UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Estudo Eletrofisiológico de Modelo Animal para Retinopatia da Prematuridade

RICARDO TIOSSO PANASSIOL

São Paulo
2017

RICARDO TIOSSO PANASSIOL

Estudo Eletrofisiológico de Modelo Animal para Retinopatia da Prematuridade

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Área de concentração: Psicologia Experimental
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christina Joselevitch.

São Paulo

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tiosso Panassiol, Ricardo

Estudo Eletrofisiológico de Modelo Animal para Retinopatia da Prematuridade /
Ricardo Tiosso Panassiol; orientadora Christina Joselevitch. -- São Paulo, 2017.
f. 104.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental)
Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Retinopatia da prematuridade. 2. Eletroretinograma. 3. Retina. 4. Visão. 5.
Eletrofisiologia. I. Joselevitch, Christina, orient. II. Título.

Nome: Panassiol, Ricardo Tiosso

Título: Estudo Eletrofisiológico de Modelo Animal para Retinopatia da Prematuridade

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Prof.^a Dr.^a Christina Joslevitch pela oportunidade de poder estudar neurociências e me mostrar que é a disciplina e o comprometimento com a pesquisa que forjam um cientista de qualidade. À Prof.^a Dr.^a Dora Fix Ventura, que inspira a todos com seu carisma e determinação. É uma honra poder dizer que tive a chance de compartilhar reuniões e discussões com um dos avatares da ciência brasileira. Ao Prof. Dr. Ricardo José Giordano, que tão generosamente disponibilizou os animais, instalações e pessoal que viabilizaram essa pesquisa. Ao Prof. Dr. Givago da Silva Souza que sempre se dispôs a ajudar-nos com sua inteligência nas análises dos dados, cursos e sugestões precisas. À agência de fomento à pesquisa científica pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, processo nº 2015/12457-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Gostaria também de agradecer aos meus amigos do LabVis que me acolheram e ajudaram tantos nos momentos de empreitada científica, quanto nos de lazer e alegria. Com certeza, vocês me ajudaram não só com questionamentos, mas com um ombro amigo nos momentos difíceis. Também gostaria de mais uma vez agradecer aos meus amigos de Campo Grande que, mesmo com a distância, me apoiam incondicionalmente. Vocês, com toda a certeza, transformam essa vida meramente suportável em algo que incrível que valha a pena lutar e compartilhar!

Outra pessoa que tem parte nessa empreitada e eu gostaria de agradecer é meu pai. Mais uma vez reconheço que a curiosidade e perseverança que tenho hoje é fruto do seu incentivo no passado. Estamos colhendo os frutos dos nossos esforços juntos pai e, hoje, brado com toda a alegria que sou um cientista! Obrigado por sempre acreditar em mim e me ajudar a realizar esse sonho.

E finalmente, porém nunca menos importante, agradeço à Ana, minha tão amada companheira. Seu carinho e atenção sempre me tranquilizaram nos momentos mais difíceis e com certeza aliviaram o pesar das frustrações do cotidiano acadêmico. Os dias de insucesso eram facilmente superados com seu sorriso e palavras de incentivo. Orgulho-me de poder compartilhar minha história com você e espero poder continuar trilhando nossas vidas lado a lado.

“Meten is Weten”
(Ditado holandês).

RESUMO

Panassiol, R. T. (2017). *Estudo Eletrofisiológico de Modelo Animal para Retinopatia da Prematuridade* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A retinopatia da prematuridade é uma doença ocular do desenvolvimento associada a um crescimento vascular retiniano anormal e ocorre somente em recém-nascidos com menos de 32 semanas de gestação e submetidos a longos períodos em incubadoras, tipicamente ricas em oxigênio. A doença possui duas fases: (1) a inibição do desenvolvimento normal de vasos na retina, decorrente da hiperóxia induzida pelo ambiente da incubadora; (2) neovascularização retiniana devido ao aumento de fatores de crescimento desencadeados pela pouca disponibilidade de oxigênio fora da incubadora. O objetivo deste trabalho é avaliar a função visual em um modelo animal de retinopatia da prematuridade, comparando-o a animais saudáveis. Eletroretinogramas (ERGs) de campo total foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) controle e camundongos submetidos a hiperoxigenação em câmara hiperbárica (75% de oxigênio) durante o desenvolvimento retiniano pós-natal para entender as perdas visuais que ocorrem na retinopatia da prematuridade. Foram utilizados 122 animais, divididos em dois grupos: no *grupo controle*, ERGs foram realizados em P17 ($n = 32$), P30 ($n = 26$) e $\geq P60$ ($n = 44$) com estimulação em comprimentos de onda distintos (LEDs com pico de emissão em 365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm) para avaliação da atividade funcional da retina ao longo do desenvolvimento, não passando por nenhuma manipulação experimental adicional; no *grupo experimental*, os animais foram submetidos à hiperoxigenação de P7 a P12 para indução da angiogênese e avaliados com ERGs com estimulação em 459 nm em P17 ($n = 7$), P30 ($n = 6$) e $\geq P60$ ($n = 7$), para acompanhar o desenvolvimento retiniano. Todos os animais foram adaptados ao escuro por pelo menos duas horas antes da realização dos experimentos. Em sessão de 40 a 60 minutos de duração, os animais foram submetidos a flashes de luz em intensidades crescentes. Amplitudes e latências das ondas a, b e potenciais oscilatórios foram medidas, e relações intensidade-resposta ajustadas com modelos matemáticos diferentes para comparação entre indivíduos e entre grupos. Os parâmetros obtidos com os ajustes foram comparados através de ANOVA e testes T de Student com as devidas correções de Bonferroni. Nos níveis luminosos testados, a onda b do ERG murino é majoritariamente dominada pela atividade dos bastonetes e a onda a majoritariamente dominada pelos cones. Os registros em animais em P17 e P30 do grupo controle foram similares aos realizados em $\geq P60$ quanto à latência e amplitude

de resposta, bem como quanto à sensibilidade e grau de cooperação entre os distintos elementos do ERG. Entretanto, as amplitudes máximas de resposta foram ligeiramente maiores em P30 para todos os comprimentos de onda e houve ligeira redução da sensibilidade absoluta ao longo do desenvolvimento. Para o grupo experimental, os animais em P17 sofreram as maiores perdas, com diminuições nas amplitudes de todos os componentes do ERG, sem prejuízo das latências ou sensibilidade. Também houve uma sucessiva recuperação das respostas ao longo do desenvolvimento animal. Esses achados indicam que o modelo de ROP em camundongos reproduz aspectos essenciais ao quadro patológico severo humano.

Palavras-chave: Retinopatia da prematuridade, visão, retina, eletrorretinograma, bastonetes, cones.

ABSTRACT

Panassiol, R. T. (2017). *Electrophysiological Study of an Animal Model for Retinopathy of Prematurity* (Master's Thesis). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The retinopathy of prematurity is an ocular developmental disorder associated with abnormal retinal vascular growth and occurs only in neonates younger than 32 weeks of gestation and undergoing long periods in incubators, typically rich in oxygen. The disease has two phases: (1) the inhibition of the normal development of vessels in the retina, due to the hyperoxia induced by the incubator environment; (2) retinal neovascularization due to the increase in growth factors triggered by the low availability of oxygen outside the incubator. The objective of this study is to evaluate the visual function in an animal model of retinopathy of prematurity, comparing it to healthy animals. Full-field electroretinogram (ERGs) were performed on control mice (*Mus musculus*) and that were exposed to a hyperbaric chamber (75% oxygen) during post-natal retinal development to understand the visual losses that occur in retinopathy of prematurity. We used 122 animals, divided into two groups: in the *control group*, ERGs were performed at P17 (n = 32), P30 (n = 26) and $\geq$ P60 (n = 44) with stimulation at different wavelengths (LEDs with peak of emission at 365 nm, 459 nm, 525 nm and 635 nm) for evaluation of the functional activity of the retina throughout the development, without any additional experimental manipulation; in the *experimental group*, animals were submitted to hyperoxigenation of P7 to P12 for induction of angiogenesis and evaluated with ERGs with stimulation at 459 nm in P17 (n = 7), P30 (n = 6) and $\geq$ P60 (n = 7) to follow up retinal development. All animals were dark adapted for at least two hours prior to the experiments. In sessions with 40 to 60 minutes, the animals were subjected to flashes of light at increasing intensities. Amplitudes and latencies of a-waves, b-waves and oscillatory potentials were measured, and intensity-response relationships adjusted with different mathematical models for comparison between individuals and between groups. The parameters obtained with the adjustments were compared through ANOVA and Student's T tests with the appropriate Bonferroni correction. In the light levels tested, the murine ERG b-wave is dominated by rod activity and the a-wave is dominated by the cones. The records in animals at P17 and P30 of the control group were similar to those performed at $\geq$ P60 regarding the latency and amplitude of response, as well as the sensitivity and degree of cooperation between the different ERG elements. However, the maximum response amplitudes were slightly higher at P30 at all

wavelengths and there was slight reduction of absolute sensitivity throughout development. For the experimental group, the animals at P17 suffered the greatest losses, with decreases in the amplitudes of all the components of the ERG, without prejudice to the latencies or sensitivity. There was also a successive recovery of responses throughout animal development. These findings indicate that the ROP model in mice reproduces aspects essential to the severe human pathology.

Keywords: Retinopathy of Prematurity, vision, retina, electroretinogram, rods, cones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Camadas do olho humano.....	13
Figura 2 - A retina de mamíferos.....	14
Figura 3 - Sensibilidade espectral dos fotorreceptores do camundongo	16
Figura 4 - Parâmetros da retinopatia da prematuridade.....	19
Figura 5 - Fases de indução da retinopatia da prematuridade em camundongos.....	21
Figura 6 - Correntes oculares.....	22
Figura 7 - O ERG e seus componentes.....	24
Figura 8 - Variáveis Medidas	30
Figura 9 - A curva de Hill.....	32
Figura 10 - O ERG de animais controle em $\geq P60$	35
Figura 11 - Relações intensidade-resposta médias do ERG murino em animais controle $\geq P60$	36
Figura 12 - Ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle $\geq P60$	37
Figura 13 - Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle $\geq P60$	38
Figura 14 - Sensibilidade espectral do ERG murino de animais controle em $\geq P60$	40
Figura 15 - Relação onda a versus onda b de ERG murino de animais controle em $\geq P60$	41
Figura 16 - Aumento na velocidade das respostas médias do ERG murino em $\geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	43
Figura 17 - Ajuste matemático do aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG murino em $\geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	44
Figura 18 - O ERG de animais controle em P17	47

Figura 19 - O ERG de animais controle em P30	48
Figura 20 - Relações intensidade-resposta médias para onda a do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	49
Figura 21 - Relações intensidade-resposta médias para onda b do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	50
Figura 22 - Relações intensidade-resposta médias para os POs do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	51
Figura 23 - Relações intensidade-resposta médias normalizadas para ondas b do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	52
Figura 24 - Ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	54
Figura 25 - Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle P17.....	55
Figura 26 - Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle P30.....	56
Figura 27 - Comparação de parâmetros do ajuste matemático do ERG murino em animais controle de 17, 30 e $\geq$ 60 dias de idade.....	58
Figura 28 - Sensibilidade espectral do ERG murino em P17, P30 e $\geq$ 60.....	59
Figura 29 - Relação onda a versus onda b de ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60.....	61
Figura 30 - Aumento na velocidade das respostas médias da onda a do ERG murino em P17, P30 $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	62
Figura 31 - Aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG murino em P17, P30 $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	63
Figura 32 - Aumento na velocidade das respostas médias dos POs do ERG murino em P17, P30 $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	64

Figura 33 - Ajuste matemático do aumento na velocidade das respostas médias do ERG murino em P17, $P30 \geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	66
Figura 34 - Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle versus experimental em P17.....	69
Figura 35 - Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle versus experimental em P30.....	70
Figura 36 - Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle $\geq P60$ versus experimental em P60	71
Figura 37 - Comparação das relações intensidade-resposta médias da onda a do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	72
Figura 38 - Comparação das relações intensidade-resposta médias da onda b do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	73
Figura 39 - Comparação das relações intensidade-resposta médias dos POs do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	74
Figura 40 - Comparação dos ajustes matemáticos da onda b do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	76
Figura 41 - Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle versus experimental em P17	77
Figura 42 - Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle versus experimental em P30	78
Figura 43 - Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle versus experimental em $\geq P60$	79
Figura 44 - Variação temporal dos parâmetros da onda b do ERG escotópico murino dos grupos controle e experimental	80
Figura 45 - Relação onda a por onda b para registros obtidos de ERG murinho de animais controle versus submetidos à câmara hiperbárica.....	82

Figura 46 - Comparação do aumento na velocidade das respostas médias da onda a do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	83
Figura 47 - Comparação do aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	84
Figura 48 - Comparação do aumento na velocidade das respostas médias dos POs do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais.....	85
Figura 49 - Comparação dos ajustes matemáticos do aumento na velocidade das respostas médias do ERG escotópico murino de animais controle versus experimentais	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Impedância e peso médios ($\pm$ SD) para animais em P17, P30 e $\geq$ P60 (grupo controle)	28
Tabela 2 - Intensidades, intervalos e repetições utilizados no presente estudo para o ERG escotópico em 365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm	29
Tabela 3 - Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	39
Tabela 4 - Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	45
Tabela 5 - Número de animais de cada idade testados com os diferentes comprimentos de onda utilizados no grupo controle.....	49
Tabela 6 - Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em P17 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	57
Tabela 7 - Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em P30 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	57
Tabela 8 - Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em P17 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	67
Tabela 9 - Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em P30 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.....	67
Tabela 10 - Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais experimentais em P17, P30 e $\geq$ P60 para estimulação em 459 nm	87

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. <i>Olho, Retina e Visão</i>	<i>13</i>
1.2 <i>A Retina do Camundongo</i>	<i>15</i>
1.3. <i>Retinopatia da Prematuridade e o Modelo Animal</i>	<i>17</i>
1.4. <i>O Eletrorretinograma</i>	<i>21</i>
2. Objetivos.....	25
2.1. <i>Objetivos Gerais</i>	<i>25</i>
2.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>25</i>
3. Material e Métodos	26
3.1. <i>Animais</i>	<i>26</i>
3.2. <i>Eletrorretinograma.....</i>	<i>27</i>
3.3. <i>Análise de Dados</i>	<i>30</i>
4. Resultados.....	33
4.1. <i>O ERG Murino Escotópico de Animais Adultos.....</i>	<i>33</i>
4.2. <i>O ERG Murino Escotópico ao Longo do Desenvolvimento.....</i>	<i>43</i>
4.3. <i>Alterações no ERG Murino Escotópico Causadas pela</i> <i>Exposição à Câmara Hiperbárica.....</i>	<i>67</i>
5. Discussão.....	88
5.1. <i>O ERG murino escotópico em animais adultos e ao longo do</i> <i>desenvolvimento.....</i>	<i>88</i>
5.2. <i>Efeitos da exposição à câmara hiperbárica e o modelo de ROP.....</i>	<i>90</i>
6. Referências	92
7. ANEXO A – Certificado de Ética.....	99

1. Introdução

1.1. Olho, Retina e Visão

O olho dos vertebrados é formado por três camadas concêntricas de tecido, preenchidas por meios opticamente transparentes (**Figura 1**). A *túnica fibrosa*, mais externa e compreendendo a esclera e a córnea, é responsável pela proteção e sustentação mecânica; além disso, a córnea é o meio ocular de maior poder dióptrico em animais não aquáticos. A *túnica vascular*, abarcando a íris, o corpo ciliar e a coróide, tem como principal função a nutrição das estruturas e meios oculares. Por fim, a *túnica interna*, constituída pelo epitélio pigmentar e a retina, é a única que contém neurônios sensíveis à estimulação luminosa, sendo por isso capaz de processar e transmitir sinais visuais a regiões mais internas do sistema nervoso central (Purves et al., 2011).

Figura 5. Camadas do olho humano. Desenho ilustrando um corte sagital do globo ocular, destacando suas camadas. **Fonte:** Adaptado de Goto (2016) e cordialmente cedido pela autora.

A retina deriva de protrusão do tubo neural durante a fase embrionária. Com o desenvolvimento, esta evaginação forma uma estrutura de paredes duplas, conhecida como *cálice óptico*. A parede externa dá origem ao epitélio pigmentar da retina, enquanto da parede interna provêm os fotorreceptores e todos os demais tipos celulares retinianos. A camada

pigmentar adere fortemente à coroide, mas prende-se fracamente à camada fotossensível (Junqueira & Carneiro, 2013).

