

**DAVI CHEN WU**

**Estudo da influência de TGF beta na família let7  
em células gliais de Müller**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento/Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2018

## RESUMO

Wu, DC. Estudo da influência de TGF beta sobre miRNAs da família let7 em células gliais de Müller. [Tese (Doutorado em Ciências) ]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O vítreo apresenta remodelamento de seus componentes durante a patogênese de doenças como descolamento de retina, buraco de mácula e membrana epirretínica e os fatores que levam a essas alterações ainda não são completamente conhecidos. As células gliais de Müller exercem um papel regulatório importante na retina, principalmente na produção de TGF-beta, e participam na formação de membranas contráteis em doenças da interface vítreo-retínica. O TGF-beta está aumentado tanto na retina como no vítreo, em condições de doença, tendo o papel importante de ativar a capacidade contrátil na interface do tecidos estudados. MicroRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, endógenos, não codificantes e potentes reguladores pós-transcricional da expressão gênica, portanto potenciais alvos terapêuticos eficientes para o tratamento das doenças da interface vítreo-retínica. Em linhagem de células de Müller de rato (rMC-1), o tratamento com TGF- $\beta$ 1 em concentração de 5 ng/ml leva a diminuição da expressão gênica de let7-b e let7-c, após 24 horas de tratamento. Já em linhagem humana de Müller ( MIO-M1), a expressão gênica de let-7b e let-7c foi alterada com 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. TGF- $\beta$ 2 induziu a uma queda da expressão de let-7b e let-7c, que variou entre 70% e 40% , após 24 e 48 horas de tratamento. Investigamos os possíveis alvos desses miRNAs, COL1A1, COL1A2 e HAS2, proteínas que possuem relação com as alterações da interface vítreo-retiniana. Entretanto, a análise da expressão de RNAm de COL1A1 e COL1A2 após a estimulação de MIO-M1 com TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 não apresentou alterações. No estudo com gene reporter de luciferase validamos COL1A2 como um novo alvo de let-7b na célula de Müller. Nos estudos funcionais observamos que o let-7c mimético diminui a contração do gel de colágeno, Dessa forma, neste estudo concluímos que o micro-ambiente das células de Müller nas doenças da interface vítreo-retiniana, pode alterar a expressão dos miRNAs da família let7 e, consequentemente, levar à formação de membranas densas e contráteis.

Palavras-chave: MicroRNAs. Retina. Fator de crescimento. TGF-beta. Let-7.

## ABSTRACT

Wu, DC. TGF beta modulates let-7 miRNAs expression in Müller glial cells. [thesis (PhD in Sciences) ]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Vitreous remodeling occurs during disease pathogenesis, such as retinal detachment, macular hole and epiretinal membrane, and the factors that lead to these alterations are still not fully determined. Müller glial cells regulate TGF-beta production in the retina and participate in the formation of contractile membranes in vitreoretinal interface. TGF-beta is increased in both vitreous and retina in disease conditions, and are key participants in activating contractile capacity. MicroRNAs are short (19-25 nucleotides), endogenous, non-coding RNA, involved in post-transcriptional gene regulation, that have a potential role as new therapeutic targets for vitreoretinal interface diseases. In rat Müller cell line (rMC-1), treatment with 5ng /ml of TGF- $\beta$ 1 induced a downregulation of let-7-b and let-7-c expression after 24 hours. In Müller human line (MIO-M1), let-7b and let-7c expression were altered with 10 ng / ml of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2. TGF- $\beta$ 2 induced a downregulation ranging from 70% to 40%, after 24 and 48 hours of treatment. We investigated the possible targets of these miRNAs: COL1A1, COL1A2 and HAS2, proteins that are related to vitreoretinal interface alterations. However, the analysis of COL1A1 and COL1A2 mRNA expression after stimulation of MIO-M1 with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 did not show any changes. The luciferase gene reporter analysis revealed COL1A2 as a let-7b target in the Müller cell. In the functional studies we observed that the let-7c mimic decreases collagen gel contraction. In summary, we conclude that the microenvironment of Müller cells in vitreoretinal interface diseases may alter the expression of the miRNAs of the let-7 family and, consequently, lead to the formation of dense and contractile membranes.

Keywords: MicroRNAs. Retina. Fator de crescimento. TGF-beta. Let-7.

# 1 INTRODUÇÃO

Uma breve introdução sobre a estrutura, fisiologia e anatomia da retina e do vítreo será apresentada para contextualização deste estudo.

## 1.1 Estrutura da retina

A retina, que no latim significa rede, é um fino e delicado tecido nervoso ultra especializado, localizado na superfície interna do segmento posterior do olho, que contém os três primeiros neurônios da via visual aferente, dos quais os fotorreceptores, neurônios de 1ª. ordem, são células fotossensíveis que se tornam hiperpolarizadas na presença de luz. A partir daí, a informação visual segue com as células bipolares, neurônios de 2ª ordem, que processam os sinais em conjunto com as células horizontais e amácrinas possivelmente por células não neuronais, e os enviam para as células ganglionares, neurônios de 3ª ordem. Os axônios das células ganglionares formam o nervo óptico, que envia informações já processadas para áreas visuais do sistema nervoso central (Siqueira , 2009).

Histologicamente, a retina é dividida em 10 camadas: epitélio pigmentado da retina, camada de fotorreceptores (segmento externo dos cones e bastonetes, que contém o pigmento visual, e o segmento interno, que contém as mitocôndrias, núcleos, etc.); três camadas compostas por corpos celulares (nuclear externa e interna e células ganglionares); duas camadas intermediárias sinápticas (plexiformes interna e externa); duas membranas limitantes (membrana limitante interna e externa) e a camada de fibras das células ganglionares ou camada de fibras nervosas (Sebag, 2014).

