ with exposure to hydrostatic pressure. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 50, n. 2, p. 717-728, 2009.

SCHMIDT-KASTNER, R. et al. Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction in rat visual system: features of reactive and damaged astrocytes. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 11, n. 2, p. 157-174, 1993.

SCHMIDT, K. F.; NOLL, G. N.; YAMAMOTO, Y. Sodium nitroprusside alters dark voltage and light responses in isolated retinal rods during whole-cell recording. **Vis. Neurosci.**, v. 9, n. 2, p. 205-209, 1992.

SCHMUED, L. C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W., JR. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res.**, v. 751, n. 1, p. 37-46, 1997.

SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Res.**, v. 874, n. 2, p. 123-130, 2000.

SCHROEDER, R. A.; KUO, P. C. Nitric oxide: physiology and pharmacology. **Anesth. Analg.**, v. 81, n. 5, p. 1052-1059, 1995.

SCHUTTE, M.; WERNER, P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. **Neurosci. Lett.**, v. 246, n. 1, p. 53-56, 1998.

SELLES-NAVARRO, I. et al. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. **Exp. Neurol.**, v. 167, n. 2, p. 282-289, 2001.

SHIRAKAWA, H. et al. TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, n. 4, p. 1211-1215, 2008.

SIKAND, P.; PREMKUMAR, L. S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. **J Physiol**, v. 581, pt. 2, p. 631-647, 2007.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Sci. Am.**, v. 266, n. 5, p. 68-71, 1992.

STARKOV, A. A.; CHINOPOULOS, C.; FISKUM, G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. **Cell Calcium**, v. 36, n. 3-4, p. 257-264, 2004.

STEWART, A. G.; PHAN, L. H.; GRIGORIADIS, G. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. **Microsurgery**, v. 15, n. 10, p. 693-702, 1994.

SUCHER, N. J.; LEI, S. Z.; LIPTON, S. A. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor-mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. **Brain Res.**, v. 551, n. 1-2, p. 297-302, 1991.

SUGIMOTO, T.; XIAO, C.; ICHIKAWA, H. Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves an apoptotic mechanism. **Brain Res.**, v. 807, n. 1-2, p. 147-154, 1998.

SUNICO, C. R. et al. Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 6, p. 1448-1458, 2005.

SWANSON, K. I. et al. Neuroprotective effect of sulfhydryl reduction in a rat optic nerve crush model. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, n. 10, p. 3737-3741, 2005.

SZOLCSANYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, n. 6, p. 377-384, 2004.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004.

TOHDA, C. et al. Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. **J. Neurochem.**, v. 76, n. 6, p. 1628-1635, 2001.

TONI, N. et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 421-425, 1999.

TOTH, A. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 135, n. 1-2, p. 162-168, 2005.

TSUYAMA, Y.; NOLL, G. N.; SCHMIDT, K. F. L-arginine and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate alter dark voltage and accelerate light response recovery in isolated retinal rods of the frog (*Rana temporaria*). **Neurosci. Lett.**, v. 149, n. 1, p. 95-98, 1993.

VAN DEN WORM, E.; NIJKAMP, F. P.; ENGELS, F. Nerve growth factor and the vanilloid receptor: partners in crime? **Clin. Exp. Allergy**, v. 34, n. 7, p. 996-1000, 2004.

VARGA, A. et al. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. **Neuroscience**, v. 140, n. 2, p. 645-657, 2006.

VERSAUX-BOTTERI, C.; POCHET, R.; NGUYEN-LEGROS, J. Immunohistochemical localization of GABA-containing neurons during postnatal development of the rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, n. 4, p. 652-659, 1989.

VERUKI, M. L.; WASSLE, H. Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina. **Eur. J. Neurosci.**, v. 8, n. 11, p. 2286-2297, 1996.

VIDAL, L. et al. Nitric oxide synthase in retina and optic nerve head of rat with increased intraocular pressure and effect of timolol. **Brain Res. Bull.**, v. 70, n. 4-6, p. 406-413, 2006.

VIZZARD, M. A.; ERDMAN, S. L.; DE GROAT, W. C. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration. **Neuroscience**, v. 67, n. 1, p. 1-5, 1995.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 20, p. 8026-8033, 2001.

VON KRIEGSTEIN, K. et al. Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, n. 4, p. 1335-1348, 1999.

WANG, L. H. et al. Impaired vasodilation in response to perivascular nerve stimulation in mesenteric arteries of TRPV1-null mutant mice. **J. Hypertens.**, v. 24, n. 12, p. 2399-2408, 2006.

WASSLE, H.; BOYCOTT, B. B. Functional architecture of the mammalian retina. **Physiol. Rev.**, v. 71, n. 2, p. 447-480, 1991.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 1017-1028, 1985.

WILLIAMS, R. R. et al. Organization of the inner retina following early elimination of the retinal ganglion cell population: effects on cell numbers and stratification patterns. **Vis. Neurosci.**, v. 18, n. 2, p. 233-244, 2001.

WU, G. Y.; DEISSEROTH, K.; TSIEN, R. W. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. **Nat. Neurosci.**, v. 4, n. 2, p. 151-158, 2001.

XIA, Z. et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.

XING, J.; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 97, n. 1, p. 503-511, 2007.

YAZULLA, S. et al. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. **J. Comp. Neurol.**, v. 415, n. 1, p. 80-90, 1999.

YU, J. et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 31, p. 10999-11004, 2005.

ZHAN, X. et al. Targets of tyrosine nitration in diabetic rat retina. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 864-874, 2008.

ZHANG, C.; TSO, M. O. Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. **J. Neurosci. Res.**, v. 73, n. 6, p. 840-845, 2003.

ZIMOV, S.; YAZULLA, S. Localization of vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1)-like immunoreactivity in goldfish and zebrafish retinas: restriction to photoreceptor synaptic ribbons. **J. Neurocytol.**, v. 33, n. 4, p. 441-452, 2004.

ZIMOV, S.; YAZULLA, S. Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. **Vis. Neurosci.**, v. 24, n. 4, p. 581-591, 2007.

ANEXOS

ANEXO A - Trabalho publicado no periódico *International Journal of Developmental Neuroscience*.

ANEXO B - Trabalho publicado no periódico *Brazilian Journal of Medical Research*.

ANEXO C - Trabalho publicado no periódico *Experimental eye research*.

ANEXO D - Trabalho submetido para publicação no periódico *International Journal of Developmental Neuroscience*.