A estrutura da retina foi claramente descrita em várias espécies vertebradas por Cajal (1893) e, devido à sua origem e acessibilidade, é a parte mais bem compreendida do sistema nervoso central. Ela organiza-se em três camadas nucleares (**Figura 2**): a *camada nuclear externa*, na qual se localizam os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes); a *camada nuclear interna*, onde ficam os corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas; por fim, a *camada das células ganglionares*, que estabelecem contato com as células bipolares em seus dendritos e enviam seus axônios ao núcleo geniculado lateral do tálamo, formando assim o nervo óptico. Entre as camadas nuclear externa e interna, encontra-se a *camada plexiforme externa*, região das sinapses entre os fotorreceptores e as células bipolares e horizontais. Dos contatos entre as células bipolares e células amácrinas e ganglionares, forma-se a *camada plexiforme interna*.

Figura 6. A retina de mamíferos. Organização histológica da retina, mostrando a incidência luminosa e o fluxo de informação vertical, da região distal para a proximal: segmento externo dos fotorreceptores; a camada nuclear externa com cones e bastonetes; a camada plexiforme externa; a camada nuclear interna, na qual observa-se o fluxo de informação lateral, com células horizontais (HC), células amácrinas (AII e A17), bipolares ON (DCB), OFF (HCB) e exclusivas para bastonetes (RBC); a camada plexiforme interna, a camada de células ganglionares ON (ON GC) e OFF (OFF GC) e a camada de fibras nervosas direcionada ao nervo óptico. Os elementos preenchidos em preto destacam a via de processamento dos bastonetes. **Fonte:** Adaptado e reproduzido de J. G. Robson, Maeda, Saszik, & Frishman, (2004). *In vivo studies of signaling in rod pathways of the mouse using the electroretinogram. Vision Research* (44), 3243-3268, com a permissão de Elsevier.

Cada tipo celular retiniano possui uma função específica no processo visual. Os *cones* e *bastonetes* são responsáveis pela fototransdução, que é transformação da luz ambiente captada em sinais eletroquímicos (Kandel et al., 2012). Tais sinais são transmitidos sinapticamente às *células bipolares*, que os dividem em canais paralelos de processamento (Wässle, 2004) e repassam as informações para as *células ganglionares*, sendo essas os neurônios de aferência da retina. Células ganglionares geram potenciais de ação e, assim, transmitem informações para o cérebro através do nervo óptico. Também existe um conjunto células ganglionares fotossensíveis que, apesar de não participarem do processamento visual, expressam melanopsina em seus corpos celulares e são parcialmente responsáveis pela regulação do ritmo circadiano, além de controlarem as respostas pupilares à luz (Bellingham et al., 2006; Panda et al., 2003; Provencio et al., 1998). Qualquer distúrbio que leve à perda de um ou mais componentes retinianos gera danos indelévels à visão.

1.2. A Retina do Camundongo

A estrutura retiniana é altamente conservada em todas as espécies de vertebrados (Masland, 2011); os olhos dos camundongos são, portanto, muito semelhantes em organização aos dos ratos e humanos, possuindo as mesmas três camadas nucleares e plexiformes. Similarmente, ainda, camundongos apresentam um sistema vascular retiniano bem desenvolvido, com artérias e veias emergindo radialmente do disco óptico (Perlman, 2009).

Uma característica importante da retina do camundongo é que 95% de seus fotorreceptores são bastonetes (Szél et al., 1992). Como ilustrado no nomograma de sensibilidade espectral (**Figura 3**), os bastonetes apresentam pico de sensibilidade espectral em 498 nm e banda beta sensível ao UV (Toda et al., 1999). Os cones são divididos em dois tipos, com picos de sensibilidade em comprimentos de ondas curtos (360 nm, em roxo) e médios (509 nm, em verde) e possibilitando, desta maneira, visão fotópica dicromática (Jacobs; Williams, 2007; Rocha et al., 2016; Wang; Weick; Demb, 2011). Eles estão organizados em duas faixas na retina: na porção ventral encontram-se os cones S e, na dorsal, os cones M, com uma faixa central de cones que coexpressam opsinas tanto para comprimentos curtos quanto por médios (Lukáts et al., 2005).

Figura 7. Sensibilidade espectral dos fotorreceptores do camundongo. Probabilidade de absorção dos pigmentos contidos nos diferentes tipos espectrais de fotorreceptores do camundongo em relação ao comprimento de onda. Cada linha corresponde a um fotorreceptor específico: cones S (linha roxa, absorção máxima em 360 nm), bastonetes (linha preta, absorção máxima em 498 nm) e cones M (linha verde, absorção máxima em 509 nm).

Os olhos do camundongo não estão completamente formados quando os animais nascem, e várias características alteram-se com o desenvolvimento. A descrição seguinte dos estágios de desenvolvimento da retina é feita com base em Smith, Winston, & Simon (2002) e Szél et al. (1993):

- a. Primeiro dia pós-natal (P1) – A parte posterior da retina separa-se em camadas neuroblástica interna e externa. Nenhum segmento dos fotorreceptores está formado;
- b. P2 - A camada neuroblástica interna apresenta duas a quatro células de espessura, sendo composta em sua maioria por células ganglionares, enquanto a camada neuroblástica externa possui duas ou três células de espessura e dará origem à camada nuclear interna. Os segmentos internos dos fotorreceptores começam a formar-se rudimentarmente;
- c. P4 – A futura camada nuclear interna da retina posterior torna-se mais definida, mas a camada plexiforme externa ainda não se formou. Os segmentos internos dos fotorreceptores dobram de tamanho e os primeiros segmentos externos dos cones

- S (30-40 cones/retina) são vistos na parte inferior da retina, mantendo-se muito mais abundantes nessa região da retina ao longo de todo o desenvolvimento;
- d. P6 a P8 – Conclui-se o desenvolvimento de todas as camadas da retina posterior, com a formação da camada plexiforme externa. Os segmentos internos dos fotorreceptores ficam nítidos e em P7 alguns poucos cones S (3-4 cones/retina) surgem na parte superior, mantendo-se nessa proporção em relação à área inferior. Há extensiva migração e morte de células antes da maturação retiniana;
 - e. P11 a P12 – Os primeiros cones M surgem e mantêm-se confinados exclusivamente na região superior da retina ao longo de todo o desenvolvimento. Em P12, a densidade dos cones M atinge 1900/mm²;
 - f. P10 a P14 – A fase final do desenvolvimento retiniano é atingida, coincidindo com a abertura dos olhos. Observa-se a presença de todas as camadas; entretanto, a retina ainda não desenvolveu a *ora serrata*, região de junção entre a retina e o corpo ciliado. Os segmentos internos dos fotorreceptores estão quase maduros em P10. A partir de P14, o comprimento do segmento externo aumenta gradativamente, até atingir o tamanho adulto antes de P21.
 - g. P30 – A densidade de cones S na parte inferior da retina é de 18.000/mm² e de cones M na parte superior é de 11.000/mm². Na faixa mediana da retina, os dois tipos de cones ocupam partes complementares.

1.3. Retinopatia da Prematuridade e o Modelo Animal

A retinopatia da prematuridade (ROP, sigla do inglês *retinopathy of prematurity*) é uma doença ocular do desenvolvimento associada ao crescimento vascular retiniano anormal e ocorre somente em recém-nascidos prematuros e submetidos a longos períodos em incubadoras, tipicamente ricas em oxigênio (Hartnett & Penn, 2012). A doença possui duas fases, sendo a primeira a inibição da vascularização normal da retina, decorrente da hiperóxia induzida pelo ambiente da incubadora, que suprime os efeitos de fatores de crescimento regulados pelo oxigênio (VEGF e EPO¹). A segunda fase ocorre após retorno ao ambiente e maturação da retina, quando esta se torna metabolicamente mais ativa. A constituição vascular comprometida na primeira fase torna a retina hipóxica, induzindo um rápido aumento de fatores de crescimento desencadeado pela pouca disponibilidade de oxigênio (HIF²). O resultado é uma proliferação

¹ VEGF – *vascular endothelial growth factor*; EPO – Eritropoietina.

² HIF – Fatores induzidos por hipóxia.

anormal de vasos que podem comprometer a visão e provocar até o descolamento total da retina (Connor et al., 2009). Bebês que apresentam o quadro têm maiores chances de desenvolver miopia e estrabismo durante a infância; aqueles que atingem estágios mais avançados da doença e/ou descolamento da retina, acabam desenvolvendo baixa acuidade visual, sendo considerados legalmente cegos (acuidade visual bilateral $<20/200$), com pouca melhora mesmo após a realização de vitrectomia (Hartnett, 2010).

A doença é caracterizada por quatro parâmetros de acordo com a Classificação Internacional da ROP (Fulton et al., 2009; Hartnett, 2010):

- 1) Zona – Subdivide-se em I, II e III e corresponde a área de vascularização retiniana (**Figura 4a**). A Zona I tem menor vascularização e apresenta maior risco de baixo rendimento visual em caso de ROP severa. A Zona II apresenta área de vascularização intermediária e risco substancial de baixo rendimento visual em caso de acometimento severo. A Zona III é a maior área de vascularização e a que apresenta o menor risco de perda de visão quando a ROP estende-se para essa região;
- 2) Extensão – Para descrever a localização das características patológicas, os clínicos e cirurgiões representam a retina como um relógio analógico no qual o número das horas corresponde a uma região (**Figura 4b**).
- 3) Estágio – Dos cinco estágios da ROP, encontramos formas agudas do 1 ao 3. Os estágios determinam a severidade e são identificados pela aparência da retina na junção da região vascular e avascular. Uma linha (estágio 1) ou uma crista (estágio 2, **Figura 4c**) geralmente regressam e pode ocorrer a vascularização da retina em regiões até então avasculares. A neovascularização intravítrea (estágio 3, **Figura 4d**) indica ROP severa. O descolamento parcial (estágio 4, **Figura 4e**) ou total (estágio 5, **Figura 4f**) é associado com mudanças fibrovasculares ou vítreas;
- 4) Doenças Adicionais – Ocorre quando há presença de vasos retinianos dilatados e tortuosos e dois ou mais quadrantes no entorno do nervo óptico (**Figura 4g**). Também indicam ROP severa.

Figura 8. Parâmetros da retinopatia da prematuridade. (a) Representação artística do olho esquerdo mostrando a vascularização da Zona I e as áreas da retina que correspondem às Zonas II e III. (b) Representação artística da retina com a delimitação das horas do relógio, utilizada para localizar as regiões da patologia. O círculo mais interno indicado pela seta amarela representa o equador do globo ocular; o círculo médio indica a *ora serrata*; o círculo mais externo, a parte plana da retina em um adulto. Imagens do olho esquerdo de bebês no (c) estágio 2, com crista, (d) estágio 3, com neovascularização intravítrea apontada pela seta amarela; (e) início do estágio 4 e (f) estágio 5, mostrando descolamento total da retina, com pupila branca. (g) Doenças Adicionais com vasos dilatados e tortuosos em todos os quatro quadrantes no entorno do nervo óptico. **Fonte:** Adaptado e reproduzido de Hartnett, (2010). *Retinopathy of Prematurity*. In: *Encyclopedia of the Eye*, com a permissão de Elsevier.

Há indícios da prevalência da retinopatia da prematuridade estar correlacionada a fatores econômicos e estruturais. Estima-se que em países desenvolvidos e com instalações neonatais adequadas, 5 – 8% dos prematuros apresentarão o quadro, enquanto em países em

desenvolvimento, cerca de 30% dos prematuros desenvolverão a doença (Gergely & Gerinec, 2010). O tratamento padrão é a ablação por laser da periferia avascular da retina e, em casos severos, a crioterapia ainda continua como uma opção (Fulton et al., 2009).

Para que uma modelagem da retinopatia da prematuridade induzida por oxigênio seja válida, ela deve reproduzir as duas fases da doença (vaso-obliteração e subsequente neovascularização), bem como a sua complicação mais frequente, o vazamento vascular (Stahl et al., 2010). Como constatado por Connor et al. (2009), observa-se uma associação entre a vaso-obliteração e a exposição a oxigênio em camundongos, ratos, coelhos, gatos e animais domésticos em geral. Os camundongos são modelos adequados para o estudo da retinopatia da prematuridade, por poderem ser manipulados em pequenos espaços, reproduzirem-se durante todo o ano e possuírem curto período gestacional, com a concepção de uma grande quantidade de filhotes por ninhada, principalmente quando comparados a outros mamíferos (Hedrich, 2012). Sua estrutura retiniana é semelhante à humana (Masland, 2011; Perlman, 2009), apresentando também a vantagem da possibilidade de manipulação genética, pois seu genoma é completamente conhecido (Waterston et al., 2002).

Os primeiros modelos de retinopatia induzida por oxigênio (OIR, sigla em inglês do *oxygen-induced retinopathy*) surgiram nos anos 50 (Gyllenstein & Hellström, 1952; Patz, Eastham, Higginbotham, & Kleh, 1953), focando-se na baixa disponibilização de oxigênio para camundongos neonatos. Graças a grande discussão sobre a patofisiologia da ROP, os achados destes estudos demonstraram que, além da hipóxia do tecido retiniano, a hiperóxia era um fator incitador importante no quadro patológico. O modelo se desenvolveu quando Smith e colaboradores (1994) estabeleceram uma forma de quantificar a neovascularização característica do quadro patológico por meio de contagem manual do número de células de microvasos que invadiam o vítreo em cortes transversais de retina. Atualmente, o modelo de OIR é amplamente estudado por técnicas histológicas, buscando outras formas de quantificação da neovascularização (Kim, D'Amore, & Connor, 2016).

O modelo experimental elencado para esse trabalho é o de retinopatia proliferativa desenvolvida até o 17º dia (Connor et al., 2009). Neste modelo, camundongos são expostos do nascimento até o sétimo dia a 75% de oxigênio, induzindo vaso-obliteração. No décimo segundo dia, a retina avascular responde patologicamente através da neovascularização, que atinge seu pico no 17º dia (**Figura 5**).

Figura 5. Fases de indução da retinopatia da prematuridade em camundongos. Os camundongos neonatos e suas mães amamentadoras são mantidos em ar ambiente desde o nascimento até P7, com desenvolvimento vascular seguindo normal. Em P7, os camundongos são expostos a 75% de oxigênio, o que inibe o crescimento dos vasos retiniais e causando perda de vasos significativa. Os camundongos retornam ao ar ambiente em P12; a retina avascular se torna hipóxica, desencadeando tanto o crescimento vascular normal quanto o patológico. A neovascularização (NV) atinge o seu máximo em P17. Logo em seguida, a NV espontaneamente regressa e a retina atinge a resolução em P25. **Fonte:** Adaptado de Connor et al. (2009). Reproduzido com permissão da Macmillian Publishers Ltd: *Nature Protocols*, Connor et al. (2009), 4, 11, (2009), copyright 2009.

1.4. O Eletrorretinograma

O eletrorretinograma (ERG) é um exame não invasivo que permite avaliar funcionalmente a retina pela mensuração da sua atividade elétrica em resposta a estimulação luminosa (Robson & Frishman, 2014). Acredita-se que arquitetura retiniana dos vertebrados gere fortes correntes extracelulares radiais graças ao circuito paralelo formado pelos tipos celulares arranjados no mesmo sentido. As correntes laterais, formadas pelo processamento lateral das células horizontais e amácrinas, dissipam-se em função das junções comunicantes entre estas células e a alta simetria de suas conexões com células vizinhas (Nusinowitz, 2010; Perlman, 2007).

Aplicando a análise de fontes (*sources*) e drenos (*sinks*) a essas correntes, é possível dividi-las em duas vias: (a) a via local, que se mantém inteiramente na retina; e (b) a via remota, que flui pelo vítreo e os tecidos oculares anteriores, retornando à retina pela esclera, coróide e epitélio pigmentado (Perlman, 2007). A via local pode ser acessada eletrofisiologicamente com o uso de eletrodos extracelulares em camadas específicas da retina, enquanto a via remota pode ser medida com o posicionamento de eletrodos no vítreo e na córnea (**Figura 6**).

Figura 6. Correntes oculares. (A) Via local, que se mantém inteiramente na retina; (B) via remota, que flui pelo vítreo, cristalino, córnea e coróide. No exemplo, o ERG acessa a corrente em sua porção corneana (linha pontilhada). **Fonte:** Adaptado de Goto (2016) e cordialmente cedido pela autora.