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. Seus prolongamentos sinápticos, juntamente com os das células bipolares e horizontais, formam a camada plexiforme externa. Os corpos celulares das células bipolares estão situados na nuclear interna, que também é constituída pelos corpos celulares das células amácrinas e horizontais. Na região foveal, uma célula bipolar faz sinapse com um fotorreceptor; entretanto, na retina periférica, uma célula bipolar recebe o estímulo de mais de 100 fotorreceptores (Sebag, 2014).

A segunda camada sináptica, a plexiforme interna, é responsável pela transmissão vertical da informação visual entre as células bipolares e ganglionares, e nela há também uma complexa rede moduladora, composta pelas células amácrias.

A membrana limitante externa é formada pelo conjunto de complexos juncionais que unem as células de Müller aos fotorreceptores, no intervalo entre os seus segmentos externos e interno. A membrana limitante interna, por sua vez, é formada pela lâmina basal e os pés terminais das células de Müller e faz a interface da retina com a hialóide posterior do vítreo. Ambas as membranas limitantes não são consideradas membranas verdadeiras.

As células gliais são representadas pelos astrócitos, pela micróglia e principalmente pelas células de Müller, que formam o arcabouço de sustentação da retina, e têm seus limites definidos entre as membranas limitantes externa e interna. Têm também função protetora e de controle da homeostase retiniana.

As células de Müller e os astrócitos possuem um abundante citoesqueleto rico em filamentos gliais característicos (GFAP –proteína ácida fibrilar glial) e estão associados à presença de inúmeras junções comunicantes (“gap) e junções de adesão formando um citoesqueleto em forma de “túneis” que interligam vasos e neurônios na retina interna e externa. Essa relação íntima entre as células gliais decorre do fato de que ambas as células possuem alta permeabilidade ao potássio, o que permite a propagação de metabólitos como o glutamato, glutamina e lactato entre as células gliais, à semelhança de um sincício glial (Reichenbach, 2013).

Os astrócitos formam os pés vasculares que envolvem o sistema vascular criando a barreira hemato-retínica, componente importante que preserva a integridade da retina. Na retinopatia diabética, a quebra da barreira hemato-retínica leva a um extravasamento de constituintes plasmáticos para a retina e para o vítreo, formando o edema macular e levando à baixa acuidade visual (Sen, 1988).

A micróglia é formada por uma subpopulação altamente especializada de fagócitos mononucleares. Na retina, está localizada entre as camadas das fibras nervosas e células ganglionares, na camada nuclear interna e camada plexiforme externa. Tem um papel importante no sistema de defesa e homeostase ocular.

## 1.2 Estrutura do vítreo

O vítreo é uma matriz extracelular altamente hidratada e avascular que participa da homeostase, estrutura e troca de moléculas com as estruturas adjacentes. É um gel viscoelástico, composto em mais de 98% por água, com o índice refrativo de 1,33. Sua viscosidade é 2 a 4 vezes maior do que a água, e varia com a idade. Consiste de diferentes macromoléculas, sendo que as mais importantes são: colágeno (especialmente tipos I, II, V, XI e IX), glicosaminoglicanos (hialuron) e glicoproteínas (fibrilina e opticina) (Sebag, 2014).

A rede de fibrilas de colágeno confere a essa estrutura a rigidez do corpo vítreo, e as moléculas de hialuronan preenchem esse espaço com a consistência de gel, promovendo uma estabilização. A distribuição de proteínas no vítreo não ocorre de forma uniforme, indicando diferentes atividades metabólicas em suas diferentes áreas. A estrutura do vítreo lhe confere uma característica de reservatório farmacológico, prolongando a ação de medicamentos como corticóides e anti-VEGF, sendo muito importante para o tratamento de doenças inflamatórias e vasculares.

A degeneração vítrea, também conhecida como sinérese vítrea, inicia-se na adolescência e o seu sintoma habitual são as moscas volantes, que são pequenas opacidades translúcidas móveis de diferentes formatos que se movem no campo visual, perceptíveis com os movimentos oculares. O córtex vítreo sofre uma redução desigual de densidade formando cavidades líquidas conhecidas como bursas (Sebag, 2014).

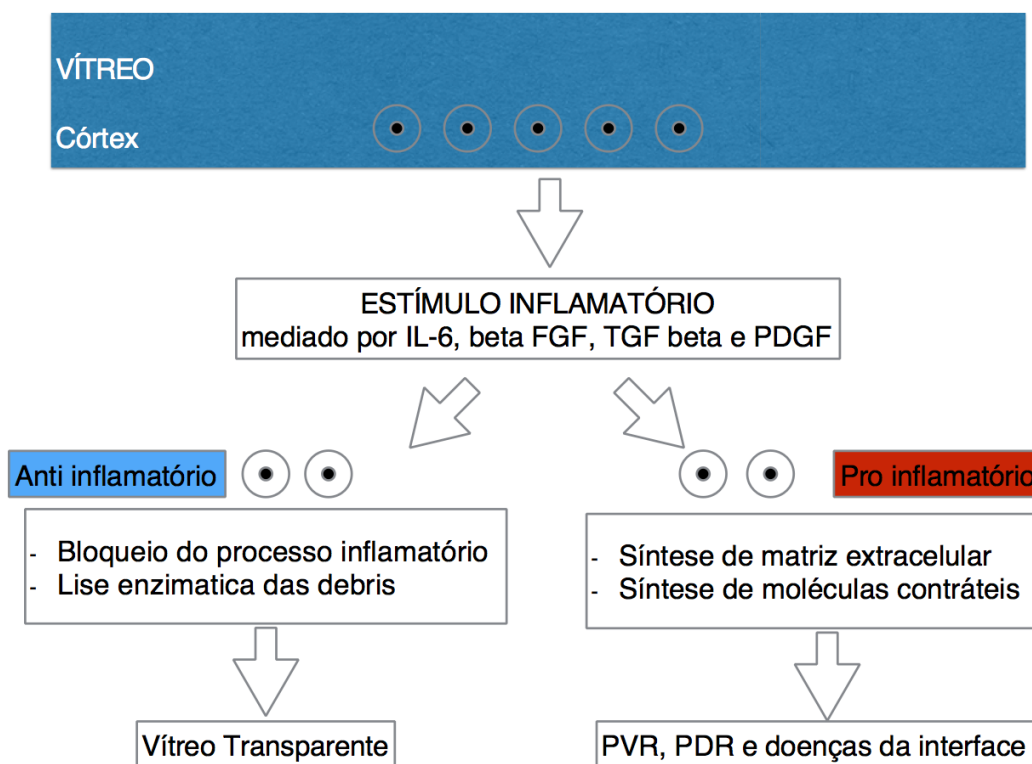
Com o processo de descolamento do vítreo posterior, algumas condições patológicas podem ocorrer, como a formação de roturas de retina, opérculos ou hemorragias vítreas, levando a um descolamento de retina. A tração exercida sobre a retina pode levar à formação de um buraco de mácula ou síndrome de tração vítreo macular. A delaminação e o remanescente do córtex vítreo sobre a retina associado à ativação de membranas contráteis pode levar à formação de membranas epirretínicas (Duker, 2013).

Apesar de raras, cerca de 90% das células do vítreo são constituídas por hialócitos, e o restante por fibroblastos. Os hialócitos podem ser encontrados no córtex, particularmente perto da base vítrea, do disco óptico e dos vasos da retina. Essas células apresentam características morfológicas, imunofenotípicas e funcionais se-

melhantes a macrófagos derivados de medula óssea, exceto por possuírem um número reduzido de lisossomos. Os hialócitos produzem colágeno e ácido hialurônico e têm sido identificados com anticorpos contra CD45, CD11a, CD64 e CD163 (ED-2) (Wu, 2014).

Dentre as possíveis funções dos hialócitos temos: a modulação das respostas imunes intravítreas, levando à inibição de reação imunológica (atividade anti-inflamatória), a remoção enzimática de fibrina que mantém a transparência do vítreo, a regressão do sistema vascular hialóide e a síntese da matriz extracelular.

Alterações patológicas dos hialócitos estão envolvidas com a retinopatia diabética, vitreorretinopatia proliferativa, membrana epirretínica, doenças da interface vítreo retiniana, assim como a formação de membranas cicatriciais contráteis. O aumento da celularidade vítreo é um indicativo de processos inflamatórios como uveítes intermediárias.



**Figura 1** - Hialócitos respondem a um estímulo inflamatório de forma bimodal (Wu e Hamassaki, 2017)

### 1.3 Doenças da interface vítreo-retínica

O ponto comum das doenças da interface vítreo-retínicas é a tração que é exercida sobre a retina. Essa tração é gerada pela tensão de forças entre o vítreo, em particular do córtex vítreo posterior, e a membrana limitante interna da retina. A tração pode ocorrer: a) na retina periférica, e, neste caso trataremos do descolamento de retina ou b) na região macular, e, neste caso, trataremos das doenças buraco de mácula e membrana epirretínica.

O descolamento de retina foi reconhecido pela primeira vez no início de 1700 por Saint-Yves, mas o diagnóstico clínico permaneceu como uma incógnita até Helmholtz inventar o oftalmoscópio em 1850. Em 1863, von Graefe descreveu a sua associação com roturas retínicas e o seu curso natural, o qual, quando não é tratado leva à perda visual irreversível (Figueroa; López-Caballero; Contreras, 2010). O descolamento de retina ocorre quando fortes mecanismos fisiológicos e anatômicos que mantêm a retina neurosensorial unida ao epitélio pigmentado são rompidos. Há três tipos de descolamento de retina: exsudativo, tracional e regmatogênico, sendo este último o mais prevalente (Siqueira e Oréfice, 2009).

A associação de alterações do vítreo que levam à formação de roturas retínicas, que conseqüentemente evolui com o descolamento regmatogênico, foi reconhecida logo após a invenção do oftalmoscópio indireto. Von Graefe afirmava que era necessário o corte de membranas do vítreo para o tratamento do descolamento de retina para aliviar as trações e restabelecer a anatomia e fisiologia da retina (von Graefe, 1863). A patogênese do descolamento de retina regmatogênico é complexa e envolve fatores hereditários, alterações da estrutura do vítreo e processos de adesão na interface vítreo-retínica, que predispõem à formação de roturas e conseqüente separação da retina neurosensorial do epitélio pigmentado da retina.

A incidência do descolamento de retina regmatogênico é de 0,015% da população geral. A prevalência é maior entre os altos míopes (5%) e entre os casos que apresentaram complicações na cirurgia de catarata (10%). Trata-se de potencial quadro de cegueira irreversível, e sua caracterização torna-se de suma importância na aplicação de medidas preventivas e curativas (Nassaralla e Nassaralla, 2004; Kara José; Alves; Oliveira, 1992).