Devido à sua origem elétrica e à direção do fluxo das correntes iônicas, a onda obtida no ERG reflete o conjunto de respostas de populações neuronais e gliais como consequência do processamento serial retiniano e a análise dos componentes dessa onda provê informação específica sobre a função desses grupos celulares (Weymouth & Vingrys, 2008). A primeira descrição dos componentes do ERG foi feita por Einthoven e Jolly (1908), mencionando uma deflexão “a” breve e transiente da resposta retiniana que estaria completa antes do começo do componente seguinte “b”, positivo e mais lento. Essa interpretação sequencial do ERG estabeleceu as nomenclaturas das ondas a e b (Robson & Frishman, 2014). Porém, as observações realizadas por Granit (1933) dos efeitos diferenciais dos estados de anestesia induzidos por éter no ERG mostraram que sua forma de onda era fruto do cancelamento de componentes de latências e origens distintas. Apesar de não conseguir determinar o substrato neuronal de cada componente, ele os identificou como PI, PII e PIII (*potentials*) seguindo a ordem na qual desapareciam à medida que estados mais profundos de anestesia eram alcançados (Figura 7a).

As origens retinianas de cada componente foram identificadas ao longo de anos de pesquisa. O PI surge do tamponamento distal de potássio pelo epitélio pigmentado em resposta à hiperpolarização dos fotorreceptores e tem tempo de integração ≥ 500 ms (Wu, Gao, & Pang,

2004). O PII reflete a soma da atividade das células bipolares ON (Stockton & Slaughter, 1989) com entrada das células horizontais (Hanitzsch, Küppers, & Flade, 2004) e tem a participação das bipolares OFF para estímulos breves (<13 ms) em humanos (Kondo et al., 1998)³. No camundongo, o PII é majoritariamente dominado pelas respostas de células bipolares ON (Robson et al., 2004). O PIII divide-se em rápido e lento. O PIII rápido exige estímulos luminosos relativamente altos para que gere um sinal adequado, correspondendo à mudança na corrente escura seguida pela hiperpolarização dos fotorreceptores (Robson & Frishman, 2014). O PIII lento surge da hiperpolarização das células de Müller, que tamponam ions potássio (Wu et al., 2004; Oakley; Green, 1976).

Analisando o ERG sequencialmente (**Figura 7b**), a onda a é a primeira a surgir e é dominada pela fase rápida do PIII, tendo uma latência de 8-30 ms dependendo da espécie e do estado adaptativo da retina. A onda b equivale ao PII, tem latência de 60-200 ms dependendo do estado adaptativo e apresenta potenciais oscilatórios (POs) em sua fase ascendente (Weymouth & Vingrys, 2008), originários dos neurônios da via ON (Wachtmeister, 1998) e dos circuitos inibitórios laterais dos neurônios da retina interna (Möller & Eysteinsson, 2003). A onda c, que não consta na **Figura 7b**, é dominada pelo PI e pela fase lenta do PIII (Perlman, 2007).

O ERG mede a atividade elétrica total da população celular retiniana, sendo sensível a qualquer alteração na funcionalidade desses tipos celulares. Com as altas taxas de respiração e glicólise anaeróbica da retina e a maior demanda por oxigênio durante o desenvolvimento (Gerschman, et. al 1954), os estados hipóxicos presentes na ROP podem gerar efeitos diretos no funcionamento retiniano. Fulton e colaboradores (2001) averiguaram que o nível de comprometimento na sensibilidade e amplitude de respostas dos bastonetes em crianças diagnosticadas com ROP era proporcional a severidade do quadro. Akula e colaboradores (2007) observaram em modelos de ROP em ratos expostos à oxigenação alternada (50%/10% oxigênio) e oxigenação fixa (75% oxigênio) que a sensibilidade dos bastonetes estava comprometida em P20 e que era preditiva na formação de anomalias vasculares, um marco clínico de ROP. Em contrapartida, há indícios de que o quadro de ROP é menos nocivo sobre cones ao se observar que ERGs fotópicos de crianças diagnosticadas com o quadro patológico

³ A hipótese que os fluxos de potássio das células de Müller contribuiriam para a geração do PII perdeu força devido às evidências que Kofuji e colaboradores (2000) encontraram em camundongos *knock-out* para canais de potássio (subunidade Kir4.1), que apresentaram onda b semelhante aos animais controle.

têm respostas semelhantes às de sujeitos saudáveis, sugerindo também a conservação das vias ON e OFF dos cones (Fulton, Hansen; Moskowitz, 2008). A longo prazo, as respostas dos bastonetes mantêm-se persistentemente disfuncionais e há evidências de adaptação da circuitaria pós-receptoral. Nos casos de ROP moderada e grave, há o atraso da maturação dos limiares escotópicos parafoveais e significativo engrossamento das camadas pós-receptorais, com surgimento de cones dismórficos e respectiva atenuação de suas respostas (para uma revisão completa conferir Hansen, Moskowitz, Akula, & Fulton, 2017).

Figura 7. O ERG e seus componentes. (a) Componentes do ERG identificados por Granit em gatos anestesiados. **Fonte:** Adaptado de Granit (1933), *The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve*, Copyright © 1933 por John Wiley & Sons, Inc. Reproduzido com permissão de John Wiley & Sons, Inc. (b) Exemplo de registro obtido em camundongo. A seta vermelha indica o início do estímulo: Três componentes se destacam: 1) a onda a, 2) a onda b e 3) os potenciais oscilatórios, que ocorrem ao longo da onda b.

Quanto aos POs, os modelos de ROP em ratos não oferecem maiores insights sobre o quadro humano. Os registros em animais apresentaram baixas amplitudes de resposta e frequências que não variam com a idade ou modelo implementado. O contrário ocorre com humanos: adultos com histórico de ROP apresentam menores amplitudes de resposta do que sujeitos saudáveis, e crianças com histórico de ROP apresentam maiores amplitudes de resposta do que sujeitos saudáveis (Akula, et. al, 2007).

2. Objetivos

2.1. *Objetivos Gerais*

- a. Dissecar as contribuições dos diferentes tipos de fotorreceptores para as ondas do ERG de camundongos adultos e filhotes.
- b. Verificar se há alterações dos componentes do ERG no modelo animal de retinopatia da prematuridade.

2.2. *Objetivos Específicos*

- a. Registrar relações intensidades-respostas em adultos e filhotes em quatro comprimentos de onda (365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm), para analisar a sensibilidade espectral dos componentes do ERG.
- b. Comparar estes resultados com os obtidos em animais submetidos à câmara hiperbárica para verificar possíveis perdas funcionais no desenvolvimento da retina externa.

3. Material e Métodos

Este trabalho foi uma colaboração entre o Laboratório de Psicofisiologia Sensorial do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (IP-USP) e o grupo do Prof. Dr. Ricardo José Giordano, do Departamento de Bioquímica da mesma universidade, dedicado ao estudo da angiogênese e sua reversão em casos patológicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPUSP (protocolo CEUA nº. 1396140916). A indução de angiogênese em câmara hiperbárica foi realizada nas dependências do Instituto de Química (IQ) da USP, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do mesmo (protocolo 10).

3.1. Animais

Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com as Normas para o Uso de animais em Pesquisa de visão e Oftalmologia, da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). Foram utilizados 122 camundongos isogênicos adultos da linhagem C57BL/6. Os animais foram mantidos no biotério do IQ-USP alojados em gaiolas em ambiente ventilado, com alimentação, ração própria para camundongos e água *ad libitum*. Para a realização dos ERGs, os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Psicologia Experimental do IP-USP, onde foram alojados em estante ventilada, com alimentação, ração para camundongos (Nutrivial) e água *ad libitum*. Em ambos os biotérios, as salas possuíam sistema de exaustão de ar. A troca de maravalha e limpeza das gaiolas foram realizadas duas vezes por semana por pessoal treinado. No máximo cinco camundongos foram alojados por gaiola.

Os camundongos foram divididos em dois grupos:

- a. *Controle*: Os animais foram avaliados em P17 ($n = 32$), P30 ($n = 26$) e $\geq$ P60 ($n = 44$) com ERGs com estimulação em quatro comprimentos de onda (365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm) para avaliação da atividade funcional da retina ao longo do desenvolvimento, não passando por nenhuma manipulação experimental adicional;
- b. *Experimental*: Os animais foram submetidos à hiperoxigenação para indução da angiogênese e avaliados com ERGs com estimulação em 459 nm em P17 ($n = 7$), P30 ($n = 6$) e P60 ($n = 7$), para acompanhar o desenvolvimento retiniano.

Para indução da angiogênese no grupo *experimental*, camundongos fêmeas C57BL/6 com seus filhotes recém-nascidos de 7 dias (P7) foram mantidos numa câmara alimentada com oxigênio 75% e nitrogênio 25% durante 5 dias nas dependências do biotério do IQ-USP,

conforme protocolo pré-estabelecido na literatura (Connor et al., 2009; Stahl et al., 2010). Os animais foram mantidos nesta câmara com água e alimento suficientes para os cinco dias, sendo então retirados da câmara, retornando para o ar ambiente e mantidos no biotério do IQ-USP até P16, quando foram transferidos para o biotério do Departamento de Psicologia Experimental do IP-USP.

3.2. Eletrorretinograma

Para o registro eletrofisiológico, os animais foram previamente adaptados ao escuro na sala de experimentação por pelo menos duas horas. Sob luz vermelha ($\lambda = 780$ nm, 6,44 cd/m², Viking b, Startec & Co., Brasil), eles foram anestesiados com doses proporcionais à idade e peso através de injeção intraperitoneal de quetamina 10% (Adultos e P30 = 100 mg/kg; P17) associada a xilazina 2% (Adultos e P30 = 5 mg/kg; P17 = 2 mg/kg), diluídas 10x em solução salina estéril. Uma dose suplementar de quetamina 10% (Adultos e P30 = 100 mg/kg; P17 = 80 mg/kg) foi administrada quando necessário.

Os animais foram posicionados sobre um refratário com um circulador de água morna (39° C) para a manutenção da temperatura corpórea localizado em frente a um estimulador de campo total (Ganzfeld Q450 SC, Roland Consult, Alemanha). Sobre esse refratário, a cabeça do animal foi imobilizada com auxílio de um suporte plástico confeccionado por nós, facilitando a instalação dos eletrodos.

Com o auxílio de óculos infravermelhos (Night Cougar, ATN, Estados Unidos da América), uma gota de proximetacaína 0,5% foi depositada sobre as córneas do animal para sua anestesia, sendo secada com um lenço de papel para trabalhos delicados após 3 minutos. Posteriormente uma gota de fenilefrina 10%⁴ foi depositada para a dilatação pupilar e secada após 3 minutos. Durante esses intervalos, um eletrodo agulha terra foi posicionado subcutaneamente na base da cauda e dois referências na região dorsal da cabeça, paralelamente às orelhas. Com os olhos anestesiados, eletrodos ativos aneliformes de filamento de ouro foram posicionados, seguido da aplicação de uma gota de solução salina 0,9% e uma gota de metilcelulose 2% para a proteção de cada olho. A **Tabela 1** apresenta valores de impedância e peso médios ($\pm$ SD) encontrados para cada idade dos animais no grupo controle.

⁴ Inicialmente, a dilatação pupilar era induzida pela aplicação de tropicamida 1%, porém foi observado que em alguns animais ocorria o inchaço das pálpebras e consequente obstrução no posicionamento dos eletrodos ativos. Para contornar isso, adotamos a fenilefrina 10%.

Tabela 1. Impedância e peso médios ($\pm$ SD) para animais em P17, P30 e $\geq$ P60 (grupo controle).

Idades	Eletrodo Ativo (K Ω)	Eletrodo Referência (K Ω)	Peso (g)
P17 ($n = 32$)	$10 \pm 1,27$	$3,57 \pm 0,42$	$7,56 \pm 0,78$
P30 ($n = 26$)	$7,80 \pm 1,07$	$2,82 \pm 0,41$	$15,68 \pm 1,41$
$\geq$ P60 ($n = 44$)	$6,75 \pm 0,74$	$2,63 \pm 0,25$	$32,17 \pm 5,47$

Pulsos luminosos de intensidades crescentes em comprimentos de ondas distintos (365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm) foram gerados pelo estimulador controlado por um sistema automatizado (RetiPort, Roland Consult, Alemanha) que também amplifica e digitaliza os dados. As sessões de registro duraram de 40 a 60 minutos. Detalhes do protocolo experimental são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Intensidades, intervalos e repetições utilizados no presente estudo para o ERG escotópico em 365 nm, 459 nm, 525 nm e 635 nm.

365 nm			459 nm			525 nm			635 nm		
Intensidade (log quanta*s ⁻¹ *μm ⁻²)	Intervalo (s)	Repetições	Intensidade (log quanta*s ⁻¹ *μm ⁻²)	Intervalo (s)	Repetições	Intensidade (log quanta*s ⁻¹ *μm ⁻²)	Intervalo (s)	Repetições	Intensidade (log quanta*s ⁻¹ *μm ⁻²)	Intervalo (s)	Repetições
-3,23	5	30	-2,01	5	30	-2,36	5	30	*	*	*
-2,78	5	30	-1,52	5	30	-1,94	5	30	*	*	*
-2,25	5	30	-1,00	5	30	-1,45	5	30	-1,77	5	30
-1,77	5	30	-0,48	5	30	-0,96	5	30	-1,30	5	30
-1,28	5	30	0,03	5	15	-0,48	5	15	-0,80	5	15
-0,77	5	30	0,55	10	15	0,01	10	15	-0,30	10	15
-0,28	5	30	1,06	20	10	0,49	20	10	0,19	20	10
0,21	10	15	1,05	30	10	0,55	30	10	0,68	30	10
0,71	20	15	1,56	30	5	1,03	30	5	1,17	30	5
1,20	30	10	2,04	30	5	1,47	30	5	2,08	30	5
1,69	30	10	2,56	40	5	1,95	40	5	2,57	40	5
2,18	40	5	3,07	40	5	2,44	40	5	3,06	40	5
2,68	40	5	3,59	50	5	2,92	50	5	3,56	50	5
3,17	40	5	4,09	50	5	3,39	50	5	4,03	50	5

* Não há estímulos luminosos nestas intensidades por limitações do estimulador.

3.3. Análise de Dados

Registros eletrofisiológicos foram tratados com rotinas programadas em Origin (OriginLab, EUA). Um filtro digital *notch* em 60 Hz foi utilizado para eliminação de eventuais ruídos advindos da rede elétrica. Para maior precisão na aferição da onda b, foi utilizado um filtro digital passa-baixa em 60 Hz; para os potenciais oscilatórios, corriqueiramente presentes em intensidades mais altas, foi utilizado um filtro digital passa-alta com *cutoff* em 120 Hz. A onda a foi medida diretamente nos dados brutos. Os traços filtrados foram zerados e as seguintes variáveis medidas (**Figura 8**):

Figura 8. Variáveis Medidas. (a) Variáveis medidas no registro eletrorretinográfico de camundongo. A seta vermelha indica o início do estímulo. Os componentes destacados são: (1) A onda a, com amplitude e latência destacada pelas setas azuis claras; (2) a onda b, com amplitude e latência destacada pelas setas azuis escuras; (3) os potenciais oscilatórios (POs), que ocorrem ao longo da onda b. (b) Exemplo de potenciais oscilatórios separados pelo filtro digital passa-alta de 120 Hz, destacando a medição do pico de maior amplitude e sua latência. A seta vermelha indica o início do estímulo.

- Amplitude da *onda a*, medida no vale de resposta em relação à linha de base;
- Latência da *onda a*, medida do tempo transcorrido entre o início do estímulo e o vale da resposta em relação à linha de base;
- Amplitude da *onda b*, medida no pico de resposta em relação ao vale da onda a;
- Latência da *onda b*, medida do tempo transcorrido entre o início do estímulo e o pico da resposta.
- Amplitude do *potencial oscilatório*, medida no maior pico de resposta entre os potenciais oscilatórios filtrados;

f) Latência do *potencial oscilatório*, medida do tempo transcorrido entre o início do estímulo e o maior pico de resposta entre os potenciais oscilatórios filtrados.