O tratamento cirúrgico do descolamento de retina regmatogênico consiste em selar as roturas retínicas, aliviar as trações que o vítreo ou outras membranas exer-



cem e reaproximar o tecido neurossensorial ao epitélio pigmentado da retina. Os avanços no controle da fluídica, a melhora do corte da sonda de vitrectomia, evitando assim tração sobre a retina, e a diminuição do calibre, de forma geral, dos materiais empregados na cirurgia, permitiram que a cirurgia de descolamento de retina apresentasse um índice de sucesso anatômico de 90% dos casos (Tani; Robertson; Langworthy 1981; Stanford e Chignell, 1985). O princípio básico da cirurgia vitreoretínica em descolamento de retina é fechar e selar as roturas retínicas e liberar qualquer tração periretínica.

A formação da retinopatia vítreo proliferativa é responsável por 80% dos casos em que houve falha do tratamento cirúrgico e conseqüente recidiva do descolamento de retina (Zhao, 2018). A retinopatia vítreo-proliferativa se caracteriza pela proliferação celular de ambas superfícies da retina descolada e face posterior do vítreo, levando à formação de membranas contráteis perirretínicas (Siqueira et al., 2009). Inúmeras terapias médicas, como o uso de 5-fluoracil, corticóides, colchicinas e retinóides, foram usadas para evitar a formação da retinopatia vítreo proliferativa, mas sem sucesso (Siqueira, 2009).

O descolamento de retina tracional é a principal complicação da retinopatia diabética proliferativa. A formação de membranas contráteis, com a presença de neovasos, é responsável por hemorragias e descolamento de retina de difícil tratamento cirúrgico e pobre resultado visual.

A retinopatia vítreo-proliferativa pode ser vista como um processo de cicatrização de tecidos especializados. Esse processo é caracterizado pela migração e proliferação de vários tipos celulares, incluindo hialócitos, células do epitélio pigmentado da retina e células gliais de Müller. O estudo morfológico de membranas removidas cirurgicamente mostra que as membranas derivam de células como fibroblastos e macrófagos; entretanto, observa-se um aumento importante da expressão de  $\beta$ -tubulina classe III, indicador da expressão de células do epitélio pigmentado da retina (Sen, 1988)

O buraco macular é um defeito anatômico que leva à separação de todas as camadas da retina neural na região da fóvea. Ele foi descrito pela primeira vez em 1869 por Knapp e Noyes, e posteriormente classificado e explicado por Gass (1988). Baseado em observações clínicas de discretas lesões foveolares que o buraco macular causa, ele postulou o mecanismo de tração tangencial que o vítreo posterior

cortical exerce sobre a fóvea (Gass, 1988). Com o avanço tecnológico, em especial da tomografia de coerência óptica (OCT), observa-se com clareza o vítreo e a sua relação de tração e adesão sobre a fóvea, mesmo em estágios iniciais da doença. Os pacientes com buraco macular apresentam sintomas como metamorfopsias, escotoma central e perda da acuidade visual. O sinal de Watzke-Allen, o escotoma absoluto na linha que é observada durante exame de biomicroscopia de fundo, é importante para o diagnóstico da doença.

O buraco macular acomete indivíduos a partir da sétima década de vida, podendo também acometer pessoas mais jovens. A sua prevalência populacional é 0,33 a 0,7% e 7,8 casos novos a cada 100.000 por ano (Mitchell, 1997). Pode ser classificado, segundo o Internacional Vitreomacular Traction Study (IVTS), como pequeno (diâmetro do buraco menor que 250  $\mu\text{m}$ ), médio (250-400) e grande (diâmetro do buraco maior que 400  $\mu\text{m}$ ), baseado na medida mais estreita do buraco no exame de OCT (Duker, 2013). Casos iniciais podem apresentar uma melhora do quadro anatômico de forma espontânea. Entretanto, caso isso não ocorra, necessitam de um tratamento cirúrgico, que consiste na remoção do vítreo cortical posterior, indução do descolamento do vítreo posterior, remoção da membrana limitante interna, colocação de um gás tamponante ou ar ambiente, solicitando-se ao paciente que ele fique com a face voltada para baixo (Kelly e Wendel, 1991). O índice de sucesso anatômico de fechamento do buraco macular é de 90%, em geral, sendo que 45% dos casos tem uma boa recuperação visual (acuidade visual de 20/40 ou melhor). Todavia, em casos com buraco macular grande (maior que 400  $\mu\text{m}$ ), o índice de sucesso anatômico de fechamento cai para 44% (Tam, 2018).

Há diversas técnicas cirúrgicas para tentar a recuperação do paciente no caso de buracos maculares grandes e recorrentes. Michalewska descreveu a técnica do flap invertido da membrana limitante interna, que consiste em não a remover completamente, deixando-a presa na borda do buraco, e posicionando o flap invertido de forma que o cubra completamente. A técnica se aproveita do fato de que o flap da membrana limitante interna contém fragmentos da célula de Müller, que pode induzir gliose na retina e na superfície da membrana. Portanto, o flap funciona como uma membrana basal que orientará o processo de cicatrização e proliferação tecidual (Michalewska; Michalewski; Adelman, 2010).

O uso de medicamentos adjuvantes para o fechamento de buraco macular é estudado constantemente, dentre eles o TGF- $\beta$ . Quando ele é injetado durante a cirurgia, produz um efeito estimulador da fibrose, promovendo maior adesão entre retina e coróide, podendo ser estudado para auxiliar o tratamento de roturas retínicas em descolamento de retina e fechamento de buraco macular (Smiddy , 1989).

A membrana epirretínica possui várias nomenclaturas para descrevê-la, dentre elas temos dobra de retina primária, gliose retínica secundária, maculopatia em celofane, gliose pré-retínica macular, membrana vítreo pré-retínica, contração da interface vitreorretínica, pucker macular, membrana epirretínica astrocítica e proliferação epimacular. Ela causa baixa acuidade visual na região central do campo visual de forma gradual, e pode evoluir com metamorfopsias, micropsias e diplopia monocular. Os quadros iniciais, em geral, são assintomáticos e de lenta evolução.

Em geral acomete indivíduos acima de 50 anos e nessa faixa etária tem uma prevalência de 7-12% (Mitchell , 1997), época que coincide com o descolamento do vítreo posterior fisiológico. A membrana epirretínica foi descrita em associação com inúmeras condições oculares e doenças, entre elas doenças vasculares da retina, doenças oculares inflamatórias, pós trauma, condições pós cirúrgicas, tumores intraoculares e distrofias retinianas.

A lesão estrutural da região macular ocorre devido à formação de uma membrana celular contrátil na região pré-macular, e o tratamento cirúrgico consiste na sua remoção. Entretanto, o resultado visual final nem sempre é satisfatório. A biogênese da membrana pré-macular deriva de uma incompleta e anômala separação do vítreo posterior, permitindo que células e colágeno remanescentes permaneçam aderidos à mácula. Em geral, as principais células envolvidas na formação são os hialócitos e células de Müller, mas astrócitos, miofibroblastos, fibrócitos e células inflamatórias também são encontrados em estudos com membranas removidas cirurgicamente (Kenyon; Michels, 1977). Estudos demonstram a migração das células de Müller pelas roturas da membrana limitante interna causadas pela separação do vítreo, levando à formação de uma membrana contrátil (Bellhorn; Wise; Henkind, 1975).

A interface entre a retina e o vítreo tem um papel muito importante na patogênese dessas três doenças retínicas descritas, e, classicamente, quando ocorre na região macular, temos o buraco macular e a membrana epirretínica, também conhe-

cidas como doenças da interface vítreo-retínicas. O descolamento de retina regmatogênico também tem a sua patogênese nessa mesma interface, só que na região periférica da retina. Entretanto, ressaltamos que também envolve a interface retina e epitélio pigmentado da retina na evolução da doença, principalmente para formas complicadas como a retinopatia vítreo-proliferativa. Neste estudo, vamos utilizar o termo doenças da interface vitreoretínica para essas três doenças.

#### **1.4 Tipos celulares envolvidos na formação da membrana contrátil**

Os hialócitos são encontrados no vítreo cortical, adjacentes à superfície interna da retina. Em condições fisiológicas, os hialócitos contribuem para manter a transparência do vítreo, mas em doenças da interface retínicas, observam-se alterações morfológicas, alteração da matriz extracelular e aumento do número de hialócitos (Sebag, 2014).

As células do epitélio pigmentado da retina, em situações de descolamento de retina regmatogênico, são encontradas dispersas no vítreo e em membranas contráteis da retinopatia vítreo proliferativa. Em modelos animais de retinopatia vítreo proliferativa, observa-se que as células do epitélio pigmentado da retina sofrem transformações metaplásicas com morfologias semelhantes a macrófagos (Kita, 2008).

Estudos de membranas perirretínicas demonstram que as células do epitélio pigmentado da retina se transdiferenciam em miofibroblastos. As células fibroblásticas contêm miofibrilas em seu citoplasma (Leask; Holmes; Abraham, 2002) que produzem o efeito contrátil das membranas da retinopatia vítreo proliferativa. Clinicamente, isso leva a novo descolamento de retina, dificultando a execução de procedimentos cirúrgicos e, assim, comprometendo o resultado visual, sendo uma grande causa de cegueira legal em casos complicados.

As células gliais, particularmente as células de Müller, formam as membranas que levam a complicações importantes em doenças da interface vitreoretínicas e retinopatia diabética. Essas células são essenciais para o funcionamento da retina, em razão das suas funções estruturais, na barreira hemato-retínica, tamponamento de íons e neurotransmissores, entre outros. Membranas formadas apenas com células de Müller não têm características contráteis, sugerindo que os outros componentes celulares estão envolvidos com a propriedade tracional das membranas da retinopatia vítreo proliferativa, especialmente células do epitélio pigmentado da retina

(Bringmann; Wiedemann, 2009). Entretanto, as células de Müller exercem um importante papel na produção de citocinas e na regulação do processo de cicatrização da retina (Eastlake, 2015). Além de produtoras de citocinas, as células de Müller são alvos desses fatores inflamatórios. Por exemplo, se elas forem estimuladas com citocinas, como TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), elas adquirem a capacidade de gerar forças tracionais *in vitro* (Guidry, Bradley; King, 2003).

Portanto, a compreensão da patogênese da formação da retinopatia vítreo proliferativa é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Os fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ , IGF-1 e PDGF, fator de crescimento de hepatócitos e endotelinas, modulam a contração cicatricial das membranas pré-retinianas. (Bringmann et al, 2009)

### **1.5 TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional, com 3 isoformas (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3) que regula a diferenciação, apoptose, migração, resposta imunológica celular e produção de proteínas da matriz extracelular. Na via canônica, TGF- $\beta$  se liga e ativa receptores serina-treonina do tipo I e tipo II. Estes transduzem a sinalização até o núcleo através da fosforilação das proteínas R-SMADS (SMADS 2 e 3), que depois se associam a co-SMADs (SMAD4). O complexo SMAD acumula no núcleo e modula a transcrição de genes-alvo. O controle da via de TGF-beta ainda depende da regulação negativa exercida pelo SMAD inibitório (SMAD7) e pelas enzimas E3 de ubiquitinação Smurfs (Kimura et al, 2007).