A relação entre as variáveis medidas e as intensidades dos estímulos (relação resposta-intensidade) pode ser descrita matematicamente por uma variação da função hiperbólica de Michaelis-Menten, a *equação de Hill* (Boynton & Whitten, 1970; Naka & Rushton, 1966):

$$V = V_{max} \frac{I^n}{k^n + I^n} \quad (1)$$

na qual V_{max} é a amplitude máxima da resposta, k é a intensidade necessária para obtenção de 50% de V_{max} ⁵, n é o coeficiente de *Hill*, descrito pela inclinação da curva e indicando o grau de cooperação entre estímulo e resposta, e I são as intensidades usadas nos estímulos. Nesse trabalho, foi implementada uma descrição da equação de Hill que considera o valor inicial nos cálculos de V_{max} e proporcionou um ajuste mais condizente com a estrutura dos dados obtidos:

$$V = V_i + (V_f - V_i) \frac{I^n}{k^n + I^n} \quad (2)$$

e

$$V_{max} = V_f - V_i \quad (3)$$

onde V_i é o valor mínimo inicial da resposta e V_f é o valor final máximo da amplitude da resposta. Nesse caso, V_{max} é entendido como a diferença entre V_f e V_i . Pela relação dessas variáveis, é possível determinar a forma da curva resposta-intensidade ao longo do eixo de intensidade, podendo-se assim estimar a sensibilidade da retina e dos neurônios subjacentes às respostas medidas (**Figura 9**). Os parâmetros obtidos com o ajuste matemático, V_{max} , k e n , foram comparados entre grupos através de ANOVAs de uma via e Testes T de Student bicaudais com correção de Bonferroni.

⁵ A variável k é usada neste trabalho como uma estimativa de limiar de resposta para fins do cálculo da sensibilidade, que é definida como o inverso do limiar. Assim, em nosso estudo, $Sensibilidade = \frac{1}{k}$.

Figura 9. A curva de Hill. Ilustração gráfica representando a relação intensidade-resposta montada através da equação de Hill. Os pontos negros são amplitudes de resposta da onda b do ERG de um camundongo do grupo controle para estimulação luminosa em 459 nm. A sigmoide pontilhada exemplifica uma curva de Hill, com valor de intensidade para semi-saturação k , inclinação da curva n , resposta inicial mínima V_i e final máxima V_f .

4. Resultados

4.1 O ERG Murino Escotópico de Animais Adultos

Para analisar a contribuição dos fotorreceptores para a faixa operacional da retina murina em níveis escotópicos e mesópicos, ERGs foram coletados em diversos comprimentos de onda. Na **Figura 10**, encontram-se amostras de respostas típicas de quatro animais distintos para estimulação luminosa com pico de emissão em 365 nm (**Figura 10a**), 459 nm (**Figura 10b**), 525 nm (**Figura 10c**) e 635 nm (**Figura 10d**). Cada traço equivale à média das respostas obtidas de 5 a 30 apresentações. A primeira resposta observada ao longo das estimulações é a onda b, surgindo primeiro nas estimulações em 459 nm (-2,01 log) e posteriormente em 365 nm (-1,77 log), 525 nm (-0,96 log) e 635 nm (0,68 log). A onda a surge somente em intensidades mais altas, sendo observada primeiro em 525 nm (1,03 log) e posteriormente em 459 nm (1,05 log), 365 nm (1,69 log) e 635 nm (2,08 log). Os POs, por sua vez, surgem entre a onda a e b em intensidades intermediárias, sendo observados primeiro em 459 nm (-0,48 log) e posteriormente em 365 nm (-0,28 log), 525 nm (0,01 log) e 635 nm (2,08 log).

A diferença de sensibilidade e amplitude entre as ondas a e b advém do tipo celular que está majoritariamente contribuindo para cada uma. A onda b é dominada pela atividade das células bipolares *ON*; sua alta sensibilidade provavelmente advém da sua cascata bioquímica interna, que amplifica o sinal dos bastonetes com os quais estas células bipolares fazem contato (Taylor & Smith, 2004). Como esse tipo de fotorreceptor é adaptado para baixos níveis de estimulação luminosa (Baylor, 1996; Ingram, Sampath, & Fain, 2016) e tem pico de sensibilidade espectral em 498 nm (Toda et al., 1999), as ondas b registradas nas primeiras intensidades em 459 nm refletem, portanto, a atividade dos bastonetes. A onda a é composta pelas respostas dos fotorreceptores e é suplantada nas primeiras intensidades pelas grandes amplitudes da onda b. Destaca-se apenas em altas intensidades, quando a via dos bastonetes já se encontra saturada e a atividade dos cones se inicia (Abd-El-Barr et al., 2009). Os POs refletem os fluxos radiais dentro da retina gerados pelos circuitos de retroalimentação negativa iniciados pelas células amácrinas (Wachtmeister, 1998). O fato destes surgirem em intensidades intermediárias deve-se provavelmente ao aumento proporcional desta modulação em função da intensidade luminosa crescente.

Outro aspecto a se notar na **Figura 10** é que a onda a, b e POs ficam mais rápidos (menor latência) em maiores intensidades. Isso é resultado das maiores amplitudes de respostas que os fotorreceptores e neurônios de segunda-ordem manifestam com o aumento da

intensidade luminosa, levando à aceleração de suas respostas pela ativação de suas correntes dependentes de voltagem, (Barnes & Hille, 1989; Detwiler, Hodgkin, & McNaughton, 1980; Joselevitch, Klooster, & Kamermans, 2017) . Com isso, há maior rapidez e eficiência na transmissão sináptica, e parte da redundância temporal contida nas respostas dos fotorreceptores é eliminada, uma vez que, nestas intensidades, há fótons suficientes para gerar um sinal robusto. Assim, apenas em intensidades menores faz-se necessário integrar fótons por longos períodos (Balasubramanian & Sterling, 2009).

A **Figura 11** mostra as relações intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) para a onda a (**Figura 11a**), onda b (**Figura 11b**) e POs (**Figura 11c**), obtidas de animais com ≥ 60 dias de vida para todos os comprimentos de onda testados. Em todos os gráficos apresentados na figura, as amplitudes de resposta de cada onda são plotadas com o mesmo código de cores: (1) em roxo, amplitudes de resposta para estimulação luminosa em 365 nm ($n = 6$); (2) em azul, amplitudes de resposta para estimulação em 459 nm ($n = 17$); (3) em verde, amplitudes de resposta para estimulação em 525 nm ($n = 15$), e; (4) em vermelho, amplitudes de resposta para estimulação luminosa em 635 nm ($n = 6$). As amplitudes das ondas a, b e POs são similares para os diferentes protocolos de estimulação, mas há diferenças em sua sensibilidade absoluta para os comprimentos de onda testados.

Observa-se um platô de saturação entre 0,5 log e 2,5 log nos registros da onda b realizados com estimulação em 365 nm, 459 nm e 525 nm, e entre 3,0 log e 4,0 log nos registros realizados em 635 nm. Este platô é seguido de uma segunda fase ascendente que não atinge saturação para as intensidades de estimulação disponíveis em nosso equipamento. As intensidades nas quais este platô ocorre correspondem àquelas nas quais surgem os primeiros registros da onda a. Robson e Frishman (1996) sugerem que este platô advém de uma interferência destrutiva entre a onda a incipiente e a onda b. Outra explicação possível seria a ocorrência concomitante de saturação da via dos bastonetes e o início da ativação da via dos cones, caracterizando uma fase mesópica (Abd-El-Barr et al., 2009).

Figura 10. O ERG de animais controle em $\geq P60$. ERG escotópico de 4 camundongos $\geq P60$ submetidos a passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em $\log \text{fótons} \cdot s^{-1} \cdot \mu m^{-2}$ à esquerda de cada traço) em (a) 365 nm, (b) 459 nm, (c) 525 nm e (d) 635 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação. Algumas respostas foram omitidas para melhor visualização.

Figura 11. Relações intensidade-resposta médias do ERG murino em animais controle $\geq P60$. Relações intensidade-resposta médias ($\pm SE$) da (a) onda a, (b) onda b e (c) POs para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 6$), 459 nm (azul, $n = 17$), 525 nm, (verde, $n = 15$) e 635 nm, (vermelho, $n = 6$).

Ajustes matemáticos até o primeiro platô de saturação das ondas b apresentadas na **Figura 11** foram realizados para cálculo da sensibilidade espectral de cada componente do ERG. Esta análise só é possível para a onda b, por ser a única a atingir um platô de saturação. As relações de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) junto com o respectivo ajuste matemático encontram-se plotados na **Figura 12**. As amplitudes da onda b são identificadas pelos símbolos e as linhas sólidas representam a média dos ajustes para estimulação em 365 nm (linha roxa, **Figura 12a**), 459 nm (linha azul, **Figura 12b**), 525 nm (linha verde, **Figura 12c**) e 635 nm (linha vermelha **Figura 12d**). O conjunto dos parâmetros $V_{\max}$, k e n obtidos individualmente são apresentados na **Figura 13**, que segue o mesmo esquema de cores e o tracejado apresenta o valor médio.

Figura 12. Ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle $\geq$ P60. Ajuste matemático realizado sobre a onda b ($\pm$ SE) até o platô de saturação para estimulação em (a) 365 nm (linha roxa, $n = 12$), (b) 459 nm (linha azul, $n = 34$), (c) 525 nm (linha verde, $n = 30$) e (d) 635 nm (linha vermelha, $n = 12$). Os símbolos negros não foram considerados para o ajuste.

Figura 13. Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle $\geq P60$. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes de Hill realizados individualmente para cada olho sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 12$), 459 nm (azul, $n = 33$), 525 nm (verde, $n = 24$) e 635 nm (vermelho, $n = 9$), como ilustrado na **Figura 12**. As linhas pontilhadas indicam os valores médios.

A **Tabela 3** apresenta os valores obtidos nos ajustes da **Figura 12**. Os valores de $V_{\max}$ foram semelhantes para estimulação em 365 nm (558,62 μV), 525 nm (505,43 μV) e 635 nm (511,82 μV) e cerca de 100 μV menores para 459 nm (428,28 μV). A diferença em 459 nm deve ser ponderada considerando que a amplitude de resposta é o parâmetro mais suscetível a artefatos, principalmente pelo registro depender do posicionamento do eletrodo e este mudar conforme o tamanho do animal. O grau de cooperação entre o estímulo (n) e a resposta foi equivalente para todos os comprimentos de onda, enquanto a semi-saturação (k) foi atingida mais cedo com a estimulação em 459 nm (-0,41 log), seguida por 525 nm (0,17 log), 365 nm (0,15 log) e 635 nm (0,85 log).

Tabela 3. Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em $\geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	$V_{\max}$ (μV)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. $F > F_{\text{crit.}}$ *
365	558,62	0,15	0,70	0,33	0,99	272,74	$6,78 \cdot 10^{-7}$
459	428,21	-0,41	0,71	0,02	0,99	688,89	$5,82 \cdot 10^{-7}$
525	505,43	0,17	0,71	0,09	0,99	293,28	$2,15 \cdot 10^{-8}$
635	511,82	1,47	0,85	0,22	0,99	332,06	$4,68 \cdot 10^{-7}$

* O valor F nesse caso indica a comparação entre o modelo ajustado contra um modelo ingênuo que tem suas variáveis independentes zeradas. Se F for maior que o F crítico, então o modelo ajustado é diferente do modelo ingênuo.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Analisando o k obtido nos ajustes individuais em cada comprimento de onda, calculamos a sensibilidade espectral da onda b, para delimitar as contribuições dos diferentes tipos de fotorreceptores para esta onda no ambiente escotópico. Apesar de existirem trabalhos sobre a sensibilidade espectral da onda b escotópica do camundongo (para exemplos, ver Abd-El-Barr et al., 2009; Robson et al., 2004; Saszik, Robson, & Frishman, 2002), a análise das respostas escotópicas para estimulação em 365 nm é inédita. Na **Figura 14** são apresentados esses valores ($\pm \text{SD}$) normalizados (círculos negros) e plotados sobre o nomograma baseado nos trabalhos de Dartnall (1953) e Jacobs, Neitz e Deegan (1991) (**Figura 14a**) e outro baseado em Mooij e van den Berg (1983), ambos ajustados para os picos de sensibilidade espectral do

camundongo⁶. As linhas sólidas representam o espectro de absorção para cada fotorreceptor: bastonetes em negro (pico em 498 nm), cones S em roxo (pico em 360 nm) e cones M em verde (pico em 509 nm). A sensibilidade espectral da onda b ajusta-se relativamente bem à absorbância da rodopsina (linha sólida negra), sugerindo que em todos comprimentos de onda testados, os bastonetes são a contribuição dominante até o primeiro platô de saturação.

Entretanto, os dados em 525 nm não se ajustam perfeitamente a nenhum dos dois nomogramas. Uma possível causa para essa variabilidade pode ser a indução de artefatos pela técnica de posicionamento dos eletrodos, que afeta diretamente a qualidade do sinal, gerando menores amplitudes da onda b e diminuição de POs. Também tivemos dificuldades com a calibração do equipamento, que apenas permitia programar o protocolo em candelas e afetou diretamente na elaboração dos passos de intensidade.

Figura 14. Sensibilidade espectral do ERG murino de animais controle em $\geq P60$. As linhas representam a absorbância dos fotorreceptores murinos: bastonetes em preto (pico em 498 nm), cones S em roxo (pico em 360 nm) e cones M em verde (pico em 509 nm). Os símbolos representam os valores de sensibilidade ($\pm$ SD) medidos em $\geq P60$ (círculos pretos) para estimulação em 365 nm ($n = 6$), 459 nm ($n = 17$), 525 nm ($n = 14$) e 635 nm ($n = 6$). Em (a) encontram-se os dados ajustados sobre o nomograma pautado em Dartnall (1953) e Jacobs, Neitz e Deegan (1991) e em (b) os nomogramas adaptados de Mooij e van den Berg (1983).

⁶ Utilizamos aqui o nomograma para pigmentos visuais baseados em vitamina A2 de Mooij e van den Berg (1983), porque os nomogramas para pigmentos visuais baseados em vitamina A1 pautados nos trabalhos de Dartnall (1953) e Jacobs, Neitz e Deegan (1991) não descrevem bem o espectro de absorção dos fotorreceptores do camundongo C57BL/6. Isso provavelmente ocorre porque a alta densidade de pigmento visual nos fotorreceptores do camundongo altera a probabilidade de absorção em comprimentos de onda longos (Toda et al., 1999).

Uma vez que os maiores contribuintes para a onda a são os fotorreceptores e para a onda b as células bipolares *ON* (Robson et al., 2004; Weymouth & Vingrys, 2008), a relação entre as amplitudes da onda a e da onda b reflete a integridade funcional desses tipos celulares e sua transmissão de sinal (Perlman, 1983). Esta relação é mostrada na **Figura 15**, que relaciona estas amplitudes para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul) e 525 nm (verde) em $\geq P60$ ⁷. A linha preta sólida representa o ajuste de uma regressão linear ($y = ax + b$), que explicita a razão entre a onda a e b com o valor de inclinação (a).

Figura 15. Relação onda a versus onda b de ERG murino de animais controle em $\geq P60$.

Símbolos representam a relação entre as amplitudes da onda a e b obtidas com estimulação em 365 nm ($n = 12$), 459 nm ($n = 27$) e 525 nm ($n = 25$). A linha sólida é uma regressão linear de forma $y = ax + b$, com $a = 0,4$, $b = 1,47$ e $R^2 = 0,78$.

As relações para todos os comprimentos de onda se distribuíram uniformemente ao longo de uma única regressão linear de inclinação de 0,4 ($R^2 = 0,78$), sugerindo que o mesmo conjunto celular está respondendo nessas intensidades para todos comprimentos de onda testados. Pelas respostas se localizarem após o platô de saturação, possivelmente os principais contribuintes para essas intensidades são os cones. Há evidências na literatura com registros de ERG em camundongos geneticamente modificados (Abd-El-Barr et al., 2009) e intracelulares

⁷ Os resultados para estimulação em 635 nm não foram utilizados porque quase não há onda a neles.

(Nikonov, Kholodenko, Lem, & Pugh Jr, 2006; Pang, Gao, & Wu, 2004) que demonstram que os bastonetes já se encontram saturados nas intensidades equivalentes ao platô de saturação e que os cones M e S estão começando a responder logo em seguida.

A aceleração da cinética da resposta com o aumento da intensidade luminosa pode ser observada na **Figura 16**, que resume as médias ($\pm$ SE) das latências da onda a (**Figura 16a**), onda b (**Figura 16b**) e POs (**Figura 16c**) dos animais do grupo controle em $\geq$ P60 em função da intensidade de estimulação. Os gráficos seguem o mesmo esquema de cores da **Figura 11**, com as respostas em 365 nm em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. Observe-se a sobreposição das latências de resposta para estimulação em 365 nm, 459 nm e 525 nm, e latências maiores para a estimulação em 635 nm. Essa diferença entre as latências de resposta para estimulação em diferentes comprimentos de onda pode ser fruto da ausência na retina do camundongo de fotorreceptores maximamente sensíveis para comprimentos de onda longos. Como as respostas à luz de cones e bastonetes obedecem ao Princípio da Univariância (Naka & Rushton, 1966), o efeito da absorção de um fóton em um fotorreceptor é sempre o mesmo, independente do comprimento de onda, alterando-se somente a probabilidade da absorção de fótons pelo fotopigmento em função do comprimento de onda. Assim, a probabilidade de resposta é menor para estimulação em 635 nm e o processo de integração dos fótons absorvidos é mais lento. Por outro lado, a sobreposição das respostas nos outros comprimentos de onda é justificada pela presença de fotorreceptores com picos de sensibilidade espectral próximos à estimulação utilizada.