No olho, TGF- $\beta$  é expresso acima do normal no vítreo de pacientes com retinopatia vítreo proliferativa, especialmente o TGF- $\beta$ 2, que foi a isoforma predominante. Ele também contribui na transdiferenciação de hialócitos em células miofibroblasto com alfa-actina de músculo liso, que são responsáveis pela contração do colágeno, sugerindo ainda sua atuação na contração de membranas das doenças da interface vítreo retínicas (Hirakayama et al., 2004).

As membranas contráteis estão relacionadas a uma proteína contrátil, a cadeia leve da miosina através da via actina-miosina, Rho-Kinase, que participa da adesão celular, migração, proliferação e apoptose, modulando diretamente a via da fosforilação da cadeia leve da miosina (Kita et al., 2008).

Em vítreo humano de pacientes com retinopatia vítreo proliferativa, detectou-se uma grande concentração de TGF-beta1 e TGF-beta-2. Em coelho, o bloqueio de Rho-kinase levou à formação de membranas sem contratilidade (Kita et al., 2008).

Estudos da membrana de retinopatia vítreo proliferativa demonstram que o PDGF está aumentado, e modelos experimentais sugerem que esse fator é um pré-requisito para a formação da retinopatia vítreo proliferativa. Existem cinco isoformas e dois tipos de receptores de PDGF. Os modelos experimentais de retinopatia vítreo proliferativa demonstram que os receptores alfa estão aumentados e têm um papel importante na contração de membranas perirretínicas (Lei et al., 2009).

## 1.6 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, endógenos e não codificantes. Eles inibem o processo de tradução de RNA mensageiro (mRNA) através do pareamento imperfeito, levando à sua posterior degradação (Kimura, 2007).

Descritas originalmente por Lee e Feinbaum, que em 1993, estudando *Caenorhabditis elegans*, observaram um pequeno RNA regulatório que não codifica proteínas, mas age como potente regulador pós-transcricional da expressão gênica (Lee, 1993). O miRNA let-7 foi o segundo miRNA descoberto em *C. elegans*, observando-se que a sua sequência é preservada entre espécies diferentes sendo o primeiro identificado em vertebrados (Pasquinelli, 2000).

Os miRNAs foram rapidamente associados a marcadores tumorais devido ao seu perfil preciso na discriminação de tecidos tumorais. Let-7 foi o primeiro miRNA a ser validado com a formação de tumores no pulmão (Johnson, 2005).

Wohl e Reh (2016) mostraram o perfil de expressão de miRNAs na célula de Müller de camundongos, e observaram que alguns miRNAs eram altamente expressos em neurônios, outros nas células de Müller e um terceiro tipo altamente expresso em glia de Müller e neurônios, caso da família let-7. Em zebrafish, os membros da família let-7 regulam a desdiferenciação de células de Müller e a regeneração da retina (Ramachandran; Fausett; Goldman, 2010).

A associação de miRNA com as doenças oculares, principalmente as doenças vítreo-retínicas, têm aumentado nos últimos anos (Kaneko e Terasaki, 2017). Foi observada a participação de miR-29 no desenvolvimento de membranas fibróticas,

sendo que, em condições fisiológicas, ele funciona como um importante mediador na síntese de matriz extracelular em trabeculado humano (Villarreal et al., 2011). Takayama e colaboradores (2016) mostraram níveis aumentados de miR-148a no vítreo de pacientes com descolamento de retina; além disso, a transfecção com miR-148 mimético em células do epitélio pigmentado promoveu aumento da expressão da alfa-actina do músculo liso e aumento da migração.

Estudos em modelos de retinopatia diabética em olhos de ratos, correlacionam o aumento da concentração de miR-146 (Kovacs, 2011) e o miR-200b, modulando o fator de crescimento vascular no vítreo (McArthur, 2011).

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo indica que os miRNAs são modulados pelas vias inflamatórias e exercem importantes efeitos na modulação da matriz extracelular, visto que:

1. TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 induziram diminuição da expressão de let-7 linhagem humana de células de Müller (MIO-M1) e na linhagem de rato de células de Müller (rMC-1) em determinadas condições;
2. TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 não alteraram a expressão gênica das cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno tipo 1, mas alteraram da enzima de síntese de hialuronan em células de Müller da linhagem humana MIO-M1;
3. COL1A2 é alvo de let7-b, segundo o ensaio de gene reporter por luciferase;
4. let-7c inibe a contratilidade das células gliais de Müller da linhagem MIO-M1;
5. let-7 está presente em amostra de vítreo humano com retinopatia vítreo-proliferativa.

Dessa forma, neste estudo concluímos que o micro-ambiente das células de Müller na retina vítreo-proliferativa, caracterizado pelo aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, leva a uma diminuição dos miRNA da família let7. Consequentemente, é possível que haja remodelação da matriz extracelular, levando à formação de membranas densas e contráteis.

Esses resultados devem contribuir tanto para o entendimento como para o desenvolvimento de alvos terapêuticos mais eficientes para o tratamento das doenças da interface vítreo-retínica.