Além das intensidades em que ocorrem, o tempo de resposta das ondas a (**Figura 16a**) e da onda b (**Figura 16b**) também podem ajudar a identificar qual o tipo neuronal respondendo. É sabido mamíferos têm bastonetes com tempo de resposta de 150-200 ms (Baylor, Nunn, & Schnapf, 1984), enquanto que cones apresentam latências de 10-35 ms (Schneeweis & Schnapf, 1995). As respostas da onda a observadas flutuaram entre 10 e 37 ms, correspondendo ao exato intervalo observado em cones, sugerindo que as ondas a registradas são compostas pelas atividades de cones.

Figura 16. Aumento na velocidade das respostas médias do ERG murino em $\geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para (a) onda a, (b) onda b e (c) POs do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 6$), 459 nm (azul, $n = 17$), 525 nm, (verde, $n = 15$) e 635 nm, (vermelho, $n = 6$).

Buscando descrever a dinâmica complexa das latências médias da onda b, foi implementado o mesmo ajuste matemático com a variante da função de *Hill* que considera o valor inicial e final da curva para o cálculo de k e n . O gráfico encontra-se plotado na **Figura 16**, seguindo o mesmo esquema de cores anterior, com as respostas em 365 nm em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. A linha sólida representa o ajuste matemático obtido e a **Tabela 4** resume os parâmetros obtidos. O ajuste para 635 nm precisou ter o n fixado no valor equivalente ao do azul para que o algoritmo de Levenberg-Marquardt utilizado para realização dos *fits* convergisse.

Os valores iniciais e finais para a estimulação para todos os comprimentos de onda foram próximos. Entretanto, os valores de k para 459 nm (0,66 log) foram menores que os de 365 nm (0,91 log) e 535 nm (0,99 log), como esperado em função dos dados apresentados na **Figura 11**. A estimulação em 635 nm apresentou o maior k (2,62 log) possivelmente em função da baixa sensibilidade dos fotorreceptores do camundongo a esse comprimento de onda. O n para estimulação em 365 nm (1,38) e 459 nm (1,39) foram semelhantes, enquanto foi bem maior para 525 nm (2,81) e precisou ser fixado no valor equivalente ao da estimulação em 459 nm para a estimulação em 635 nm.

Figura 17. Ajuste matemático do aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG murino em $\geq P60$ para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm SE$) das latências para onda b do ERG murino. As linhas representam o ajuste matemático realizado sobre os dados para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 6$), 459 nm (azul, $n = 12$), 525 nm, (verde, $n = 6$) e 635 nm, (vermelho, $n = 6$).

Tabela 4. Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em $\geq$ P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	Início (ms)	Final (ms)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. $F > F_{crit.}$
365	104,56	64,65	0,91	1,38	0,28	0,97	2491,51	$5,83 \cdot 10^{-11}$
459	102,16	57,97	0,66	1,39	0,05	0,99	6455,34	$1,11 \cdot 10^{-16}$
525	103,06	61,44	0,99	2,81	0,16	0,99	6241,21	$7,19 \cdot 10^{-11}$
635	104,40	63,10	2,62	1,39*	0,83	0,90	607,69	$1,08 \cdot 10^{-5}$

* O n foi fixado no valor da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

4.2 O ERG Murino Escotópico ao Longo do Desenvolvimento

Com os protocolos de estimulação bem estabelecidos e sabendo que as respostas obtidas até o primeiro platô de saturação em animais controle em $\geq$ P60 são dominadas pelos bastonetes, buscou-se estudar quais alterações ocorriam ao longo do desenvolvimento (entre P17 e P60) que poderiam afetar as análises futuras dos animais experimentais. Na **Figura 18** e **19**, encontram-se as respostas típicas de quatro animais controle distintos em P17 e P30, respectivamente, para estimulação em 365 nm (**Figura 18a** e **Figura 19a**), 459 nm (**Figura 18b** e **Figura 19b**), 525 nm (**Figura 18c** e **Figura 19c**) e 635 nm (**Figura 18d** e **Figura 19d**). Cada traço equivale à média das respostas obtidas para 5 a 30 apresentações. As respostas em animais P17 e P30 seguem as mesmas características dos animais em $\geq$ P60, com a onda b surgindo primeiro em 459 nm. A aceleração das respostas em maiores amplitudes também ocorre em todos os componentes do ERG.

A **Figura 20** mostra as relações intensidade-reposta médias ($\pm$ SE) da onda a de animais controle em P17 (**Figura 20a**), P30 (**Figura 20b**) e $\geq$ P60 (**Figura 20c**) para todos os comprimentos de onda testados. O mesmo código de cores da **Figura 11** foi utilizado, com amplitudes de resposta para estimulação em 365 nm em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. A **Tabela 5** resume o número de animais que integraram cada grupo de idade. As amplitudes da onda a foram similares em todas as idades, sugerindo que os fotorreceptores do animal já estão funcionais em P17, e que os mesmos tipos de fotorreceptores contribuem para esta onda em todas as idades. De fato, os animais em P10 já apresentam os fotorreceptores quase maduros e devidamente posicionados (Rich, Zhan, & Blanks, 1997) e,

antes de P21, os fotorreceptores já estão do tamanho dos de um animal adulto (Smith et al., 2002).

A **Figura 21** apresenta as relações intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) da onda b de animais controle em P17 (**Figura 21a**), P30 (**Figura 21b**) e $\geq$ P60 (**Figura 21c**) para todos os comprimentos de onda testados. As amplitudes de resposta para estimulação em 365 nm estão representadas em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. As amplitudes da onda b foram similares em todas as idades, e o mesmo platô de saturação seguido de uma segunda fase ascendente que não atingiu saturação também foi observado em todas as idades.

As relações de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) para os POs registrados nas três idades são apresentadas na **Figura 22**. O código de cores para amplitudes obtidas em cada estimulação utilizada respeita o mesmo padrão anterior, com 365 nm representado em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. Observou-se que ao longo do desenvolvimento dos animais, as amplitudes para todos os comprimentos de onda aumentaram. Entretanto, os registros em 635 nm se mantiveram menores do que os demais, devido à baixa sensibilidade dos fotorreceptores do camundongo para este comprimento de onda. As amplitudes dos POs foram similares em todas as idades. O conjunto dos achados para onda a, b e POs sugere que a circuitaria retiniana escotópica dos animais já está madura em P17.

Figura 18. O ERG de animais controle em P17. ERG escotópico de 4 camundongos em P17 submetidos a passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à esquerda de cada traço) em (a) 365 nm, (b) 459 nm, (c) 525 nm e (d) 635 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação. Algumas respostas foram omitidas para melhor visualização.

Figura 19. O ERG de animais controle em P30. ERG escotópico de 4 camundongos P30 submetidos a passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à esquerda de cada traço) em (a) 365 nm, (b) 459 nm, (c) 525 nm e (d) 635 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação. Algumas respostas foram omitidas para melhor visualização.

Figura 20. Relações intensidade-resposta médias para onda a do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60. Relações intensidade- resposta médias ($\pm$ SE) da onda a do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm, (verde) e 635 nm, (vermelho). (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq$ P60.

Tabela 5. Número de animais de cada idade testados com os diferentes comprimentos de onda utilizados no grupo controle

Comprimento de onda (nm)	P17	P30	$\geq$ P60
365	6	6	6
459	8	6	17
525	10	7	15
635	8	7	6

Figura 21. Relações intensidade-resposta médias para onda b do ERG murino de animais controle em P17, P30 e ≥P60. Relações intensidade- resposta médias ($\pm$ SE) da onda b do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm, (verde) e 635 nm, (vermelho). (a) P17, (b) P30 e (c) ≥P60.

Figura 22. Relações intensidade-resposta médias para os POs do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60. Relações intensidade- resposta médias ($\pm$ SE) dos POs do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm (verde) e 635 nm (vermelho). (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq$ P60.

A **Figura 23** apresenta as relações de intensidade-resposta médias normalizadas ($\pm$ SE) para onda b dos animais em P17, P30 e $\geq$ P60. Cada comprimento de onda foi normalizado conforme o primeiro platô de saturação. Houve sobreposição das respostas em todas as idades para a estimulação em 365 nm (**Figura 23a**), 525 nm (**Figura 23c**) e 636 nm (**Figura 23d**). Para estimulação em 459 nm (**Figura 23b**), as respostas dos animais em P17 foram ligeiramente menos sensíveis na faixa escotópica do exame em comparação aos animais em P30 e $\geq$ P60 (0,35 log).

Figura 23. Relações intensidade-resposta médias normalizadas para ondas b do ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq$ P60. Relações intensidade- resposta médias normalizadas ($\pm$ SE) das ondas b do ERG murino de animais em P17, P30 e P60 para estimulação em (a) 365 nm (roxo), (b) 459 nm (azul), (c) 525 nm, (verde) e (d) 635 nm (vermelho).

Buscando identificar possíveis alterações na sensibilidade espectral ao longo do desenvolvimento, realizamos ajustes de Hill às amplitudes da onda b nas diversas idades. A

Figura 24 apresenta os ajustes (linhas sólidas) realizados até o primeiro platô de saturação das ondas b obtidas para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 535 nm (verde) e 635 nm (vermelho) para animais controle em P17 (**Figura 24a**), P30 (**Figura 24b**) e $\geq$ P60 (**Figura 24c**). As relações de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) das ondas b encontram-se representadas pelos símbolos na respectiva cor do comprimento de onda utilizado para estimulação. Os parâmetros obtidos individualmente em cada ajuste para animais em P17 encontram-se na **Figura 25** e para animais em P30 na **Figura 26**. Ambas as figuras seguem o mesmo esquema de cores anteriormente apresentado, com as linhas tracejadas indicando os valores médios para cada estimulação, e os valores dos animais em $\geq$ P60 são apresentados em tons escuros para melhor comparação. As **Tabelas 6 e 7** resumem os parâmetros obtidos nos ajustes da **Figura 24**. O ajuste para a estimulação em 635 nm tiveram o n fixado no mesmo valor que o obtido em 459 nm, isso só é possível porque se está registrando a atividade majoritária de bastonetes e é esperado o mesmo grau de cooperação entre o estímulo e a resposta similares para todos os comprimentos de onda testados.

Os valores obtidos nos ajustes matemáticos individuais das **Figuras 13, 25 e 26** foram organizados em função da idade do animal e apresentados na **Figura 27** seguindo a mesma convenção de cores. Observou-se que os valores médios ($\pm$ SD) da amplitude máxima ($V_{\max}$) ao longo do desenvolvimento seguiram padrões semelhantes para todas as cores, com valores menores em P17, um pico em P30 e redução em $\geq$ P60. Não foram encontradas diferenças no limiar de semi-saturação para estimulações em 365 nm, enquanto que os valores em 635 nm em $\geq$ P60 se mostraram menores em relação a P17 e P30. Os valores de k foram consistentemente menores em P17 para estimulação em 459 nm e 525 nm quando comparados aos animais em P30 (459 nm, $p = 0,0001$; 525 nm, $p = 0,02$) e $\geq$ P60 (459 nm, $p < 0,0001$; 525 nm, $p < 0,001$). O grau de cooperação n , por sua vez, foi menor somente para as respostas dos animais em P30 sob estimulações em 525 nm quando comparados com P17 ($p < 0,01$) e $\geq$ P60 ($p < 0,01$). Esses achados sugerem haver um pico nas amplitudes máximas em P30 para todos os comprimentos de onda e que há uma progressiva diminuição do limiar de semi-saturação entre P17 e P30 para 635 nm e diminuição entre P17 e P30 com estabilização em $\geq$ P60 para as estimulações em 459 nm e 525 nm.

Figura 24. Ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle em P17, P30 e $\geq P60$. (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq P60$. Os símbolos representam as amplitudes médias ($\pm SE$) para a onda b ajustadas matematicamente até o platô de saturação para estimulação em 365 nm (linha roxa), 459 nm (linha azul), 525 nm (linha verde) e 635 nm (linha vermelha).

Figura 25. Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle P17. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes matemático realizados individualmente para cada olho sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 9$), 459 nm (azul, $n = 13$), 525 nm (verde, $n = 11$) e 635 nm (vermelho, $n = 9$). A linha pontilhada indica o valor médio. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Alguns animais em 635 nm tiveram o n fixado para que o ajuste convergisse corretamente. Os pontos escuros indicam os valores dos animais em $\geq$ P60,

Figura 26. Parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino em animais controle P30. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes matemático realizados individualmente para cada olho sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 365 nm (roxo, $n = 12$), 459 nm (azul, $n = 10$), 525 nm (verde, $n = 14$) e 635 nm (vermelho, $n = 14$). A linha pontilhada indica o valor médio. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Os pontos escuros indicam os valores dos animais em $\geq P60$,

Tabela 6. Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em P17 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	$V_{\max}$ (μV)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. F>Fcrit.
365	472,37	0,22	0,60	0,09	0,97	177,00	$1,19 \cdot 10^{-7}$
459	436,31	0,08	0,68	0,01	1,00	1573,15	$7,42 \cdot 10^{-8}$
525	383,29	0,21	0,83	0,11	0,94	74,49	$3,87 \cdot 10^{-5}$
635	359,89	2,18	0,68*	0,24	0,93	124,34	$2,78 \cdot 10^{-7}$

* - O n foi fixado no valor da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Tabela 7. Parâmetros do ajuste matemático do ERG murino de animais em P30 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	$V_{\max}$ (μV)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. F>Fcrit.
365	688,40	0,12	0,66*	0,09	0,98	343,43	$3,18 \cdot 10^{-9}$
459	676,60	-0,36	0,66	0,02	1,00	940,47	$3,21 \cdot 10^{-8}$
525	584,71	0,14	0,69	0,03	0,99	865,89	$2,67 \cdot 10^{-8}$
635	594,54	1,81	0,66*	0,09	0,97	247,61	$3,20 \cdot 10^{-7}$

* O n foi fixado no valor da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Figura 27. Comparação de parâmetros do ajuste matemático do ERG murino em animais controle de 17, 30 e ≥60 dias de idade. Comparação dos parâmetros ($\pm$ SD) amplitude máxima (V_{max}), limiar de semi-saturação (k) e grau de cooperação (n) obtidos nos ajustes realizados em animais em P17, P30 e ≥60 para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm (verde) e 635 nm (vermelho). Valores de k em $\log \text{ fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Implementando a mesma análise de k médios, obtidos com os ajustes matemáticos da **Figura 21**, estimamos a sensibilidade espectral da onda b dos animais em P17, P30, para fins de comparação com os animais em ≥P60. Na **Figura 28** estão representados esses valores ($\pm$ SD) normalizados e corrigidos dos animais em P17 (círculos vazios azuis), P30 (círculos cinza) e ≥P60 (círculos negros), plotados sobre o nomograma de Mooij e van den Berg (1983) ajustado para os picos de sensibilidade espectral do camundongo. As linhas representam o espectro de absorção para cada fotorreceptor: bastonetes em preto (pico em 498 nm), cones S em roxo (pico em 360 nm) e cones M em verde (pico em 509 nm).

Figura 28. Sensibilidade espectral do ERG murino em P17, P30 e $\geq$ P60. As linhas representam a absorbância dos fotorreceptores murinos: bastonetes em preto (pico em 498 nm), cones S em roxo (pico em 360 nm) e cones M em verde (pico em 509 nm). Os símbolos representam os valores médios de sensibilidade ($\pm$ SD) em P17 (círculo vazio azul), P30 (círculo cinza) e $\geq$ P60 (círculo preto). Nomogramas adaptados de de Mooij e van den Berg (1983).

A sensibilidade espectral da onda b em P17 foi menor do que em $\geq$ P60 para estimulação em 525 nm ($p < 0,0001$) e 635 nm ($p < 0,0001$). A sensibilidade espectral em P30 foi menor do que em $\geq$ P60 somente em 635 nm ($p < 0,0001$). Entretanto, os valores estão próximos da curva de absorção da rodopsina (linha sólida negra), sugerindo que os bastonetes também foram dominantes até o primeiro platô de saturação para essas idades, possivelmente sendo deles a contribuição primária para este componente do ERG escotópico. De fato, os valores obtidos em P17 estão mais sujeitos a distorções nos registros que podem advir da dificuldade de posicionamento dos eletrodos em animais pequenos (aproximadamente 23% do peso médio de um animal adulto). Entretanto, o desvio padrão dos valores médios em 365 nm, e os valores médios obtidos para 459 nm e 525 nm sobrepõem-se àqueles em P30 e $\geq$ P60 (conforme **Figura 24**).

Com intuito de verificar se a comunicação entres os componentes da onda a com os componentes da onda b na fase ascendente das duas respostas após o platô de saturação eram

afetados de alguma forma pelo desenvolvimento do animal, foi aplicada a mesma análise da relação da onda a *versus* onda b apresentada na **Figura 29**. A **Figura 29** ilustra a relação encontrada para animais em P17 (**Figura 29a**), P30 (**Figura 29b**) e $\geq$ P60 (**Figura 29c**), obtidas nos comprimentos de onda em 365 nm (roxo), 459 nm (azul) e 525 nm (verde). A linha negra representa uma regressão linear de forma $y = ax + b$. Como em $\geq$ P60, os registros distribuíram-se uniformemente ao longo de uma regressão linear de inclinação 0,4 em P17 ($R^2 = 0,81$) e em P30 ($R^2 = 0,77$), sugerindo que a função de transferência entre fotorreceptores e células bipolares nessas intensidades já é em P17 similar à de um animal adulto.

As médias ($\pm$ SE) das latências para onda a (**Figura 30**) foram plotadas em função da intensidade de estimulação para os animais em P17 (**Figura 30a**), P30 (**Figura 30b**) e $\geq$ P60 (**Figura 30c**). As médias das latências ($\pm$ SE) onda b é apresentada na **Figura 30** para animais em P17 (**Figura 31a**), P30 (**Figura 31b**) e $\geq$ P60 (**Figura 31c**) e a médias ($\pm$ SE) das latências dos POs na **Figura 32**, para animais em P17 (**Figura 32a**), P30 (**Figura 32b**) e $\geq$ P60 (**Figura 32c**). Em todos os gráficos seguiu-se o mesmo esquema de cores para a estimulação apresentada anteriormente estabelecido: 365 nm em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho.

As latências das ondas a sobrepõem-se para estimulação em 365 nm, 459 nm e 525 nm em todas as idades, com respostas mais lentas para estimulação em 635 nm do que nos demais comprimentos de onda. Novamente a univariância da resposta dos fotorreceptores à luz justifica as lentas respostas para estimulação em 635 nm e a sobreposição das respostas para os outros comprimentos. O máximo e o mínimo das latências também flutuaram próximo ao intervalo de 10-35 ms esperado para os cones (Schneeweis & Schnapf, 1995) e que em P17, o segmento externo dos fotorreceptores já estão próximos aos de um animal adulto (R. S. Smith et al., 2002; Szél et al., 1993), sugerindo que essas respostas advenham de cones.

Para onda b, houve sobreposição das latências das respostas para estimulação em 459 nm e 525 nm, 365 nm somente para P30 e $\geq$ P60 e latências em 635 nm mais lentas em todas as idades. As latências obtidas sob estimulação em 365 nm ficaram distorcidas e menores em P17 em virtude da relação sinal-ruído deste grupo ser inferior à dos demais grupos. As latências para os POs em P17 e P30 também mantiveram um padrão semelhante ao observado em $\geq$ P60. Juntos, estes dados sugerem que já em P17 a cinética de transmissão de informação na retina externa é comparável à de um animal adulto.

Figura 29. Relação onda a versus onda b de ERG murino de animais controle em P17, P30 e $\geq P60$. Símbolos representam a relação entre as amplitudes da onda a e b obtidas com estimulação em 365 nm, 459 nm e 525 nm. A linha sólida é uma regressão linear de forma $y = ax + b$. Os registros foram coletados em animais em (a) P17 ($a = 0,4$, $b = 0,68$ e $R^2 = 0,81$), (b) P30 ($a = 0,4$, $b = -23,08$ e $R^2 = 0,77$) e (c) $\geq P60$ ($a = 0,4$, $b = 1,47$ e $R^2 = 0,78$). A linha pontilhada vermelha em P17 e P30 é a sobreposição da regressão linear dos animais em $\geq P60$.

Figura 30. Aumento na velocidade das respostas médias da onda a do ERG murino em P17, P30 ≥P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda a, do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm, (verde) e 635 nm (vermelho). Os registros foram realizados em animais em (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq$ P60.

Figura 31. Aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG murino em P17, P30 ≥P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda b, do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm, (verde) e 635 nm, (vermelho). Os registros foram realizados em animais em (a) P17, (b) P30 e (c) ≥P60.

Figura 32. Aumento na velocidade das respostas médias dos POs do ERG murino em P17, P30 e ≥P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para POs do ERG murino para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm, (verde) e 635 nm, (vermelho). Os registros foram realizados em animais em (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq$ P60.

As latências médias ($\pm$ SE) da onda b foram ajustadas com a mesma variante da função de *Hill* implementada para o tratamento das latências médias dos animais em $\geq$ P60, buscando uma descrição formal dos dados. A **Figura 33** ilustra esses resultados, seguindo o mesmo esquema de cores anterior, com as respostas em 365 nm em roxo, 459 nm em azul, 525 nm em verde e 635 nm em vermelho. As linhas sólidas representam os ajustes matemáticos obtidos sobre as latências médias dos animais em P17 (**Figura 33a**), P30 (**Figura 33c**) e $\geq$ P60 (**Figura 33d**). As **Tabelas 8 e 9** resumem os parâmetros obtidos para os animais em P17 e P30. O ajuste para 365 nm em P30 precisou ter o valor mínimo fixado em seu último ponto para que o ajuste convergisse.

Com exceção tempo inicial em 365 nm dos animais em P30, os resultados para todos os animais foram muito similares e consistentes ao longo do desenvolvimento. Os limiares de semi-saturação para 635 nm mantiveram-se maiores em todas as idades, enquanto o grau de cooperação em algumas idades precisou ser fixado no valor equivalente da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse. O ajuste parece confirmar que as latências ao longo das idades são bastante consistentes já em um animal com 17 dias de vida e as alterações encontradas podem ser fruto de artefatos introduzidos na coleta dos registros.

Figura 33. Ajuste matemático do aumento na velocidade das respostas médias do ERG murino em P17, P30 ≥P60 para estimulação em diferentes comprimentos de onda. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda b do ERG murino. As linhas representam o ajustem matemático realizado sobre os dados para estimulação em 365 nm (roxo), 459 nm (azul), 525 nm (verde) e 635 nm (vermelho). Os registros foram realizados em animais com (a) P17, (b) P30 e (c) $\geq$ P60 dias de vida.

Tabela 8. Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em P17 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	Início (ms)	Final (ms)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. $F > F_{crit.}$
365	106,04	58,62	0,13	0,80*	1,70	0,95	4569,19	$5,85 \cdot 10^{-13}$
459	112,57	65,19	1,09	0,80	0,43	0,97	6083,45	$1,11 \cdot 10^{-16}$
525	102,37	67,06	1,21	1,07	0,12	0,97	4171,29	$2,41 \cdot 10^{-10}$
635	98,26	65,70	3,07	1,01	0,12	0,97	4014,09	$2,48 \cdot 10^{-7}$

* O n foi fixado no valor da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Tabela 9. Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais em P30 para estimulação em diferentes comprimentos de onda.

Comprimento de onda (nm)	Início (ms)	Final (ms)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. $F > F_{crit.}$
365	99,47	62,99	0,92	1,21*	1,39	0,89	1663,31	$3,31 \cdot 10^{-11}$
459	101,75	60,44	0,76	1,21	0,35	0,98	3864,77	$1,33 \cdot 10^{-15}$
525	94,51	57,80	1,13	2,67	0,25	0,97	1559,17	$4,60 \cdot 10^{-09}$
635	94,81	53,48	3,60	1,66	0,65	0,80	1327,15	$3,51 \cdot 10^{-05}$

* O n foi fixado no valor da estimulação em 459 nm para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

4.3 Alterações no ERG Murino Escotópico Causadas pela Exposição à Câmara Hiperbárica

Com a condição normal do grupo controle descrita, passamos a investigar o modelo animal de ROP induzido por exposição à câmara hiperbárica de P12 a P15, através de ERGs em 459 nm realizados em animais em P17 ($n = 7$), P30 ($n = 6$) e P60 ($n = 7$). Comparações dos registros típicos de animais controle *versus* experimentais obtidos sob o mesmo protocolo de estimulação são apresentadas na **Figura 34** para coletas em P17, na **Figura 35** para coletas em P30 e na **Figura 36** para coletas em P60, estes comparados aos animais controle em $\geq P60$. Cada traço equivale à média das respostas obtidas de 5 a 30 apresentações.

As respostas dos animais experimentais em P17 são claramente diferentes das de um animal sadio. A onda b teve sua amplitude média reduzida em aproximadamente 70% e seu início postergado em 1 log. A onda a também teve a amplitude média reduzida em

aproximadamente 50%, porém não teve seu início postergado. Observou-se também a ausência de POs. Os animais em P30 apresentaram alguma recuperação, com o início da onda b postergado em 0,5 log e amplitudes médias aproximadamente 50% menores que a resposta do grupo controle. A onda a, por sua vez, teve amplitudes médias 40% menores da resposta do grupo controle e observou-se a ocorrência de POs. Em P60, a onda b não apresenta mais atrasos no seu início e as amplitudes são aproximadamente 30% menores que as de um animal sadio. A onda a teve amplitudes médias aproximadamente 20% menores que o grupo controle. Esses dados sugerem que há um pico de comprometimento em P17 e, com o avanço do tempo, a resposta da retina melhora gradativamente.

Outro dado importante de se mencionar é que o próprio desenvolvimento do animal foi prejudicado pela exposição à câmara hiperbárica. Os animais em P17 eram menores e mais leves ($5,98 \text{ g} \pm 1,25$) do que animais de mesma idade do grupo controle ($7,56 \text{ g} \pm 0,78$), e alguns deles ainda não tinham abertos os olhos em P17 (normalmente a abertura dos olhos ocorre entre em P12 e P14). O tamanho e fragilidade dos animais submetidos à câmara hiperbárica foram fatores que impactaram diretamente na anestesia e posicionamento dos eletrodos, introduzindo mais uma fonte de variabilidade aos dados.

Para explicitar as diferenças nas amplitudes de resposta ao longo das intensidades testadas entre animais sadios (em preto) e expostos à câmara hiperbárica (em cinza) em P17, P30 e $\geq$ P60, as relações de intensidade-resposta média ($\pm$ SE) para onda a (**Figura 37**), onda b (**Figura 38**) e POs (**Figura 39**) foram plotadas. Todos os componentes medidos do ERG sofreram redução de suas amplitudes e recuperação parcial ao longo do desenvolvimento, com os POs mantendo-se subnormais.

As amplitudes da onda b foram severamente afetadas e, considerando o protocolo escotópico realizado, possivelmente os bastonetes foram os que mais sofreram com a exposição à câmara hiperbárica corroborando outros achados na literatura (Fulton et al., 2001; Harris, Moskowitz, Fulton, & Hansen, 2011). Adicionalmente, a onda a foi a menos afetada e teve a melhor recuperação dos três componentes medidos. Considerando os achados nos animais sadios, a onda a possivelmente é composta pela atividade de cones e há evidências na literatura sugerindo maior resistência desse tipo celular aos efeitos adversos gerados pela ROP (Fulton et al., 2008). Os dados indicam que há uma recuperação funcional limitada ao longo do desenvolvimento, condição comumente observada em humanos (Fulton et al., 2009; Gallo et al., 1991; Hartnett, 2010).

Figura 34. Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimental em P17. ERG escotópico murino típico de (a) um animal sadio controle *versus* (b) um animal experimental exposto à câmara hiperbárica, ambos em P17. Os dois foram submetidos ao mesmo protocolo com intensidades luminosas crescentes (indicadas em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à esquerda de cada traço) em 459 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação.

Figura 35. Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimental em P30. ERG escotópico murino típico de (a) um animal sadio controle *versus* (b) um animal experimental exposto à câmara hiperbárica, ambos em P30. Os dois foram submetidos ao mesmo protocolo com intensidades luminosas crescentes (indicadas em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à esquerda de cada traço) em 459 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação.

Figura 36. Comparação de respostas típicas de ERG escotópico murino de animais controle $\geq P60$ versus experimental em P60. ERG escotópico murino típico de (a) um animal sadio controle $\geq P60$ versus (b) um animal experimental em P60 exposto à câmara hiperbárica. Os dois foram submetidos ao mesmo protocolo com intensidades luminosas crescentes (indicadas em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à esquerda de cada traço) em 459 nm. Cada traço equivale à média de 5 a 30 apresentações. A linha pontilhada indica o início da estimulação.

Figura 37. Comparação das relações intensidade-resposta médias da onda a do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais. Curvas de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) da onda a de animais sadios controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq$ P60 (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 38. Comparação das relações intensidade-resposta médias da onda b do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais. Curvas de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) da onda b de animais saudáveis controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq$ P60 (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 39. Comparação das relações intensidade-resposta médias dos POs do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais. Curvas de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) dos POs de animais sadios controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq$ P60 (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Para uma análise formal das relações de intensidade-resposta da onda b, o mesmo ajuste matemático utilizado no grupo controle foi aplicado sobre os dados do grupo experimental. A **Figura 40** apresenta os ajustes (linhas sólidas) realizados até o primeiro platô de saturação da onda b obtida sob estimulação em 459 nm para animais controle (em preto) e experimental (em cinza) em P17 (**Figura 40a**), P30 (**Figura 40b**) e $\geq$ P60 (**Figura 40c**). As amplitudes médias da onda b ($\pm$ SE) de cada grupo estão representadas nos gráficos por símbolos na respectiva cor. Os parâmetros obtidos individualmente em cada ajuste para animais experimentais em P17 encontram-se apresentados na **Figura 41**, em P30 na **Figura 42** e em $\geq$ P60 na **Figura 43**. Os animais experimentais são comparados aos controles em todas as figuras, seguindo o mesmo esquema de cores, com animais do grupo controle apresentados em preto e do grupo experimental em cinza. As linhas tracejadas indicam os valores médios para cada estimulação. A comparação da amplitude máxima ($V_{\max}$), limiar de semi-saturação (k) e grau de cooperação (n) obtidos no ajuste junto com o respectivo desvio padrão é apresentada na **Figura 44** em função da idade.

Todos os parâmetros dos animais submetidos à câmara hiperbárica foram menores quando comparados aos do grupo controle. Para a amplitude máxima de resposta ($V_{\max}$), as respostas foram menores em todas as idades (P17, $p < 0,0001$; P30, $p < 0,001$; $\geq$ P60, $p = 0,02$). O limiar de semi-saturação (k) também foi bastante prejudicado e o grupo experimental teve valores maiores em todas as idades (P17, $p = 0,02$; P30, $p < 0,0001$; $\geq$ P60, $p < 0,001$). O grau de cooperação (n) foi igual ao grupo controle em P17 e $\geq$ P60 e maior em P30 ($p = 0,01$). Esses dados sugerem que mesmo com a reversão natural do quadro de vascularização aberrante, a retina do animal sustentou perdas funcionais até os 60 dias de vida.

Figura 40. Comparação dos ajustes matemáticos da onda b do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais. Curvas de intensidade-resposta médias ($\pm$ SE) da onda b ajustadas matematicamente (linha sólida) de animais saudáveis controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq$ P60 (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 41. Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle *versus* experimental em P17. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes matemático realizados individualmente para cada olho sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 459 nm (azul). O registro foi realizado em animais controle (em preto, $n = 13$) e experimentais (em cinza, $n = 9$) em P17. As linhas pontilhadas indicam os valores médios. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Figura 42. Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle *versus* experimental em P30. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes matemático realizados individualmente para cada olho sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 459 nm (azul). O registro foi realizado em animais controle (em preto, $n = 10$) e experimentais (em cinza, $n = 11$) em P30. As linhas pontilhadas indicam os valores médios. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Figura 43. Comparação dos parâmetros individuais do ajuste matemático da onda b do ERG murino de animais controle *versus* experimental em $\geq P60$. Parâmetros (a) V_{max} , (b) k e (c) n dos ajustes matemático realizados individualmente sobre a onda b até o platô de saturação para estimulação em 459 nm (azul). O registro foi realizado em animais controle (em preto, $n = 33$) e experimentais (em cinza, $n = 14$) em $\geq P60$. As linhas pontilhadas indicam os valores médios. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

Figura 44. Variação temporal dos parâmetros da onda b do ERG escotópico murino dos grupos controle e experimental. Comparação dos parâmetros ($\pm$ SD) amplitude máxima (V_{max}), limiar de semi-saturação (k) e grau de cooperação (n) obtidos nos ajustes realizados em animais controle (em preto) e experimentais (em cinza) em P17, P30 e $\geq$ P60 para estimulação em 459 nm. Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. O número de animais utilizado em cada ponto é apresentado em parênteses ao lado do símbolo.