## REFERÊNCIAS\*

Bellhorn FA, Wise GN, Henkind P. Ultrastructure and clinicopathologic correlation of idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol*. 1975 Mar; 79: 366-73.

Benz F, et al. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013 Sep; 45(9): 42.

Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009 Jul; 247(7): 865–83.

Bu SC, et al. Substrate Elastic Modulus Regulates the Morphology, Focal Adhesions, and alpha-smooth Muscle Actin Expression of Retinal Muller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Sep; 56(10): 5974-82.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr; 162(1): 156-9.

Danda R, et al. Targeted Expression of Suicide Gene by Tissue-Specific Promoter and MicroRNA Regulation for Cancer Gene Therapy. *PLoS ONE*. 2013 Dec; 8(12): e83398.

Duker JS, et al. The Internacional Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction and macular hole. *Ophthalmology*. 2013 Dec; 120(12), 2611-9.

---

\*De acordo com: Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: <HTTPS://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform.requirements.html>

Dzobo K, Leaner VD, Parker MI. Absence of feedback regulation in the synthesis of COL1A1. *Life Sci.* 2014 May;103(1): 25-33.

Eastlake K, et al. Müller Glia as an Important Source of Cytokines and Inflammatory Factors Present in the Gliotic Retina During Proliferative Vitreoretinopathy. *Glia.* 2016 Apr; 64(4): 495-606.

Ebihara N, et al. Expression and function of fibroblast growth factor-inducible 14 in human corneal myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* 2009 Aug; 89(2): 256-262.

Figueroa MS, López-Caballero C; Contreras I. Resultados anatómicos y funcionales de la vitrectomía aislada en el tratamiento del desprendimiento de retina regmatógeno pseudofáquico. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2010; 85: 59-63.

Fulzele S, et al. MicroRNA-146b-3p Regulates Retinal Inflammation by Suppressing Adenosine Deaminase-2 in Diabetes. *BioMed Research International* [internet]. 2015 Mar [citado em 01 mar 2015] 15:846501. doi:10.1155/2015/846501. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359882/>

Gass JDM. Idiopathic senile macular hole: its early stages and pathogenesis. *Arch Ophthalmol.* 1988 May;106(5): 629-39.

Guidry C, Bradley KM, King, JL. Tractional force generation by human Müller cells: growth factor responsiveness and integrin receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Mar; 44(3): 1355-63.

Hirayama K, et al. The involvement of the Rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:3896–3903.

Hirota K, et al. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015 Mar; 253(3): 335-42.

Honjo Y, et al. Neuron-specific TGF-beta signaling deficiency results in retinal detachment and cataracts in mice. *Biochem Biophys Res Com*. 2007 Feb; 352(2): 418-22.

Iannetti L, et al. Role of the Intravitreal Growth Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Epiretinal Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:3896–3903. 2011 Jul; 52(8): 5786-9.

Inoue Y, et al. Hyaluronan dynamics during retinal development. *Brain Research*. 2009 Feb; 1256: 55-60.

Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Apr; 11(4):252–63.

Ji J, et al. Let-7g targets collagen type I  $\alpha 2$  and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010 May ;52(5):690-7.

Johnson SM, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 may; 120(5): 635-47.

Kakkassery V, et al. Vitreous microRNA levels as diagnostic biomarkers for vitreoretinal lymphoma. *Blood*. 2017 Jun; 129(23):3130-3.

Kara José N, Alves M e Oliveira P. Como educar a população para a prevenção do trauma ocular. *Arq Bras Oftalmol*, 55:160-2,1992.

Katsman D, et al. Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Muller Cells of the Retina. PLoS ONE. 2012 Nov 7(11), e50417.

Kei T, et al. Increased Ocular Levels of MicroRNA-148a in Cases of Retinal Detachment Promote Epithelial–Mesenchymal Transition. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016 Jun; 57(6):2699-705. doi:10.1167/iovs.15-18660.

Kelly NE, Wendel RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study. Arch Ophthalmol. 1991 May; 109(5): 654-659.

Kenyon KR, Michels RG. Ultrastructure of epirretinal membrane removed by pars plana vitreoretinal surgery. Am J Ophthalmol. 1977 Jun; 86(6), 815-23.

Kimura ET et al. TGF $\beta$ , activina e sinalização SMAD em câncer de tireóide. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2007 v. 51, p. 683-689.

Kita T, et al. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. PNAS. 2008 Nov, 105 (45), 17504-9. doi: 10.1073/pnas.0804054105.

Kovacs B et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jun 21;52(7):4402-9.

Krol L, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat. Rev. Genet. 2010 Nov; 11(9);597-610.

Leask A, Holmes A, Abraham DJ: Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. Curr Rheumatol Rep. 2002.4:136-142.

Lei H et al. Growth Factors outside the PDGF Family Drive Experimental PVR. IOVS 2009; 50 (7) 3394-3403.

Limb GA, et al. In Vitro Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Müller Cell Line (MIO-M1). Invest Ophthalmol Visual Science. 2002 Mar; 43(3): 864-869.

Limb GA, et al. Distribution of cytokine proteins within epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res. 1994 Nov; 13(11);791–8.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods. 2001 Dec; 25(4):402-8.

Lutty G A, et al. Heterogeneity in localization of isoforms of TGF-beta in human retina, vitreous, and choroid. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1993 Mar; 34(3): 477-87.

McArthur K, et al. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. Diabetes. 2011 Apr;60(4):1314-23.

Ménard C, et al. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. Oncotarget. 2016 Apr; 7(15):19171-84. doi:10.18632/oncotarget.8280.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016 Jun;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.