Como a relação entre as amplitudes da onda a e a onda b reflete a integridade funcional dos conjuntos celulares envolvidos na transmissão do sinal, é esperado que essa relação subnormal em casos de problemas que afetem os fotorreceptores e elementos pós-receptoriais (Perlman, 1983). Para se averiguar essa hipótese, a relação entre a fase ascendente após o platô de saturação das amplitudes da onda a em função da onda b do grupo experimental é apresentada na **Figura 45** e comparada às regressões lineares (linhas vermelhas) obtidas do grupo controle. Os registros foram obtidos sob estimulação em 459 nm de animais experimentais em P17 (**Figura 45a**), P30 (**Figura 45b**) e $\geq$ P60 (**Figura 45c**). A linha preta

sólida representa o ajuste de uma regressão linear de forma $y = ax + b$, que explicita a razão entre a onda a e b com o valor de inclinação (a) e interceptação do eixo y (b).

Como demonstrado anteriormente, as inclinações do grupo controle são equivalentes em todas as idades. No grupo experimental, essa relação está prejudicada em P17 (0,8) e, apesar dos valores de inclinação equipararem-se aos do grupo controle em P30 (0,4) e $\geq$ P60 (0,4), sugerindo algum nível de recuperação, as amplitudes da onda b foram menores que as do grupo controle para todas as idades. Essa relação prejudicada entre onda a e b sugere comprometimento na comunicação sináptica dos fotorreceptores com as células bipolares *ON* e outros neurônios de segunda ordem.

Buscando investigar comprometimentos na velocidade da resposta ao estímulo em função da exposição à câmara hiperbárica, as médias das latências ($\pm$ SE) em P17, P30 e $\geq$ P60 da onda a (**Figura 46**), onda b (**Figura 47**) e POs (**Figura 48**) para estimulação em 459 nm do grupo controle (em preto) foram comparadas às do grupo experimental (em cinza). O ajuste das médias das latências ($\pm$ SE) da onda b é apresentado na **Figura 49** seguindo o mesmo esquema de cores estabelecido, com os animais controle em preto e experimentais em cinza. As linhas sólidas representam o ajuste matemático obtido sobre a latência medida em P17 (**Figura 49a**), P30 (**Figura 49b**) e $\geq$ P60 (**Figura 49c**). As **Tabelas 10** resume os parâmetros encontrados para os ajustes realizados nos animais experimentais em P17, P30 e $\geq$ P60, respectivamente. É importante ressaltar que o ponto vermelho em P17 (**Figura 49b**) precisou ser ignorado para que o ajuste convergisse.

As latências da onda a do grupo experimental não foram diferentes das do grupo controle. Para as ondas b e os POs, os animais em P17 tiveram maior variabilidade e respostas mais lentas que os animais controles, progressivamente equiparando-se em P30 e $\geq$ P60. Isso é melhor observado nos ajustes matemáticos da onda b, no qual os parâmetros (**Tabela 10**) vão se equiparando conforme os animais vão ficando mais velhos. O conjunto desses dados reforçam a hipótese da recuperação limitada ao longo do desenvolvimento. Entretanto, não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo experimental.

Figura 45. Relação onda a por onda b para registros obtidos de ERG murinho de animais controle *versus* submetidos à câmara hiperbárica. Símbolos representam a relação entre as amplitudes da onda a e b dos registros obtidos sob estimulação em 459 nm de animais experimentais em (a) P17 (n = 7), (b) P30 (n = 6) e (c) ≥P60 (n = 7). A linha sólida representa o ajuste da regressão linear de forma $y = ax + b$, com as funções equivalentes apresentadas em cada gráfico, a linha pontilhada vermelha representa o ajuste dos animais controles da respectiva idade.

Figura 46. Comparação do aumento na velocidade das respostas médias da onda a do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais.

Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda a do ERG escotópico murino de animais sadios controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq$ P60 (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 47. Comparação do aumento na velocidade das respostas médias da onda b do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais.

Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda b do ERG escotópico murino de animais sadios controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, n = 8; experimental, n = 7), (b) P30 (controle, n = 6, experimental com n = 6) e (c) $\geq P60$ (controle, n = 17, experimental com n = 7) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 48. Comparação do aumento na velocidade das respostas médias dos POs do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais.

Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências dos POs do ERG escotópico murino de animais sadios controle (em preto) *versus* animais experimentais expostos à câmara hiperbárica (em cinza). As aferições de ambos os grupos foram realizadas em animais em (a) P17 (controle, $n = 8$; experimental, $n = 7$), (b) P30 (controle, $n = 6$, experimental com $n = 6$) e (c) $\geq P60$ (controle, $n = 17$, experimental com $n = 7$) para grupo controle e em P60 para experimental. Ambos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo com passos crescentes de intensidades luminosas (indicada em fluxo de fótons à esquerda de cada traço) em 459 nm.

Figura 49. Comparação dos ajustes matemáticos do aumento na velocidade das respostas médias do ERG escotópico murino de animais controle *versus* experimentais. Os símbolos representam médias ($\pm$ SE) das latências para onda b do ERG murino de animais controle (em preto) e experimentais (em cinza). As linhas representam o ajustem matemático realizado sobre os dados para estimulação em 459 nm. Os registros foram realizados em animais com (a) P17 (controle, $n = 8$; experimental, $n = 7$), (b) P30 (controle, $n = 6$, experimental com $n = 6$) e (c) $\geq$ P60 (controle, $n = 17$, experimental com $n = 7$) dias de vida. O símbolo vermelho não foi considerado para o ajuste.

Tabela 10. Parâmetros do ajuste matemático das médias das latências do ERG murino de animais experimentais em P17, P30 e $\geq$ P60 para estimulação em 459 nm.

Idade (dias)	Início (ms)	Final (ms)	k (log I)**	n	χ^2	R^2	F	Prob. F>Fcrit.
P17	144,42	78,06	-0,36	0,72	0,05	0,99	14739,31	0
P30	112,45	63,18*	0,16	0,46	0,33	0,94	1770,72	$1,77 \cdot 10^{-13}$
P60	103,32	56,68	0,71	1,48	0,41	0,96	1862,95	$4,92 \cdot 10^{-14}$

* O valor final foi fixado para que o ajuste convergisse.

** Valores de k em $\log \text{fótons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-2}$.

5. Discussão

5.1 O ERG murino escotópico em animais adultos e ao longo do desenvolvimento

As primeiras respostas obtidas em animais $\geq P60$ para o protocolo de estimulação implementado foram de ondas b em -2,01 log para estimulação em 459 nm, sendo dominadas pela atividade de células bipolares ON que amplificam o sinal dos bastonetes (Copenhagen, Hemila, & Reuter, 1990). Há um platô de saturação entre 0,5 e 2,5 log na onda b para as estimulações em 365 nm, 459 nm e 525 nm e entre 3,0 e 4,0 log para estimulação em 635 nm e a análise com o ajuste matemático dessas respostas sugere que a sensibilidade espectral do ERG até o primeiro platô de saturação se aproxima da absorbância dos bastonetes. A latência da onda b também foi condizente com a atividade dos bastonetes (Baylor et al., 1984; Weymouth & Vingrys, 2008). A onda a, por sua vez, surgiu concomitantemente ao platô de saturação da onda b e teve latências equivalentes às dos cones (Schneeweis & Schnapf, 1995), sugerindo que esse tipo de fotorreceptor é o principal contribuinte para essa faixa de estimulação. Esses achados são suportados pela literatura, que afirma que os bastonetes já se encontram saturados nas intensidades que o platô de saturação foi identificado, seguido pelo início da atividade dos cones M e S (Abd-El-Barr et al., 2009; Nikonov et al., 2006; Pang et al., 2004).

Considerando que até a abertura dos olhos, entre P12 e P14, os animais já apresentam fotorreceptores quase maduros e devidamente posicionados (Rich et al., 1997; Smith et al., 2002), encontrou-se que para os animais em P17 e P30, as amplitudes da onda a, b e POs foram similares em todas as idades, sugerindo que a circuitaria retiniana escotópica já está funcional em P17. Assim, as mesmas conclusões acerca da contribuição dos fotorreceptores em animais $\geq P60$ são válidas para os animais controle em P17 e P30. Entretanto, foram observadas mudanças nas amplitudes de respostas e na sensibilidade ao longo do desenvolvimento do animal. Há um aumento de V_{max} entre P17 e P30, seguido pela diminuição até $\geq P60$ em todos os comprimentos de onda testados. Em contrapartida, há uma consistente diminuição da sensibilidade entre P17 e P30 para as estimulações em 459 nm, 525 nm e 635 nm e estabilização entre P30 e $\geq P60$ em 459 nm e 525 nm.

Esses fatos podem ser explicados, pelo menos em parte, pelos achados de Anastassov e colaboradores (2017), que quantificaram nas extremidades dendríticas de células bipolares ligadas à bastonete as proteínas essenciais para a resposta à luz mGluR6 e TRPM1. Eles encontraram uma dinâmica de expressão das proteínas ao longo do desenvolvimento similar à dinâmica da amplitude máxima de resposta observada. Há uma baixa expressão das proteínas

em P14, seguida por um aumento significativo até P30 e decréscimo até P82. O pico de expressão das proteínas em P30 parece explicar porque em todos os comprimentos de onda há um aumento na amplitude máxima de resposta nessa idade.

Anastassov e colaboradores (2017) também encontraram que o número de extremidades dendríticas das células bipolares ligadas à bastonetes atinge monotonicamente (sem poda neuronal) uma assíntota em P30 e não muda significativamente até P82. Entretanto, eles assumiram que há uma correlação causal entre convergência e sensibilidade, na qual haveria o aprimoramento da sensibilidade da visão mediada por bastonetes quando os fótons são esparsos pelo aumento do campo receptivo da célula bipolar. Essa hipótese foi primeiramente postulada por Copenhagen e colaboradores (1990), que mediram intracelularmente respostas à luz de retinas de sapos e constataram que a somação espacial e a sensibilidade⁸ aumentavam em uma ordem de magnitude entre os bastonetes para células horizontais e em duas ordens de magnitude dos bastonetes para as ganglionares, além de existir um processo de amplificação do sinal entre bastonetes e células bipolares de até 20 vezes.

Se a convergência é causa prima do aumento da sensibilidade, seu aumento deveria cessar assim que a assíntota fosse atingida em P30 e os animais em $\geq P60$ não deveriam apresentar mudanças. Observou-se que os limiares de semi-saturação para as estimulações em 459 nm e 525 nm reduzem de P17 para P30 e parecem estabilizar-se em $\geq P60$. Entretanto, também há uma diminuição progressiva de k para estimulação em 635 nm conforme o desenvolvimento avança. Apesar dos achados em 459 nm e 525 nm corroborarem que a sensibilidade se estabiliza logo após P30, os registros em 635 nm também sugerem que o processo de aumento da sensibilidade pode estar ligado a outros fatores além da convergência, como cascatas de segundo-mensageiros que amplificam o sinal. Entretanto, é importante ressaltar que foram testados poucos animais e o aumento do número de observações possibilitaria extrairmos conclusões mais sólidas. Também não foi analisado em grandes detalhes a sensibilidade espectral da onda a, que poderia oferecer maiores esclarecimentos sobre a participação dos cones S e M.

Os resultados encontrados com os animais em P17, P30 e $\geq P60$ possibilitam concluir que o protocolo utilizado em nosso estudo evoca respostas escotópicas e. O registro escotópico é ideal para a avaliação do modelo de ROP, considerando que os bastonetes são mais sensíveis

⁸ Copenhagen e colaboradores (1990) adotam o significado de sensibilidade como equivalente ao ganho de voltagem, que é a razão entre a amplitude de resposta por isomerizações de duas classes de neurônios, como a razão da amplitude de resposta por isomerização de bastonetes sobre células horizontais.

a exposição à câmara hiperbárica (Fulton et al., 2001; Harris, Moskowitz, Fulton, & Hansen, 2011).

5.2. Efeitos da exposição à câmara hiperbárica e o modelo de ROP

Animais expostos à câmara hiperbárica eram menores que os pares do grupo controle e alguns tiveram a abertura dos olhos atrasada. Funcionalmente, os camundongos em P17 sofreram as maiores perdas, com o início da onda b em intensidades maiores e diminuição das amplitudes de todos os componentes do ERG. Essas perdas são condizentes com o período de máxima neovascularização que ocorre justamente nessa idade. Entretanto, em seres humanos, existe a possibilidade de recuperação do quadro patológico devido à regressão da neovascularização em casos de ROP até o estágio 3 (Hartnett, 2010). De fato, observou-se no modelo a sucessiva recuperação das respostas que, assim como no humano, pode estar relacionada em alguma medida com a concomitante regressão da neovascularização esperada até P25 (Connor et al., 2009).

As amplitudes máximas de resposta e a sensibilidade da onda b foram menores em todas as idades. A avaliação dos registros de ERGs em humanos demonstrou uma disfunção nas respostas do ERG escotópico, com a atividade dos bastonetes prejudicada proporcionalmente ao nível de acometimento da ROP (Fulton et al., 2009). Fulton e colaboradores (1999) encontraram, ao estudar o modelo de retinopatia induzida por oxigênio em ratos, que as respostas atenuadas de bastonetes não eram fruto simplesmente do encurtamento do segmento externo e redução da quantidade de rodopsina, mas sim de uma deformação da própria estrutura do segmento externo e comprometimento da mobilidade das proteínas na cascata de fototransdução, alterando a própria sensibilidade e amplitude de resposta. A análise das relações da onda a pela onda b também sugere perdas funcionais nas células pós-receptorais em P17, possivelmente células bipolares *ON*. De fato, os componentes escotópicos foram os que mais sofreram com a exposição, corroborando outros achados na literatura (Fulton et al., 2001; Harris, Moskowitz, Fulton, & Hansen, 2011), e os danos ao funcionamento retiniano do animal pareceram sustentar-se mesmo após o quadro de recuperação natural, lembrando o observado em humanos (Gallo et al., 1991; Hartnett, 2010).

A onda a, mesmo com perdas nas amplitudes em comparação ao grupo controle (P17 = 50% da resposta; P30 = 40% da resposta; $\geq$ P60 = 20% da resposta), mostrou-se mais resistente ao longo das idades do que os outros componentes do ERG e a sobreposição de suas latências reforçam esse fato. Fulton e colaboradores (2008) já haviam identificado em registros

de ERG em humanos que os cones poderiam ser mais resistentes aos efeitos adversos da ROP devido à sua estrutura e maior maturidade há época do acometimento.

Os achados eletrofisiológicos no modelo de ROP em camundongos foram semelhantes em alguns pontos ao que é encontrado em ERGs realizados em seres humanos. No homem, as respostas dos bastonetes ficam severamente comprometidas quanto mais agudo for o quadro de ROP, enquanto os registros dos cones parecem não ser afetados pelo quadro e os POs tornam-se maiores (Akula, et. al, 2007). Entretanto, o desenvolvimento patológico nos camundongos é diferente quanto ao nível de acometimento, sendo mais próximo do quadro severo de ROP em humanos, tendo as ondas a afetadas e menores amplitudes dos POS em P17 (Hansen et al., 2017).