Mestdagh P, et al. The miR-17 92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- $\beta$  pathway in neur blastoma. Mol Cell. 2010 Dec 10; 40(5):762–73.

Michalewska Z, Michalewski J, Adelman RA. Inverted internal limiting membrane flap technique for large macular holes. *Ophthalmology*. 2010 Oct; 117 (10), 2018-25.

Mitchell P, et al. Prevalence and association of epirretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1997 Jun; 104(6):1033-1040.

Nassaralla JR JJ e Nassaralla BA. Degenerações periféricas da retina do olho míope X LASIK. *Arq Bras Oftalmol*. 2004; 67(2).

Novoa-Herran S, et al. Serum depletion induces changes in protein expression in the trophoblast-derived cell line HTR-8/SVneo. *Cell Mol Biol Lett*. 2016 Oct; 16: 21-22.

Odriozola A, et al. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of concept pilot study. *Int J Legal Med* [internet]. 2013 Dec [citado em 20 Dec 2012]; 127: 573-8.

Park JT, et al. Repression of let-7 by transforming growth factor- $\beta$ 1-induced Lin28 upregulates collagen expression in glomerular mesangial cells under diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol*; 2014 Dec; 307 (12): 1390-1403.

Pasquinelli AE, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov; 408(6808): 86–9.

Peter M.E. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle*. 2009 Mar; 8(6), 843-52.

Ragusa M, et al. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases. *Mol Vis*. 2013; 19:430-40.

Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D. *Ascl1a* regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol.* 2010 Nov;12(11):1101-7.

Ramachandran R, et al. Conditional gene expression and lineage tracing of *tuba1a* expressing cells during zebrafish development and retina regeneration. *J. Comp. Neurol.* 2010 Oct, 518(20): 4196-212.

Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia.* 2013 May; 61(5): 651-78.

Russo A, et al. miRNAs in the vitreous humor of patients affected by idiopathic epiretinal membrane and macular hole. *PLoS ONE* 2017 Mar;12(3): e0174297.

Sarthy VP, et al. Establishment and characterization of a retinal Muller cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Jan; 39 (1): 212–6.

Schwarzenbach H, et al. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clinical chemistry.* 2015 Nov; 61(11): 1333-42.

Sebag J. *Vitreous: in Health and Disease.* New York: Springer 2014.

Sen HA, et al. The role of breakdown of the blood-retinal barrier in cell-injection models of proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol,* 1988; 106: 1685-1687.

Sherman LS, et al. Hyaluronan Synthesis, Catabolism, and Signaling in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Cell Biology* [internet]. 2015 Sep [citado em 10 Sep 2015]: 368584.

Shifera AS, Hardin JA. Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem* [internet]. 2010; 396(2):167-72.

Siqueira RC e Oréfica F. Descolamento de retina e vitreorretinopatia proliferativa. Exame clínico da retina e vítreo. Rio de Janeiro: Cultura Médica: p. 96, 2009.

Skeie JM, Roybal CN, Mahajan VB. Proteomic Insight into the Molecular Function of the Vitreous. *PLoS ONE* [internet]. 2015 May]; 10(5): e0127567.

Smiddy WE, et al. Transforming growth factor beta. A biologic chorioretinal glue. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107, 577–80.

Stanford MR, Chignell AH. Surgical treatment of superior bullous rhegmatogenous retinal detachments. *Br J Ophthalmol*. 1985; 69:729-32.

Sun Q, et al. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res*. 2008 May; 36(8): 2690–9.

Takayama K et al. Increased Ocular Levels of MicroRNA-148a in Cases of Retinal Detachment Promote Epithelial-Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 May 1;57(6):2699-705.

Tam ALC, et al. The current surgical management of large, recurrent, or persistent macular holes. *Retina*. 2018 Jul; 38(7): 1263-75.

Tani P, Robertson DM, Langworthy A. Prognosis for central vision and anatomic reattachment in rhegmatogenous retinal detachment with macula detached. *Am J Ophthalmol*. 1981; 92:611-2.



Tuo J, et al. "Distinct microRNA-155 Expression in the Vitreous of Patients with Primary Vitreoretinal Lymphoma and Uveitis." *American journal of ophthalmology*. 2014 Mar; 157(3): 728–34.

Usui-Ouchi A, et al. Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with Development of Proliferative Vitreoretinal Disease. *PLoS ONE* 2016 Jun [11(6): e0158043.

Vecino E, et al. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Mar; 51:1-40.

Villarreal Jr et al., Coordinated Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by the MicroRNA-29 Family in the Trabecular Meshwork. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011; vol. 52 (6) 3391-339.

Wilkins JR, et al. Characterization of Epiretinal Membranes Using Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 1996 Dec; 103(12): 2142-51.

Wohl SG, Reh TA. The microRNA expression profile of mouse Müller glia in vivo and in vitro. *Sci Rep*. 2016 Oct 14;6: 35423.

Yafai Y, et al. Muller glial cells inhibit proliferation of retinal endothelial cells via TGF-beta2 and Smad signaling. *Glia*. 2014 Sep; 62(9): 1476-85.

Wu DC, Hamassaki DE. Anatomia, Fisiologia e Embriologia do Vítreo. In Frazão MAM. *CBO-Diagnóstico em Oftalmologia da Anamnese à Genética*. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 2017.

Zhao XY, et al. Vitrectomy for patientes with proliferative vitreoretinopathy retinal detachment: a meta-analysis of prospective studies. *Retina*. 2018 Jul; 28 (3), 462-470.