5. Referências⁹

- Abd-El-Barr, M. M., Pennesi, M. E., Saszik, S. M., Barrow, A. J., Lem, J., Bramblett, D. E., ... Wu, S. M. (2009). Genetic dissection of rod and cone pathways in the dark-adapted mouse retina. *Journal of neurophysiology*, 102(3), 1945–1955.
- Akula, J. D., Hansen, R. M., Martinez-Perez, M. E., & Fulton, A. B. (2007). Rod Photoreceptor Function Predicts Blood Vessel Abnormality in Retinopathy of Prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9), 4351.
- Akula, J. D., Mocko, J. A., Moskowitz, A., Hansen, R. M., & Fulton, A. B. (2007). The oscillatory potentials of the dark-adapted electroretinogram in retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(12), 5788–5797.
- Anastassov, I. A., Wang, W., & Dunn, F. A. (2017). Synaptogenesis and synaptic protein localization in the postnatal development of rod bipolar cell dendrites in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, (February).
- Balasubramanian, V., & Sterling, P. (2009). Receptive fields and functional architecture in the retina. *The Journal of physiology*, 587(Pt 12), 2753–67.
- Barnes, S., & Hille, B. (1989). Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *The Journal of general physiology*, 94(4), 719–43.
- Baylor, D. (1996). How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(2), 560–565.
- Baylor, D. A., Nunn, B. J., & Schnapf, J. L. (1984). The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey macaca fascicularis. *J. Physiol.*, 357, 575–607.
- Bellingham, J., Chaurasia, S. S., Melyan, Z., Liu, C., Cameron, M. A., Tarttelin, E. E., ... Lucas, R. J. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: Discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biology*, 4(8), 1334–1343.
- Boynton, R. M., & Whitten, D. N. (1970). Visual Adaptation in Monkey Cones: Recordings of Late Receptor Potentials. *Science*, 170(3965), 1423–1426.
- Cajal, S. (1893). La retine des vertebres. In *The vertebrate retina* (p. 775–904). San Francisco: Freeman.
- Connor, K. M., Krah, N. M., Dennison, R. J., Aderman, C. M., Chen, J., Guerin, K. I., ... Smith,

⁹ De acordo com o estilo APA – American Psychological Association.

- L. E. H. (2009). Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nature protocols*, 4(11), 1565–1573.
- Copenhagen, D. R., Hemila, S., & Reuter, T. (1990). Signal Transmission Through the Dark-Adapted Retina of the Toad (*Bufo-Marinus*) - Gain, Convergence, and Signal Noise. *Journal of General Physiology*, 95(4), 717–732.
- Dartnall, H. J. A. (1953). The Interpretation of Spectral Sensitivity Curves. *British Medical Bulletin*, 9(1), 24–30.
- Detwiler, P. B., Hodgkin, A. L., & McNaughton, P. A. (1980). Temporal and spatial characteristics of the voltage response of rods in the retina of the snapping turtle. *The Journal of physiology*, 300, 213–50.
- Einthoven, W., & Jolly, W. A. (1908). The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities*, 1(4), 373–416.
- Fulton, A. B., Hansen, R. M., & Moskowitz, A. (2008). The Cone Electroretinogram in Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 49(2), 814–819.
- Fulton, A. B., Hansen, R. M., Moskowitz, A., & Akula, J. D. (2009). The neurovascular retina in retinopathy of prematurity. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(6), 452–482.
- Fulton, A. B., Hansen, R. M., Petersen, R. A., & Vanderveen, D. K. (2001). The rod photoreceptors in retinopathy of prematurity: an electroretinographic study. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 119(4), 499–505.
- Fulton, A. B., Reynaud, X., Hansen, R. M., Lemere, C. A., Parker, C., & Williams, T. P. (1999). Rod photoreceptors in infant rats with a history of oxygen exposure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(1), 168–174.
- Gallo, J. E., Holmstrom, G., Kugelberg, U., Hedquist, B., Lennerstrand, G., Gallo, J. E., ... Lennerstrand, G. (1991). Regressed retinopathy of prematurity and its sequelae in children aged 5-10 years. *British Journal of Ophthalmology*, 75, 527–531.
- Gergely, K., & Gerinec, a. (2010). Retinopathy of prematurity--epidemics, incidence, prevalence, blindness. *Bratislavske lekarske listy*, 111(9), 514–517.
- Gerschman, R., Nadig, P., Snell, A., & Nye, S. (1954). Effect of High Oxygen Concentrations

- on Eyes of Newborn Mice. *Am J Physiol*, 179(1), 115–118.
- Goto, A. Y. (2016). *Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de Caurassius auratus (Cyprinidae) variedades padrão e demekin*. Universidade de São Paulo.
- Granit, R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *The Journal of Physiology*, 77(3), 207–239.
- Gyllensten, L. J., & Hellström, B. E. (1952). Retrolental fibroplasia; animal experiments: the effect of intermittently administered oxygen on the postnatal development of the eyes of fullterm mice. *Acta paediatrica*, 41(6), 577–82.
- Hanitzsch, R., Küppers, L., & Flade, A. (2004). The effect of GABA and the GABA-uptake-blocker NO-711 on the b-wave of the ERG and the responses of horizontal cells to light. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242(9), 784–91.
- Hansen, R. M., Moskowitz, A., Akula, J. D., & Fulton, A. B. (2017). The neural retina in retinopathy of prematurity. *Progress in Retinal and Eye Research*, 56, 32–57.
- Harris, M. E., Moskowitz, A., Fulton, A. B., & Hansen, R. M. (2011). Long-term effects of retinopathy of prematurity (ROP) on rod and rod-driven function. *Documenta Ophthalmologica*, 122(1), 19–27.
- Hartnett, M. E. (2010). Retinopathy of Prematurity. In D. A. Dartt, J. C. Besharse, & R. Dana (Orgs.), *Encyclopedia of the Eye* (1^o ed, p. 118–128). Cambridge: Academic Press.
- Hartnett, M. E., & Penn, J. S. (2012). Mechanisms and Management of Retinopathy of Prematurity. *New England Journal of Medicine*, 367(26), 2515–2526.
- Hedrich, D. (2012). *The handbook of experimental animals - The Laboratory Mouse*. (2^o ed). Oxford: Elsevier Ltd.
- Ingram, N. T., Sampath, A. P., & Fain, G. L. (2016). Why are rods more sensitive than cones? *The Journal of physiology*, 0, 1–12.
- Jacobs, G. H., Neitz, J., & Deegan, J. F. (1991). Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature*, 353(6345), 655–656.
- Jacobs, G. H., & Williams, G. A. (2007). Contributions of the mouse UV photopigment to the ERG and to vision. *Documenta Ophthalmologica*, 115(3), 137–144.
- Joselevitch, C., Klooster, J., & Kamermans, M. (2017). Dendritic potassium channels speed up

rod-driven light responses of mixed-input bipolar cells in the goldfish retina.

- Junqueira, C., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica: Texto & Atlas*. (12^o ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kandel, E., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of Neuroscience* (5^o ed). New York: McGraw-Hill Professional.
- Kim, C., D'Amore, P., & Connor, K. (2016). Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye and Brain*, 67.
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A., & Newman, E. A. (2000). Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. *J. Neurosci.*, 20(15), 5733–5740.
- Kondo, M., Miyake, Y., Horiguchi, M., Suzuki, S., & Tanikawa, A. (1998). Recording multifocal electroretinogram on and off responses in humans. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(3), 574–80.
- Lukáts, A., Szabó, A., Röhlich, P., Vígh, B., & Szél, A. (2005). Photopigment coexpression in mammals: Comparative and developmental aspects. *Histology and Histopathology*, 20(2), 551–574.
- Masland, R. H. (2011). Cell populations of the retina: the Proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(7), 4581–91.
- Möller, A., & Eysteinnsson, T. (2003). Modulation of the components of the rat dark-adapted electroretinogram by the three subtypes of GABA receptors. *Visual neuroscience*, 20(5), 535–42.
- Mooij, J. E., & van den Berg, T. J. (1983). The spectral shape of A2 visual pigments. *Vision research*, 23(7), 701–5.
- Naka, K. I., & Rushton, W. A. (1966). S-potentials from colour units in the retina of fish (Cyprinidae). *The Journal of physiology*, 185(3), 536–555.
- Nikonov, S. S., Kholodenko, R., Lem, J., & Pugh Jr, E. N. (2006). Physiological Features of the S- and M-cone Photoreceptors of Wild-type Mice from Single-cell Recordings. *The Journal of General Physiology J. Gen. Physiol*, 127(4), 359–374.
- Nusinowitz, S. (2010). Anatomically Separate Rod and Cone Signaling Pathways. In A. D. Dartt, J. C. Besharse, & R. Dana (Orgs.), *Encyclopedia of the Eye* (p. 67–72). Cambridge:

Academic Press.

- Oakley, B., & Green, D. G. (1976). Correlation of light-induced changes in retinal extracellular potassium concentration with c-wave of the electroretinogram. *Journal of neurophysiology*, 39(5), 1117–33.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., ... Hogenesch, J. B. (2003). Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photic Responses in Blind Mice. *Science*, 301, 525–527.
- Pang, J.-J., Gao, F., & Wu, S. M. (2004). Light-evoked current responses in rod bipolar cells, cone depolarizing bipolar cells and AII amacrine cells in dark-adapted mouse retina. *The Journal of physiology*, 558(Pt 3), 897–912.
- Patz, A., Eastham, A., Higginbotham, D. H., & Kleh, T. (1953). Oxygen studies in retrolental fibroplasia. II. The production of the microscopic changes of retrolental fibroplasia in experimental animals. *American journal of ophthalmology*, 36(11), 1511–22.
- Perlman, I. (1983). Relationship between the amplitudes of the b wave and the a wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. *The British journal of ophthalmology*, 67(7), 443–8.
- Perlman, I. (2007). The electroretinogram: ERG. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Orgs.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (p. 1–48). Salt Lake City: University of Utah Health Sciences Center.
- Perlman, I. (2009). Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. *Documenta Ophthalmologica*, 118(1), 3–28.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 340–345.
- Purves, D., Augustine, J., Flitpatrick, D., Hall, W., A., L., & White, L. (2011). *Neuroscience*. (5^o ed). Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Rich, K. A., Zhan, Y., & Blanks, J. C. (1997). Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 388(1), 47–63.
- Robson, J. G., & Frishman, L. J. (1996). Photoreceptor and bipolar-cell contributions to the cat

- electroretinogram : a kinetic model for the early part of the flash response. *Journal of Optical Society of America*, 13(3), 613–622.
- Robson, J. G., & Frishman, L. J. (2014). The rod-driven a-wave of the dark-adapted mammalian electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Research*, 39, 1–22.
- Robson, J. G., Maeda, H., Saszik, S. M., & Frishman, L. J. (2004). In vivo studies of signaling in rod pathways of the mouse using the electroretinogram. *Vision Research*, 44(28 SPEC.ISS.), 3253–3268.
- Rocha, F. A. de F., Gomes, B. D., Silveira, L. C. de L., Martins, S. L., Aguiar, R. G., de Souza, J. M., & Ventura, D. F. (2016). Spectral Sensitivity Measured with Electroretinogram Using a Constant Response Method. *Plos One*, 11(1), 1–12.
- Saszik, S. M., Robson, J. G., & Frishman, L. J. (2002). The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *The Journal of physiology*, 543(Pt 3), 899–916.
- Schneeweis, D. M., & Schnapf, J. L. (1995). Photovoltage of Rods and Cones in the Macaque Retina, 268(5213), 1053–1056.
- Smith, L. E., Wesolowski, E., Mclellan, A., Kostyk, S. K., D'amato, R., Sullivan, R., & D'amore, P. A. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse, Invest. *Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35(1), 101–111.
- Smith, R. S., Winston, W., & Simon, W. M. J. (2002). Ocular Development. In R. S. Smith (Org.), *Systematic Evaluation of the Mouse Eye* (p. 45–80). Boca Raton: CRC Press.
- Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M., ... Smith, L. E. H. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(6), 2813–26.
- Stockton, R. A., & Slaughter, M. M. (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *The Journal of general physiology*, 93(1), 101–22.
- Szél, A., Röhlich, P., Caffé, A. R., Juliusson, B., Aguirre, G., & Van Veen, T. (1992). Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 325(3), 327–42.
- Szél, A., Röhlich, P., Mieziowska, K., Aguirre, G., & van Veen, T. (1993). Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in

- the mouse retina: a developmental study. *The Journal of comparative neurology*, 331(4), 564–77.
- Taylor, W. R., & Smith, R. G. (2004). Transmission of scotopic signals from the rod to rod-bipolar cell in the mammalian retina. In *Vision Research* (Vol. 44, p. 3269–3276).
- Toda, K., Bush, R. a, Humphries, P., & Sieving, P. a. (1999). The electroretinogram of the rhodopsin knockout mouse. *Visual neuroscience*, 16(2), 391–8.
- Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory Potentials in the Retina: what do they Reveal. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17(4), 485–521.
- Wang, Y. V., Weick, M., & Demb, J. B. (2011). Spectral and Temporal Sensitivity of Cone-Mediated Responses in Mouse Retinal Ganglion Cells. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7670–7681.
- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 747–757.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–62.
- Weymouth, A. E., & Vingrys, A. J. (2008). Rodent electroretinography: Methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(1), 1–44.
- Wu, S. M., Gao, F., & Pang, J. J. (2004). Synaptic circuitry mediating light-evoked signals in dark-adapted mouse retina. *Vision Research*, 44(28 SPEC.ISS.), 3277–3288.

6. Anexo A: Certificado de Ética

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo morfológico e eletrofisiológico de modelo animal para retinopatia da prematuridade.", protocolada sob o CEUA nº 1396140916, sob a responsabilidade de **Christina Joselevitch e equipe; Guido Barbieri Bittencourt; Ricardo Tiosso Panassiol; Ricardo José Giordano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) na reunião de 15/09/2016.

We certify that the proposal "Morphological and electrophysiological study of an animal model for retinopathy of prematurity.", utilizing 80 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 1396140916, under the responsibility of **Christina Joselevitch and team; Guido Barbieri Bittencourt; Ricardo Tiosso Panassiol; Ricardo José Giordano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Psychology Institute - São Paulo University (CEUA/IPUSP) in the meeting of 09/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **12/2018**

Área: **Psicologia Experimental**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **17 a 30 dias**

N: **80**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **7 a 40 g**

Resumo: Este é um pedido de renovação de protocolo existente (número CEPA-IPUSP 2014/003). A retinopatia da prematuridade é uma doença ocular do desenvolvimento associada a um crescimento vascular retiniano anormal e ocorre somente em recém-nascidos com menos de 32 semanas de gestação e submetidos a longos períodos em incubadoras, tipicamente ricas em oxigênio. A doença possui duas fases: (1) a neovascularização patológica atrasada da retina, decorrente da hiperóxia induzida pelo ambiente da incubadora; (2) após a maturação da retina ocorre vascularização aberrante devido ao aumento de fatores de crescimento desencadeados pela pouca disponibilidade de oxigênio. O objetivo deste trabalho é avaliar a função visual e as densidades de diferentes populações neuronais retinianas em um modelo animal de retinopatia da prematuridade, comparando-o a animais saudáveis. Serão utilizados 20 camundongos (*Mus musculus*), divididos em dois grupos experimentais com 10 sujeitos cada. No grupo controle, os animais não serão submetidos a nenhuma manipulação experimental; no grupo experimental, os animais serão submetidos à hiperoxigenação em câmara hiperbárica de P7 a P12 (Connor et al., 2009). O registro para avaliação funcional se dará por meio de eletrorretinogramas (ERGs) de campo total em animais previamente adaptados ao escuro durante pelo menos 2 horas. Em sessão de 40 a 60 minutos de duração, os animais serão submetidos a flashes de luz azul (LEDs com transmissão máxima em 472 nm), verde (LEDs com transmissão máxima em 525 nm) e vermelha (LEDs com transmissão máxima em 625 nm) em intensidades crescentes para avaliação da atividade escotópica e fotópica da retina. Registros serão realizados em P17, P21, P30 e P60, para acompanhar o desenvolvimento retiniano. Amplitudes e latências das ondas a e b e características (área e frequência) dos potenciais oscilatórios serão medidas, e relações intensidade-resposta ajustadas com equações de Hill para fins de comparação entre indivíduos e entre grupos. Os parâmetros de Hill obtidos serão comparados através de ANOVA e testes T de Student com as devidas correções de Bonferroni. Ao final do ERG em P60, os animais serão eutanasiados e as densidades populacionais serão medidas em retinas isoladas que serão processadas imunohistoquimicamente para diversos tipos diferentes de neurônios retinianos com o uso de anticorpos comerciais. Neurônios imunorreativos serão contados em fotomicrografias de montagens planas da retina com o auxílio do software Image J (NIH, Bethesda, EUA) e as respectivas densidades celulares serão calculadas. As médias de cada grupo experimental serão comparadas às dos respectivos controles através de ANOVAs e testes T de Student entre grupos, com a devida correção de Bonferroni.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia Sensorial do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 15 de setembro de 2016

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Christina Joselevitch
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo