

GABRIELA DE JESUS LUSTOZA COSTA

MicroRNAs miR-9, miR-16, miR-21 e miR-204 durante o desenvolvimento da retina e do vítreo

Tese apresentada ao Programa de Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki

Versão parcial corrigida.

São Paulo

2023

RESUMO

COSTA, G.J.L. **MicroRNAs miR-9, miR-16, miR-21 e miR-204 durante o desenvolvimento da retina e do vítreo.** 2023. p. 75. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

As alterações que ocorrem na retina e no vítreo com o decorrer dos anos predisõem os indivíduos a várias doenças oculares, que incluem glaucoma, degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética, entre outras. Retina e vítreo estão intimamente relacionados, principalmente via células gliais de Müller, cujos prolongamentos terminam junto à membrana limitante interna, localizada na interface entre essas estruturas. Com a idade, o vítreo começa a sofrer um processo de liquefação e isso aumenta o risco de um descolamento parcial do vítreo posterior, precedendo outras patologias vítreo retinianas, que podem levar até a uma ruptura e descolamento de retina, ocasionado perda de visão severa ou total. Embora os mecanismos não sejam completamente compreendidos, os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes que atuam regulando a expressão gênica e interferindo em vários processos fisiológicos e patológicos, podem estar envolvidos. Nossa hipótese é que os miRNAs podem estar alterados com a idade e com isso modular e participar da remodelação do vítreo que ocorre durante o envelhecimento. Assim, nosso objetivo foi investigar a expressão de miR-9, miR-16, miR-21 e miR-204 na retina e no vítreo de ratos neonatos, adultos e idosos, bem como os componentes da matriz vítrea que são seus alvos preditos. MiR-9 e miR-16 foram mais expressos na retina de neonatos em comparação com adultos/idosos, enquanto miR-21 e miR-204 foram mais expressos em adultos em comparação com neonatos e idosos. O miR-204 foi significativamente aumentado no vítreo adulto/idoso em comparação com o neonato. Entre os alvos preditos investigados, a enzima de síntese de hialuronan (hialuronan sintase 2, *Has2*) apresentou níveis mais elevados na retina do neonato e uma expressão diminuída no adulto/idoso. Os perfis de expressão opostos mostraram uma possível regulação da expressão de *Has2* por miR-204. A superexpressão com miR-204-mimic em culturas primárias de células de Müller de ratos e da linhagem humana MIO-M1 atenuou a expressão de *Has2*, enquanto a inibição com anti-miR-204 teve o efeito oposto. Além disso, miR-204-mimic diminuiu significativamente a proliferação das células de Müller de ratos e humanas e o anti-miR-204 aumentou na

MIO-M1. Em suma, os miRNAs podem sofrer alterações com a idade e com isso influenciar componentes da matriz extracelular, como é o caso de miR-204 que pode atenuar a expressão de hialuronan durante o envelhecimento, evento que pode ser relevante para a liquefação do vítreo e descolamento do vítreo posterior.

Palavras-chave: Retina. Vítreo. Glia.

ABSTRACT

COSTA, G.J.L. **miR-9, miR-16, miR-21 and miR-204 microRNAs during development of retina and vitreous.** 2023. p. 75. Thesis (Ph.D. thesis in Life Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The changes that occur in the retina and vitreous over the years predispose individuals to various eye diseases, including glaucoma, age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, among others. Retina and vitreous are closely related, mainly via Müller's glial cells, whose extensions end at the internal limiting membrane, located at the interface between these structures. With age, the vitreous undergoes liquefaction, increasing the risk of a posterior vitreous partial detachment, that precedes other vitreous retinal pathologies, which can lead to retinal rupture and detachment, causing severe or total vision loss. Although the mechanisms are not fully understood, microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs that act by regulating gene expression and interfering with various physiological and pathological processes, may be involved. Our hypothesis is that miRNAs may be altered with age and thus modulate and participate in the vitreous remodeling that occurs during aging. Thus, our aim was to investigate the expression of miR-9, miR-16, miR-21 and miR-204 in the retina and vitreous of newborn, adult, and aging rats, as well as the components of the vitreous matrix that are their predicted targets. MiR-9 and miR-16 were more expressed in the retina of neonates compared to adults/aging, while miR-21 and miR-204 were more expressed in adults compared to neonates and aging. miR-204 was significantly increased in adult/aging vitreous compared to neonate. Among the predicted targets investigated, the hyaluronan synthesizing enzyme (hyaluronan synthase 2, Has2) showed higher levels in the neonate retina, and a decreased expression in the adult/aging. The opposing expression profiles suggested a possible regulation of Has2 expression by miR-204. Overexpression with miR-204-mimic in primary cultures of rat Müller cells and the human lineage MIO-M1 attenuated Has2 expression, while anti-miR-204 had the opposite effect. Furthermore, the miR-204-mimic significantly decreased cell proliferation of rat and human Müller cells and the anti-miR-204 increased MIO-M1 cell proliferation. In summary, miRNAs can undergo changes with age and thus influence extracellular matrix components, such as miR-204, which can

attenuate hyaluronan expression during aging, an event that may be relevant to vitreous liquefaction and posterior vitreous detachment.

Keywords: Retina. Vitreous. Glia.

1 INTRODUÇÃO

A deficiência visual em diferentes níveis até a perda total da visão afeta pessoas de várias idades, interferindo com atividades motoras, sociais, emocionais e cognitivas de crianças, adultos e idosos. No entanto, a maior porcentagem está acima dos 50 anos, de modo que o envelhecimento se torna um dos principais riscos para várias doenças oculares, que incluem glaucoma, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade e membrana epirretiniana, entre outras. Esse panorama se torna mais relevante, se considerarmos que a porcentagem da população mundial acima de 65 anos é de 9,7% em 2022 e deve chegar a 11,7% em 2030 e 16,4% em 2050, segundo estimativas da ONU (2022 Revision of World Population Prospects; <https://population.un.org/wpp/>). O foco desta tese será em duas estruturas do globo ocular: retina e vítreo.

1.1. RETINA

A retina está localizada na parte posterior e mais interna do globo ocular, sendo formada por uma estrutura laminar com 3 camadas de corpos celulares (camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada de células ganglionares) entremeadas por 2 camadas de plexos (camadas plexiformes externa e interna), além de uma camada de células epiteliais pigmentadas mais externamente (epitélio pigmentado da retina) (Fig.1).

As células epiteliais pigmentadas estão situadas entre a coróide e os fotorreceptores, com papéis críticos na fagocitose dos segmentos externos de fotorreceptores, reciclagem de vitamina A, transporte de nutrientes, absorção dos raios luminosos e manutenção da barreira hemato-retiniana (LAKKARAJU et al., 2020). A luz atravessa as diversas camadas da retina para atingir as células fotossensíveis (cones e bastonetes), que convertem fótons em sinais eletroquímicos que são enviados para células bipolares e destas para as células ganglionares, cujos axônios formam o nervo óptico e levam essas informações para áreas visuais encefálicas. Esse fluxo de informação vertical entre fotorreceptores- células bipolares- células ganglionares, que tem glutamato como principal neurotransmissor, sofre uma interação lateral a partir de células horizontais e células amácrinas nas camadas plexiformes externa e interna, respectivamente.

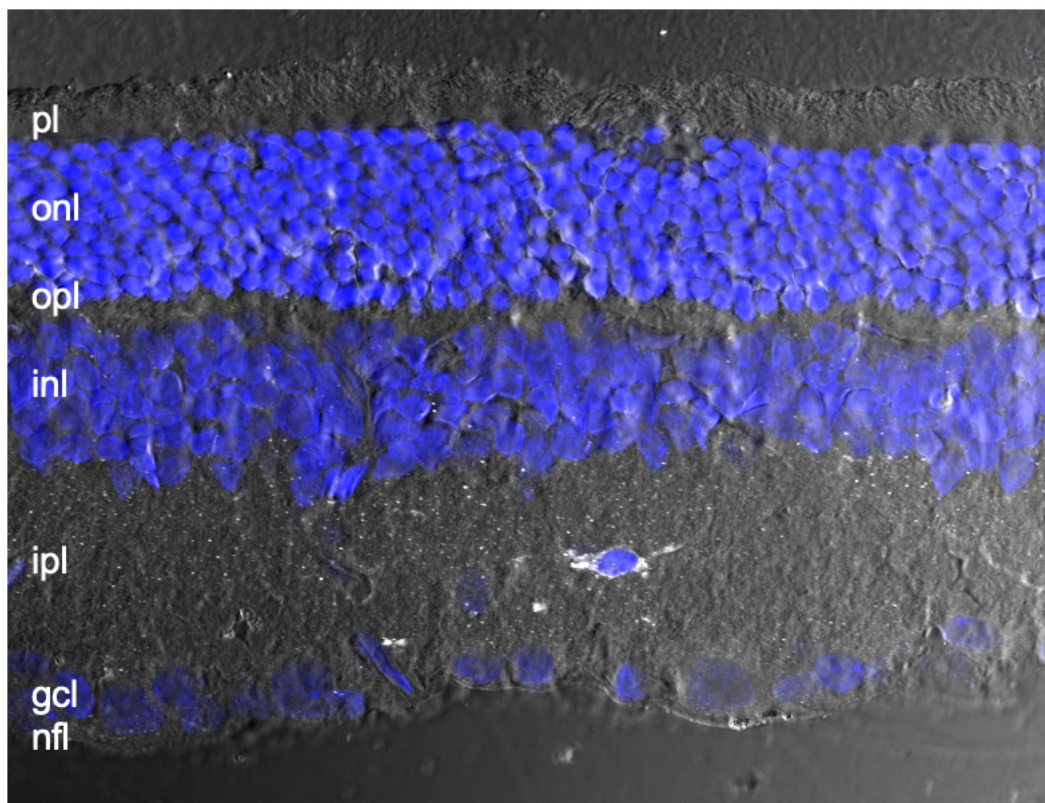


Fig.1. A estrutura laminar da retina.

Fotomicrografia de corte transversal da retina de rato com os núcleos corados em azul (DAPI). Os corpos celulares dos diferentes tipos estão localizados na: 1) camada nuclear externa (onl): fotorreceptores; 2) camada nuclear interna (inl): células horizontais, bipolares, amácrinas e glia de Müller; 3) camada de células ganglionares (gcl): células ganglionares. Abaixo, na camada de fibras nervosas (nfl), estão os axônios das células ganglionares. As sinapses ocorrem nas camadas plexiforme externa (opl) e interna (ipl). O epitélio pigmentado da retina não está presente nesta imagem, mas situa-se acima da camada de segmentos externos dos fotorreceptores. O vítreo encontra-se abaixo da camada de axônios retinianos. Abreviaturas: pl, camada de segmentos externos de fotorreceptores; opl, camadas plexiforme externa; ipl, camada plexiforme interna; nfl, camada de axônios retinianos. Fonte: Gabriela de Jesus Lustoza Costa (2023).

Além dos neurônios (células fotorreceptoras, bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares), células da microglia (microgliócitos) e da macroglia (astrócitos e células de Müller) contribuem e compartilham diversas funções para manter a homeostase da retina (REICHENBACH; BRINGMANN, 2019; VECINO et al., 2016).

Exceto pelas células da microglia, que derivam de progenitores do saco vitelínico (ALLIOT; GODIN; PESSAC, 1999), as demais se originam dos progenitores do neuroectoderma, composto por duas camadas que formarão o epitélio pigmentado da retina e a retina neural. As células ganglionares começam a se diferenciar por volta do 11º dia embrionário em camundongo, seguidas dos cones, células horizontais e parte das amácrinas (WALLACE, 2011). A maior parte das células amácrinas, as células bipolares e gliais de Müller atingem o pico de densidade após o nascimento, enquanto os bastonetes são gerados desde o período pré-natal (WALLACE, 2011).

Em condições fisiológicas, os microgliócitos, células imunes residentes da retina, localizam-se principalmente na retina mais interna e mostram-se altamente ramificados. Essas características se modificam nas patologias, visto que adquirem um aspecto ameboide e se movimentam para o local da injúria. Os microgliócitos interagem com o microambiente e com outras células da retina por meio de citocinas, fatores neurotróficos e tóxicos, sintetizados e liberados em diferentes condições (FAN et al., 2022; GUO et al., 2022). Juntamente com oligodendrócitos e astrócitos, os microgliócitos estão presentes também no nervo óptico (VECINO et al., 2016).

Os astrócitos situam-se na camada de fibras nervosas e estão correlacionados à presença e distribuição dos vasos sanguíneos, de modo que retinas avasculares são desprovidas dessas células. Entre as suas funções, estão a regulação da vascularização da retina, íons, neurotransmissores, manutenção da barreira hemato-retiniana, entre outras, que compartilha com as células de Müller (REICHENBACH; BRINGMANN, 2019; VECINO et al., 2016). As células de Müller constituem o tipo de predominante de macroglia (~90% da glia na retina; VECINO et al., 2016).

As **células de Müller** desempenham papéis essenciais na manutenção estrutural, regulação do volume do espaço extracelular, homeostase de água e íons, manutenção da barreira hemato-retiniana, reciclagem de neurotransmissores como glutamato e GABA, liberação de gliotransmissores (ex: glutamato, ATP e adenosina), e suporte trófico para outras células. Atuam ainda como fibra óptica e nos processos regenerativos (CARPI-SANTOS et al., 2022; REICHENBACH; BRINGMANN, 2019; SUBIRADA et al., 2017; VECINO et al., 2016).

Além da importância para o funcionamento da retina normal, as células de Müller são ativas durante a injúria da retina. Elas respondem por meio de um processo denominado de gliose com o intuito de proteger, promover o reparo do tecido e limitar a remodelação (BRINGMANN et al., 2006). Esse processo é caracterizado por alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais, que dependem do tipo e do grau de comprometimento, levando à hipertrofia celular, aumento de filamentos intermediários, tais como vimentina e proteína ácida fibrilar glial, proliferação, diminuição da expressão de glutamina sintetase (enzima que converte glutamato em glutamina), entre outros. Vimentina e glutamina sintetase, além da proteína de ligação do retinaldeído celular (CRALBP) têm sido comumente empregados como marcadores de células de Müller (VECINO et al., 2016). A princípio, a gliose tem efeito protetor e reparador, mas pode resultar em cicatrização glial, com aumento da matriz extracelular, inibição da regeneração axonal e posterior degeneração (BRINGMANN; WIEDEMANN, 2012).

As células de Müller produzem e liberam muitos fatores inflamatórios e citocinas. Eastlake et al. (2016) mostraram que dos 102 fatores inflamatórios examinados por *array* de proteínas, 76 foram identificados em células de Müller da linhagem humana MIO-M1. Um grande número desses fatores estava aumentado na retina gliótica de pacientes com retinopatia vítreo-proliferativa, uma complicação do descolamento de retina, em comparação à retina normal. Assim, as células de Müller junto com microglia e astrócitos, têm papel relevante nas reações de defesa e da manutenção do balanço pró- e anti-inflamatório (EASTLAKE et al., 2016).

Tendo em vista a localização estratégica, morfologia, relação com outras células e funções, as células de Müller têm sido consideradas como potenciais alvos terapêuticos. Essas células gliais emitem projeções que englobam vasos, pericários de neurônios e seus processos, constituindo o centro de uma subunidade colunar

funcional. Juntamente com astrócitos, células endoteliais e pericitos, as células de Müller participam da formação da barreira hemato-retiniana, fornecendo um ambiente de privilégio imune para a retina (REICHENBACH; BRINGMANN, 2019; SUBIRADA et al., 2017; VECINO et al., 2016).

Os corpos celulares da glia de Müller se localizam na camada nuclear interna e seus prolongamentos radiais se estendem por quase toda a extensão da retina externa e interna. Seus microvilos se projetam para o espaço subretiniano, chegando até a membrana limitante externa, estrutura composta de junções de adesão e de oclusão entre células de Müller e segmentos internos de fotorreceptores (OMRI et al., 2010). Os pés vasculares das células de Müller terminam junto à membrana limitante interna, uma membrana basal na interface entre a retina e o vítreo, considerada frequentemente como a membrana basal das células de Müller (OMRI et al., 2010).

Semelhante a outras membranas basais, a membrana limitante interna é composta por proteínas da matriz extracelular que incluem colágenos (tipos IV, VI e XVIII), laminina, nidogênio, fibronectina, hialuronan, perlecan, distroglican, agrina e proteoglicanos de sulfato de condroitina (ZHANG; JOHNSON, 2021). Embora alguns trabalhos sugiram que esses componentes, exceto pela agrina, sejam produzidos pelo epitélio ciliar e/ou cristalino (HALFTER et al., 2008), foi mostrado que as células de Müller da linhagem humana MIO-M1 têm a capacidade de sintetizar colágenos tipos I-VII, IX e XI (BU et al., 2015; PONSIOEN et al., 2008). A membrana limitante interna é composta por uma lâmina rara externa que margeia o vítreo e uma lâmina densa do lado retiniano; uma possível lâmina rara interna parece ser um artefato da microscopia. Além de fornecer uma barreira física para as macromoléculas, a membrana limitante interna ancora o vítreo cortical à retina, como pode ser observada pelas densidades focais ou placas de adesão, possivelmente constituídas por hemidesmossomas, encontradas na superfície das células de Müller (GUIDRY; BRADLEY; KING, 2003; PHILIPS et al., 2022).

1.2. VÍTREO

O vítreo é uma matriz gelatinosa altamente hidratada (98-99% de água) e transparente, que ocupa $\frac{3}{4}$ do globo ocular humano e está localizado no segmento

posterior entre o cristalino e a retina. Embora suas funções ainda não tenham sido bem estabelecidas, parece atuar: 1) na proteção dos tecidos intraoculares contra estresse oxidativo, infecção e desequilíbrio energético; 2) no controle do crescimento e forma do globo ocular durante o desenvolvimento; 3) na absorção de choques; 4) como barreira contra a invasão celular, migração e difusão de macromoléculas, o que pode favorecer na manutenção da transparência (LE GOFF; BISHOP, 2008; SEBAG, 2020; SKEIE; ROYBAL; MAHAJAN, 2015).

O desenvolvimento do vítreo começa após a separação entre o neuroectoderma e o ectoderma superficial na vesícula óptica. A princípio é formado o vítreo primário, que consiste em componentes fibrilares produzido por células da futura retina interna e da vesícula do cristalino, e se desenvolve junto com uma rede transitória de vasos sanguíneos composta pelo sistema hialóide (artéria hialóide, vasa hialoide própria e túnica vasculosa lentis) (PONSIOEN et al., 2016). Uma fotomicrografia do sistema hialoide em rato neonato pode ser observada na Fig. 2. Esses vasos são importantes para a nutrição e sofrem regressão espontânea após formação do cristalino e o surgimento dos vasos na retina, ocorrendo antes do nascimento, como em humanos, ou depois, como nos roedores (ITO; YOSHIOKA, 1999; TANIGUCHI et al., 1999). As células presentes entre esses vasos (hialócitos) e que serão melhor descritas posteriormente, têm papel fundamental no processo de regressão (ZHU et al., 2000). Com a regressão dos vasos hialoides ocorre uma remodelação e reorganização dos componentes fibrilares, formando o vítreo secundário ou avascular, composto principalmente por colágeno tipo II e hialuronan (LOS et al., 2000; LOS; VAN LUYN NIEUWENHUIS, 2000; PONSIOEN et al., 2016).

Tendo em vista a íntima relação entre o vítreo e a retina, as duas estruturas podem sofrer alterações que refletem os processos fisiopatológicos que ocorrem em cada uma delas. Por meio de proteômica, Skeie, Roybal e Mahajan (2015) analisaram 4 áreas distintas do vítreo humano localizadas centralmente ou adjacentes à retina (cortical), corpo ciliar (basal), ou cristalino (hialoide anterior). A análise proteômica mostrou diferenças regionais e o vítreo como um tecido biologicamente ativo, sugerindo uma interação dinâmica entre o vítreo e as estruturas vizinhas, assim como a retina como fonte potencial de mediadores inflamatórios (SKEIE; ROYBAL; MAHAJAN, 2015).

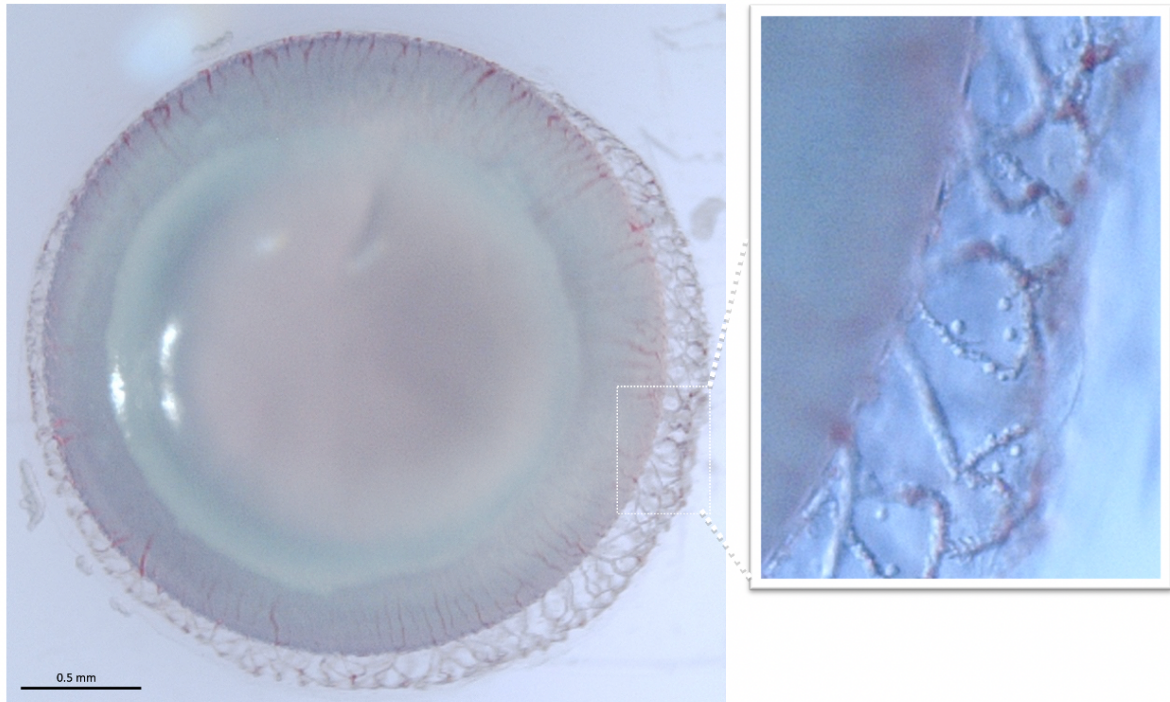


Fig. 2. Sistema de vasos hialoide no rato neonato.

Fotomicrografia evidencia o cristalino e o sistema de vasos hialoide no rato com 5 dias de vida. No detalhe em maior aumento são observados os vasos hialoides, assim como a presença hialócitos entre eles, antes desse sistema sofrer regressão espontânea. Fonte: Gabriela de Jesus Lustoza Costa (2023).

A matriz vítrea é composta principalmente por uma rede de colágenos e hialuronan como o principal glicosaminoglicano, assunto extensamente revisado por vários autores (BISHOP, 2014; LE GOFF; BISHOP, 2008; PONSIOEN; HOOYMANS; LOS, 2010; SEBAG, 2020). No vítreo foram encontrados: 1) colágenos, tais como colágenos fibrilares tipo II (60-75% do total), tipos V/XI (10-25%) e do colágeno IX não fibrilar (até 25%) e colágeno tipo VI; 2) glicosaminoglicanos não sulfatados, tais como o hialuronan (aproximadamente 96% do total em bovinos, PENG et al., 2018) e os sulfatados (condroitim sulfato e heparan sulfato); 3) proteínas não colagenosas: fibrilina-1 e fibrilina-2, fibulina, optocinina; 4) metaloproteinases, capazes de clivar colágenos tipo II (MMP-1 e MMP-8) e tipos V/XI e IX (MMP-2). Além desses componentes da matriz vítrea pode ser encontrada uma pequena população de macrófagos já mencionados anteriormente, os hialócitos (KITA; SAKAMOTO; ISHIBASHI, 2014; QIAO et al., 2005).

Os **hialócitos** têm sido bem menos investigados que outras células oculares e exibem morfologia distinta, podendo ser arredondados ou mais fusiformes, com núcleo lobular, presença de grânulos secretórios e Golgi desenvolvido (SAKAMOTO; ISHIBASHI, 2011). A morfologia distinta, assim como a capacidade de proliferação e adesão parecem depender da localização (SOMMER et al., 2009). Essas células são encontradas dispersas no interior do vítreo e nas interfaces com a retina e corpo ciliar, este último responsável pela produção do humor aquoso (KITA et al., 2014). Os hialócitos humanos expressaram marcadores de células monócitos/macrófagos (CD45, CD11a, CD64 e complexo principal de histocompatibilidade classe II); no entanto, não expressaram o marcador de macrófagos teciduais CD68 (LAZARUS; HAGEMAN, 1994).

Estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies sugerem que os hialócitos participam da manutenção da transparência, síntese de proteínas da matriz extracelular, modulação de processos imunológicos e inflamatórios, assim como da regressão da vasculatura fetal hialoide (KITA et al., 2008; KITA; SAKAMOTO; ISHIBASHI, 2014; SAKAMOTO; ISHIBASHI, 2011; ZHU et al., 2000). Como se trata de uma população muito pequena de células e difícil de ser isolada, as funções dos hialócitos ainda estão sendo esclarecidas.

Estudos mais recentes têm contribuído para o conhecimento do papel de hialócitos nas funções oculares. Utilizando RNA-seq de populações purificadas

(BONEVA et al., 2020) e citometria de massa por imagem (BONEVA et al., 2021), os autores confirmaram que os hialócitos são membros do sistema mononuclear fagocitário. A análise transcricional por meio de RNA-seq de hialócitos humanos identificou genes comuns associados a leucócitos, tais como *PTPRC* (CD45), *ITGAL* (CD11a), *Cx3CR1*, *FCGR1A* (CD64), *CD163* (ED2), genes que codificam o complexo principal de histocompatibilidade classe II, mas muito pouco de CD68, marcador seletivo para monócitos e macrófagos teciduais. Esses genes estão associados ao processamento/ apresentação de antígenos e modulação imunológica, o que sugere uma contribuição para o privilégio imunológico ocular e para o controle das doenças vítreo-retinianas (BONEVA et al., 2020). Genes envolvidos na síntese de matriz extracelular, como versican (*VCAN*), colágenos (*COL5A1* e *COL9A2*) e fibronectina, mas também na degradação de hialuronan (*HYAL2*) foram detectados por esses autores. Apesar de uma similaridade de cerca de 98% com microglia da retina, existem diferenças entre essas células, visto que 496 genes foram significativamente mais expressos em hialócitos do que em microgliócitos (WOLF et al., 2022).

1.3. ENVELHECIMENTO

As alterações decorrentes do envelhecimento envolvem processos biológicos diversos que incluem instabilidade genômica, modificações epigenéticas, homeostase de proteínas, disfunção mitocondrial, alterações de mecanismos reguladores pós-transcricionais, inflamação local, senescência celular e comunicação intracelular alterada (CAMPELLO et al., 2021).

A perda de visão em idosos decorre desde a opacificação da lente e aberrações ópticas, além de disfunção e/ ou morte de células da retina. Neste caso, a visão sob condições de luminosidade baixa (visão escotópica) parece ser mais prejudicada do que a visão fotópica, que permite distinção de cores. Isso está diretamente relacionado ao fato de que na retina de humanos os bastonetes que são responsáveis pela visão escotópica são mais vulneráveis ao envelhecimento do que os cones, responsáveis pela visão fotópica; pelo menos metade da perda total de bastonetes na retina periférica ocorre entre 20 e 40 anos de idade (GAO; HOLLYFIELD, 1992). Alterações morfológicas e funcionais também são observadas em astrócitos (MANSOUR et al. 2008, RAMIREZ et al. 2001) e microglia (DAMANI et

al., 2011; MA; WONG 2016), comprometendo o fluxo de informações da retina para o encéfalo.

O vítreo também passa por uma série de modificações moleculares e estruturais com o envelhecimento, visualizadas como aumento de lacunas preenchidas com fluidos (sínquise) e de estruturas opticamente densas (sinerese), que podem interferir com a passagem de luz, causando sintomas conhecidos como “moscas volantes” (miodesopsias). Estas podem ser inofensivas, mas frequentes e muito incômodas para algumas pessoas, assim como podem impactar a visão ao prejudicar a sensibilidade ao contraste, interferindo com a qualidade de vida do paciente (PONSIOEN; HOOYMANS; LOS, 2010; SEBAG, 2020).

Além disso, a liquefação do vítreo pode ser seguida por um enfraquecimento das adesões do vítreo com a retina, levando a um descolamento do vítreo posterior total e inofensivo ou parcial e anômalo. O descolamento anômalo do vítreo posterior pode ter consequências diversas na retina, como roturas e descolamentos de retina na região periférica, assim como tração vítreo-macular e formação de membranas fibrocontráteis na região macular, assim como hemorragias retinianas e neovascularização (DA SILVA et al., 2022; SEBAG, 2004; WU, 2018). Células de Müller e hialócitos podem ter um papel relevante na progressão dessas doenças (DA SILVA et al., 2022; JONES et al., 2022).

Uma das sugestões para a liquefação vítrea seria a diminuição na concentração de hialuronan com a idade (ITAKURA et al., 2009), levando a uma desidratação vítrea e enrijecimento da fase sólida por agregação de fibrilas de colágeno (TRAM; SWINDLE-REILLY, 2018). Alterações de colágeno também podem ser relevantes nesse processo, incluindo diminuição de colágeno IX com o envelhecimento, causando agregação de colágeno II. Alternativamente, a ação enzimática sobre o colágeno poderia vir acompanhado de síntese, levando à sinerese e sínquise (LOS et al., 2003; PONSIOEN; HOOYMANS; LOS, 2010). Embora o conhecimento ainda seja limitado sobre os mecanismos que levam a esta degradação da matriz extracelular vítrea, enzimas diversas produzidas pelos hialócitos ou mesmo por células de Müller poderiam também participar deste processo, degradando colágeno e mesmo hialuronan.

Outros fatores podem ainda contribuir para a remodelação do vítreo e em processos degenerativos, tais como os microRNAs, que serão descritos a seguir.

1.4. MICRORNAS

MicroRNAs (miRNAs) são sequências curtas de RNAs não codificantes, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que se ligam predominantemente à região 3'UTR de mRNAs e atuam regulando a expressão gênica e interferindo em amplos processos fisiológicos e patológicos (BARTEL, 2004). Os primeiros RNAs pequenos não-codificantes foram descritos em *C. elegans*, participando da regulação do desenvolvimento larval: lin-4 (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993) e o let-7 (REINHART et al, 2000). A partir daí, vários outros foram clonados de diferentes espécies, inibindo a tradução ou desestabilizando os mRNAs alvo (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LEE; AMBROS, 2001).

Os miRNAs canônicos são derivados de transcritos primários mais longos (pri-miRNAs) transcritos pela RNA polimerase II e depois clivados no núcleo pelo complexo DGCR8 e a Drosha, gerando transcritos menores em forma de grampo (pré-miRNAs). Os pré-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma, onde são clivados pela RNase Dicer, gerando transcritos de fita dupla (miRNA:miRNA). Uma das fitas do duplex de miRNA, o miRNA maduro, juntamente com a proteína Argonauta formam um complexo silenciador induzido por RNA (RISC), enquanto a outra fita é degradada. O pareamento com o mRNA alvo provocará a degradação do mesmo e o pareamento imperfeito provocará a inibição da tradução. Alguns miRNAs não canônicos, como por exemplo o miR-451, não necessitam da clivagem catalisada por Dicer (BARTEL, 2018).

Esses miRNAs podem atuar via vesículas extracelulares provenientes da membrana plasmática ou endossomal, conhecidas como microvesículas e exossomos, respectivamente. As vesículas extracelulares são extremamente importantes para a comunicação intercelular, sendo utilizado como veículos para a transferência, não apenas de miRNAs, mas também de proteínas citosólicas e de membrana, lipídeos e RNAs codificantes. Uma variedade de processos fisiológicos e biológicos parecem ser regulados por vesículas extracelulares, incluindo patologias

como: câncer, doenças infecciosas e doenças neurodegenerativas (RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013), tornando-as relevante para os estudos terapêuticos.

Embora a utilização dos miRNAs como marcadores moleculares tenha sido investigada em alguns sistemas, o conhecimento sobre a função biológica dessas moléculas permanece em aberto. Os miRNAs participam no controle das vias de sinalização relevantes envolvidas em diversas doenças, o que os torna interessante para o tratamento de câncer, insuficiência cardíaca, diabetes, Alzheimer e doenças vítreo-retinianas, entre outras patologias (ESTELLER, 2011; DORN, 2011; SUNDERMEIER; PALCZEWSKI, 2012).

MicroRNAs têm sido descritos na retina e em outros tecidos oculares, revelando padrões distintos de distribuição temporal e espacial e que podem ser relevantes para o seu papel biológico (HUANG et al., 2008; KARALI et al., 2007, 2010, 2016; KARALI; BANFI, 2018; RYAN; OLIVEIRA-FERNANDES; LAVKER, 2006; SUNDERMEIER; PALCZEWSKI, 2012; XU, 2009; XU et al., 2007). Apenas 20 (e.g., let-7a, let-7f, miR-9, miR-21, miR-26, miR-27b, miR-29c, miR-30, miR-92a, miR-96, miR-99b, miR-124, miR-125, miR-127, miR-181, miR-182, miR-183, miR-191, miR-192, miR-204) dos 480 miRNAs detectados na retina humana, representaram cerca de 90% do miRNoma da retina (KARALI et al. 2016). Alguns miRNAs já foram investigados em determinados tipos celulares e incluem células do epitélio pigmentado de humanos (KARALI et al. 2016), assim como cones (BUSSKAMP et al. 2014), bastonetes (SUNDERMEIER et al. 2014) e células de Müller (WOHL; REH, 2016) de camundongos. Os estudos acima têm mostrado que muitos miRNAs apresentam padrões de expressão específicos para cada tecido e estágios de desenvolvimento, sugerindo papéis também específicos na retina e em outros tecidos oculares.

Certos miRNAs, como por exemplo os da família let-7, têm sido correlacionados a processos que ocorrem com o envelhecimento, incluindo a opacificação do cristalino (PENG et al., 2012), redução na proliferação de progenitores musculares (DRUMMOND et al., 2011) e redução de componentes da matriz no vítreo (AKAMINE et al., 2021). Estudos do nosso laboratório mostraram que, de modo geral, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f e let-7i sofreram regulação positiva com o envelhecimento da retina e do vítreo de ratos, modulando a expressão de hialuronan sintase 2, enzima de síntese de hialuronan (AKAMINE et al., 2021).

Em 2013, miRNAs foram descritos no vítreo humano após vitrectomia em pacientes com melanoma coroidal, descolamento de retina ou buraco macular (RAGUSA et al., 2013). A partir daí, outros estudos analisaram miRNAs no vítreo de pacientes com degeneração macular relacionada à idade (MÉNARD et al., 2016), retinopatia vítreo-proliferativa (TORO et al., 2020; USUI-OUCHI et al., 2016), retinopatia diabética proliferativa (FRIEDRICH et al., 2020; HIROTA et al., 2014; MAMMADZADA et al., 2019; USUI-OUCHI et al., 2016), miopia (ANDO et al., 2022), membrana epirretiniana idiopática e buraco macular (RUSSO et al., 2017).

Wohl e Reh (2016) investigaram o perfil de miRNAs nas células de Müller *in vivo* e *in vitro* de camundongos Rbp-CreER: Stopf/f-tdTomato jovens (11-12 dias de vida) e adultos. Os autores encontraram miRNAs com altos níveis de expressão em: 1) células de Müller: miR-204, miR-9 e miR-125-5p foram, respectivamente, 18, 9 e 7 vezes mais expressos do que em neurônios; 2) neurônios: miR-181a, let-7g, miR-30c e let-7d; 3) neurônios e células de Müller: miR-720, let-7b, miR-29a, miR-30d, miR-335-5p e miR-16. A maioria dos miRNAs diminuiu de expressão em células de Müller isoladas e mantidas em cultura por até 2 semanas (ex: miR-204, miR-9 e família let-7), mas alguns, como miR-21, aumentaram a expressão em cerca de 90%.

Usui-Ouchi et al. (2016) mostrou uma desregulação de alguns dos miRNAs acima citados em doenças da interface vítreo-retiniana, como retinopatias vítreo-proliferativa e diabética proliferativa. Enquanto o vítreo de pacientes com essas retinopatias apresentou uma diminuição nos níveis de miR-9 e miR-204 em relação ao controle, miR-16 e miR-21 foram regulados positivamente. A expressão de miR-21 também aumentou após tratamento de células do epitélio pigmentado com TGF-beta ou alta concentração de glicose *in vitro*. Os estudos de ganho e perda de função indicaram que miR-21 induziu proliferação e migração das células epiteliais pigmentadas, mas não afetou a expressão gênica de fibronectina, α -SMA, e N-caderina, relacionadas à transição epitelial-mesenquimal, característica dessas doenças fibrocontráteis.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que os miRNAs apresentam perfis distintos de expressão com a idade, contribuindo para a modulação de componentes da matriz extracelular. Especificamente, miR-204 pode modular a síntese de hialuronan e, possivelmente, interferir com as modificações moleculares e estruturais que ocorrem com o envelhecimento e nas doenças vítreo-retinianas.

REFERÊNCIAS*

ADIJANTO, J.; CASTORINO, J. J.; WANG, Z.-X.; MAMINISHKIS, A.; GRUNWALD, G. B.; PHILP, N. J. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, no. 24, p. 20491–503, 2012.

AKAMINE, P. S.; LIMA, C. R.; LUSTOZA-COSTA, G. J.; FUZIWARA, C. S.; DEL DEBBIO, C. B.; KIMURA, E. T.; SANTOS, M. F.; HAMASSAKI, D. E. Age-related increase of let-7 family microRNA in rat retina and vitreous. **Experimental Eye Research**, vol. 204, p. 108434, Mar. 2021.

ALLIOT, F.; GODIN, I.; PESSAC, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. **Developmental Brain Research**, vol. 117, no. 2, p. 145–152, Nov. 1999.

ANDO, Y.; KEINO, H.; INOUE, M.; HIROTA, K.; TAKAHASHI, H.; SANO, K.; KOTO, T.; SATO, T.; TAKEUCHI, M.; HIRAKATA, A. Circulating Vitreous microRNA as Possible Biomarker in High Myopic Eyes with Macular Hole. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 7, p. 3647, 26 Mar. 2022.

ARORA, A.; GUDURIC-FUCHS, J.; HARWOOD, L.; DELLETT, M.; COGLIATI, T.; SIMPSON, D. A. Prediction of microRNAs affecting mRNA expression during retinal development. **BMC Developmental Biology**, vol. 10, no. 1, 6 Jan. 2010.

BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. **Cell**, vol. 173, no. 1, p. 20–51, Mar. 2018.

BEREIMIPOUR, A.; NAJAFI, H.; MIRSANE, E. S.; MORADI, S.; SATARIAN, L. Roles of miR-204 in retinal development and maintenance. **Experimental Cell Research**, vol. 406, no. 1, p. 112737, Sep. 2021.

BISHOP, P. N. In vitreous proteins. **Vitreous**. New York, NY: Springer, 2014. p. 3–12.

BONEVA, S. K.; WOLF, J.; ROSMUS, D.-D.; SCHLECHT, A.; PRINZ, G.; LAICH, Y.; BOECK, M.; ZHANG, P.; HILGENDORF, I.; STAHL, A.; REINHARD, T.; BAINBRIDGE, J.; SCHLUNCK, G.; AGOSTINI, H.; WIEGHOFER, P.; LANGE, C. A. K. Transcriptional Profiling Uncovers Human Hyalocytes as a Unique Innate Immune Cell Population. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, 11 Sep. 2020.

BONEVA, S. K.; WOLF, J.; HAJDÚ, R. I.; PRINZ, G.; SALIÉ, H.; SCHLECHT, A.; KILLMER, S.; LAICH, Y.; FAATZ, H.; LOMMATZSCH, A.; BUSCH, M.; BUCHER, F.; STAHL, A.; BÖHRINGER, D.; BENGSCHE, B.; SCHLUNCK, G.; AGOSTINI, H.; LANGE, C. A. K. In-Depth Molecular Characterization of Neovascular Membranes Suggests a Role for Hyalocyte-to-Myofibroblast Transdifferentiation in Proliferative Diabetic Retinopathy. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, 2 Nov. 2021.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOV, S.; OSBORNE, N.; REICHENBACH, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 25, no. 4, p. 397–424, Jul. 2006.

* * De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BRINGMANN, A.; WIEDEMANN, P. Müller Glial Cells in Retinal Disease. **Ophthalmologica**, vol. 227, no. 1, p. 1–19, 2012.

BU, S.-C.; KUIJER, R.; VAN DER WORP, R. J.; POSTMA, G.; RENARDEL DE LAVALETTE, V. W.; LI, X.-R.; HOOYMANS, J. M. M.; LOS, L. I. Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and In Vitro Studies on the Effect of TGF- β on Müller Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 56, no. 11, p. 6506, 8 Oct. 2015.

BUSSKAMP, V.; KROL, J.; NELIDOVA, D.; DAUM, J.; SZIKRA, T.; TSUDA, B.; JÜTTNER, J.; FARROW, K.; SCHERF, B.; ALVAREZ, C.; GENOUD, C.; SOTHILINGAM, V.; TANIMOTO, N.; STADLER, M.; SEELIGER, M.; STOFFEL, M.; FILIPOWICZ, W.; ROSKA, B. miRNAs 182 and 183 Are Necessary to Maintain Adult Cone Photoreceptor Outer Segments and Visual Function. **Neuron**, vol. 83, no. 3, p. 586–600, Aug. 2014.

CAMPELLO, L.; SINGH, N.; ADVANI, J.; MONDAL, A. K.; CORSO-DÍAZ, X.; SWAROOP, A. Aging of the Retina: Molecular and Metabolic Turbulences and Potential Interventions. **Annual Review of Vision Science**, vol. 7, no. 1, p. 633–664, 15 Sep. 2021.

CARPI-SANTOS, R.; DE MELO REIS, R. A.; GOMES, F. C. A.; CALAZA, K. C. Contribution of Müller Cells in the Diabetic Retinopathy Development: Focus on Oxidative Stress and Inflammation. **Antioxidants**, vol. 11, no. 4, p. 617, 1 Apr. 2022.

CHEN, Q.; QIU, F.; ZHOU, K.; MATLOCK, H. G.; TAKAHASHI, Y.; RAJALA, R. V. S.; YANG, Y.; MORAN, E.; MA, J. Pathogenic Role of *microRNA-21* in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPAR α . **Diabetes**, vol. 66, no. 6, p. 1671–1682, 7 Mar. 2017.

CONTE, I.; CARRELLA, S.; AVELLINO, R.; KARALI, M.; MARCO-FERRERES, R.; BOVOLENTA, P.; BANFI, S. miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 107, no. 35, p. 15491–15496, 16 Aug. 2010.

CONTE, I.; HADFIELD, K. D.; BARBATO, S.; CARRELLA, S.; PIZZO, M.; BHAT, R. S.; CARISSIMO, A.; KARALI, M.; PORTER, L. F.; URQUHART, J.; HATELEY, S.; O'SULLIVAN, J.; MANSON, F. D. C.; NEUHAUSS, S. C. F.; BANFI, S.; BLACK, G. C. M. MiR-204 is responsible for inherited retinal dystrophy associated with ocular coloboma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 112, no. 25, 8 Jun. 2015.

DA SILVA, R. A.; RODA, V. M. de P.; MATSUDA, M.; SIQUEIRA, P. V.; LUSTOZA-COSTA, G. J.; WU, D. C.; HAMASSAKI, D. E. Cellular components of the idiopathic epiretinal membrane. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, vol. 260, no. 5, p. 1435–1444, 1 May 2022.

DAMANI, M. R.; ZHAO, L.; FONTAINHAS, A. M.; AMARAL, J.; FARISS, R. N.; WONG, W. T. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. **Aging Cell**, vol. 10, no. 2, p. 263–276, 29 Dec. 2010.

DENG, C.-L.; HU, C.-B.; LING, S.-T.; ZHAO, N.; BAO, L.-H.; ZHOU, F.; XIONG, Y.-C.; CHEN, T.; SUI, B.-D.; YU, X.-R.; HU, C.-H. Photoreceptor protection by mesenchymal stem cell transplantation identifies exosomal MiR-21 as a therapeutic for retinal degeneration. **Cell Death & Differentiation**, vol. 28, no. 3, p. 1041–1061, 20 Oct. 2020.

DORN, G. W. MicroRNAs in cardiac disease. **Translational Research**, vol. 157, no. 4, p. 226–235, Apr. 2011.

DRUMMOND, M. J.; MCCARTHY, J. J.; SINHA, M.; SPRATT, H. M.; VOLPI, E.; ESSER, K. A.; RASMUSSEN, B. B. Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. **Physiological Genomics**, vol. 43, no. 10, p. 595–603, May 2011.

DU, S. W.; PALCZEWSKI, K. MicroRNA regulation of critical retinal pigment epithelial functions. **Trends in Neurosciences**, vol. 45, no. 1, p. 78–90, Jan. 2022.

EASTLAKE, K.; BANERJEE, P. J.; ANGBOHANG, A.; CHARTERIS, D. G.; KHAW, P. T.; LIMB, G. A. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. **Glia**, vol. 64, no. 4, p. 495–506, 10 Nov. 2015.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, vol. 12, no. 12, p. 861–874, 18 Nov. 2011.

FAN, W.; HUANG, W.; CHEN, J.; LI, N.; MAO, L.; HOU, S. Retinal microglia: Functions and diseases. **Immunology**, vol. 166, no. 3, p. 268–286, 22 Apr. 2022.

FRIEDRICH, J.; STEEL, D. H. W.; SCHLINGEMANN, R. O.; KOSS, M. J.; HAMMES, H.-P.; KRENNING, G.; KLAASSEN, I. microRNA Expression Profile in the Vitreous of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients and Differences from Patients Treated with Anti-VEGF Therapy. **Translational Vision Science & Technology**, vol. 9, no. 6, p. 16, 19 May 2020.

GAO, H.; HOLLYFIELD, J. G. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 33, p. 1–17, Jan. 1992.

GARANTZIOTIS, S.; SAVANI, R. C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. **Matrix Biology**, vol. 78-79, p. 1–10, May 2019.

GUIDRY, C.; BRADLEY, K. M.; KING, J. L. Tractional Force Generation by Human Müller Cells: Growth Factor Responsiveness and Integrin Receptor Involvement. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 44, no. 3, p. 1355, 1 Mar. 2003.

GUO, L.; CHOI, S.; BIKKANAVAR, P.; CORDEIRO, M. F. Microglia: Key Players in Retinal Ageing and Neurodegeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, vol. 16, p. 804782, 17 Mar. 2022.

HACKLER, L.; WAN, J.; SWAROOP, A.; QIAN, J.; ZACK, D. J. MicroRNA Profile of the Developing Mouse Retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 51, no. 4, p. 1823, 1 Apr. 2010.

HALFTER, W.; DONG, S.; DONG, A.; ELLER, A. W.; NISCHT, R. Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. **Eye**, vol. 22, no. 10, p. 1207–1213, 1 Oct. 2008.

HAMMER, D. X.; AGRAWAL, A.; VILLANUEVA, R.; SAEEDI, O.; LIU, Z. Label-free adaptive optics imaging of human retinal macrophage distribution and dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 117, no. 48, p. 30661–30669, 9 Nov. 2020.

HICKS, D.; COURTOIS, Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture. **Experimental Eye Research**, vol. 51, no. 2, p. 119–129, Aug. 1990.

HIROTA, K.; KEINO, H.; INOUE, M.; ISHIDA, H.; HIRAKATA, A. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, vol. 253, no. 3, p. 335–342, 27 Jun. 2014.

HUANG, K. M.; DENTCHEV, T.; STAMBOLIAN, D. MiRNA expression in the eye. **Mammalian Genome**, vol. 19, no. 7-8, p. 510–516, 22 Jul. 2008.

ISHIKAWA, M.; SAWADA, Y.; YOSHITOMI, T. Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. **Experimental Eye Research**, vol. 133, p. 3–18, Apr. 2015.

ITAKURA, H.; KISHI, S.; KOTAJIMA, N.; MURAKAMI, M. Decreased Vitreal Hyaluronan Levels with Aging. **Ophthalmologica**, vol. 223, no. 1, p. 32–35, 27 Oct. 2008.

ITO, M.; YOSHIOKA, M. Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. **Anatomy and Embryology**, vol. 200, no. 4, p. 403–411, 20 Aug. 1999.

JAYARAM, H.; CEPURNA, W. O.; JOHNSON, E. C.; MORRISON, J. C. MicroRNA Expression in the Glaucomatous Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, no. 13, p. 7971, 17 Dec. 2015.

JONES, C. H.; GUI, W.; SCHUMANN, R. G.; BONEVA, S. K.; LANGE, C. A. K.; VAN OVERDAM, K. A.; CHUI, T. Y. P.; ROSEN, R. B.; ENGELBERT, M.; SEBAG, J. Hyalocytes in proliferative vitreo-retinal diseases. *Expert Review of Ophthalmology*, vol. 17, no. 4, p. 263–280, 4 Jul. 2022.

KARALI, M.; BANFI, S. Non-coding RNAs in retinal development and function. **Human Genetics**, vol. 138, no. 8-9, p. 957–971, 5 Sep. 2018.

KARALI, M.; GUADAGNINO, I.; MARROCCO, E.; DE CEGLI, R.; CARISSIMO, A.; PIZZO, M.; CASAROSA, S.; CONTE, I.; SURACE, E. M.; BANFI, S. AAV-miR-204 Protects from Retinal Degeneration by Attenuation of Microglia Activation and Photoreceptor Cell Death. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, vol. 19, p. 144–156, Mar. 2020.

KARALI, M.; PELUSO, I.; GENNARINO, V. A.; BILIO, M.; VERDE, R.; LAGO, G.; DOLLÉ, P.; BANFI, S. miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye. **BMC Genomics**, vol. 11, no. 1, Dec. 2010.

KARALI, M.; PELUSO, I.; MARIGO, V.; BANFI, S. Identification and Characterization of MicroRNAs Expressed in the Mouse Eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 48, no. 2, p. 509, 1 Feb. 2007.

KARALI, M.; PERSICO, M.; MUTARELLI, M.; CARISSIMO, A.; PIZZO, M.; SINGH MARWAH, V.; AMBROSIO, C.; PINELLI, M.; CARRELLA, D.; FERRARI, S.; PONZIN, D.; NIGRO, V.; DI BERNARDO, D.; BANFI, S. High-resolution analysis of the human retina miRNome reveals isomiR variations and novel microRNAs. **Nucleic Acids Research**, vol. 44, no. 4, p. 1525–1540, 26 Jan. 2016.

KITA, T.; HATA, Y.; ARITA, R.; KAWAHARA, S.; MIURA, M.; NAKAO, S.; MOCHIZUKI, Y.; ENAIDA, H.; GOTO, Y.; SHIMOKAWA, H.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; ISHIBASHI, T. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 105, no. 45, p. 17504–17509, 11 Nov. 2008.

KITA, T.; SAKAMOTO, T.; ISHIBASHI, T. Hyalocytes – essential cells in vitreo-retinal health and disease. **Vitreous – in Health & Disease**. New York: Springer, 2014. p. 151–164.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. **Science**, vol. 294, no. 5543, p. 853–858, 26 Oct. 2001.

LAKKARAJU, A.; UMAPATHY, A.; TAN, L. X.; DANIELE, L.; PHILP, N. J.; BOESZEBATTAGLIA, K.; WILLIAMS, D. S. The cell biology of the retinal pigment epithelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 78, p. 100846, Sep. 2020.

LAZARUS, H. S.; HAGEMAN, G. S. In Situ Characterization of the Human Hyalocyte. **Archives of Ophthalmology**, vol. 112, no. 10, p. 1356, 1 Oct. 1994.

LE GOFF, M. M.; BISHOP, P. N. Adult vitreous structure and postnatal changes. **Eye**, vol. 22, no. 10, p. 1214–1222, 29 Feb. 2008.

LEE, R. C.; AMBROS, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, vol. 294, no. 5543, p. 862–864, 26 Oct. 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, vol. 75, no. 5, p. 843–854, Dec. 1993.

LI, H.-J.; SUN, Z.-L.; PAN, Y.-B.; SUN, Y.-Y.; XU, M.-H.; FENG, D.-F. Inhibition of miRNA-21 promotes retinal ganglion cell survival and visual function by modulating Müller cell gliosis after optic nerve crush. **Experimental Cell Research**, vol. 375, no. 2, p. 10–19, Feb. 2019.

LIMB, G. A.; SALT, T. E.; MUNRO, P. M.; MOSS, S. E.; KHAW, P. T. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). **Investigative ophthalmology & visual science**, vol. 43, p. 864–869., 2002.

LIU, Y.; YANG, Q.; FU, H.; WANG, J.; YUAN, S.; LI, X.; XIE, P.; HU, Z.; LIU, Q. Müller gliaderived exosomal miR-9-3p promotes angiogenesis by restricting sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 in diabetic retinopathy. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, vol. 27, p. 491–504, Mar. 2022.

LIVESEY, F. J.; CEPKO, C. L. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 2, no. 2, p. 109–118, 1 Feb. 2001.

LOS, L. I.; VAN LUYN, M. J. A.; EGGLI, P. S.; DIJK, F.; NIEUWENHUIS, P. Vascular Remnants in the Rabbit Vitreous Body. II. Enzyme Digestion and Immunohistochemical Studies. **Experimental Eye Research**, vol. 71, no. 2, p. 153–165, Aug. 2000.

LOS, L. I.; VAN LUYN, M. J. A.; NIEUWENHUIS, P. Vascular Remnants in the Rabbit Vitreous Body. I. Morphological Characteristics and Relationship to Vitreous Embryonic Development. **Experimental Eye Research**, vol. 71, no. 2, p. 143–151, Aug. 2000.

LOS, L. I.; WORP, R. J. van der; LUYN, M. J. A. van; HOOYMANS, J. M. M. Age-Related Liquefaction of the Human Vitreous Body: LM and TEM Evaluation of the Role of Proteoglycans and Collagen. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 44, no. 7, p. 2828–2833, 1 Jul. 2003.

MA, W.; WONG, W. T. Aging Changes in Retinal Microglia and their Relevance to Age-related Retinal Disease. **Retinal Degenerative Diseases**, p. 73–78, 2 Oct. 2015.

MAMMADZADA, P.; BAYLE, J.; GUDMUNDSSON, J.; KVANTA, A.; ANDRÉ, H. Identification of Diagnostic and Prognostic microRNAs for Recurrent Vitreous Hemorrhage in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. **Journal of Clinical Medicine**, vol. 8, no. 12, p. 2217, 15 Dec. 2019.

MANSOUR, H.; CHAMBERLAIN, C. G.; WEIBLE II, M. W.; HUGHES, S.; CHU, Y.; CHAN-LING, T. Aging-related changes in astrocytes in the rat retina: imbalance between cell proliferation and cell death reduces astrocyte availability. **Aging Cell**, vol. 7, no. 4, p. 526–540, Aug. 2008.

MÉNARD, C.; REZENDE, F. A.; MILOUDI, K.; WILSON, A.; TÉTREAU, N.; HARDY, P.; SANGIOVANNI, J. P.; DE GUIRE, V.; SAPIEHA, P. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. **Oncotarget**, vol. 7, no. 15, p. 19171–19184, 22 Mar. 2016.

MEYER, K.; PALMER, J. W. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 107, no. 3, p. 629–634, Dec. 1934.

NISHITSUKA, K.; KASHIWAGI, Y.; TOJO, N.; KANNO, C.; TAKAHASHI, Y.; YAMAMOTO, T.; HELDIN, P.; YAMASHITA, H. Hyaluronan production regulation from porcine hyalocyte cell line by cytokines. **Experimental Eye Research**, vol. 85, no. 4, p. 539–545, Oct. 2007.

OMRI, S.; OMRI, B.; SAVOLDELLI, M.; JONET, L.; THILLAYE-GOLDENBERG, B.; THURET, G.; GAIN, P.; JEANNY, J.; CRISANTI, P.; BEHAR-COHEN, F. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. **Clinical Ophthalmology**, vol. 4, p. 183–195, Mar. 2010.

PENG, C.-H.; LIU, J.-H.; WOUNG, L.-C.; LIN, T.-J.; CHIOU, S.-H.; TSENG, P.-C.; DU, W.-Y.; CHENG, C.-K.; HU, C.-C.; CHIEN, K.-H.; CHEN, S.-J. MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity. **British Journal of Ophthalmology**, vol. 96, no. 5, p. 747–751, 14 Feb. 2012.

PHILLIPS, J. D.; HWANG, E. S.; MORGAN, D. J.; CREVELING, C. J.; COATS, B. Structure and mechanics of the vitreoretinal interface. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, vol. 134, p. 105399, Oct. 2022.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, no. 9, p. 45e45, 1 May 2001.

PONSIOEN, T. L.; HOOYMANS, J. M. M.; LOS, L. I. Remodelling of the human vitreous and vitreoretinal interface—a dynamic process. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 29, no. 6, p. 580–595, 1 Nov. 2010.

PONSIOEN, T. L.; VAN LUYN, M. J. A.; VAN DER WORP, R. J.; PAS, H. H.; VAN MEURS, J. C.; HOOYMANS, J. M. M.; LOS, L. I. Human retinal Müller cells synthesize collagens of the vitreous and vitreoretinal interface in vitro. **Molecular Vision**, vol. 14, p. 652–660, 26 Mar. 2008.

PÖSTYÉNI, E.; KOVÁCS-VALASEK, A.; URBÁN, P.; CZUNI, L.; SÉTÁLÓ, G.; FEKETE, C.; GABRIEL, R. Analysis of mir-9 Expression Pattern in Rat Retina during Postnatal Development. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, no. 5, p. 2577, 4 Mar. 2021.

QIAO, H.; HISATOMI, T.; SONODA, K. H.; KURA, S.; SASSA, Y.; KINOSHITA, S.; NAKAMURA, T.; SAKAMOTO, T.; ISHIBASHI, T. The characterization of hyalocytes: the

origin, phenotype, and turnover. **British Journal of Ophthalmology**, vol. 89, no. 4, p. 513–517, 1 Apr. 2005. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.050658>.

RAGUSA, M.; CALTABIANO, R.; RUSSO, L.; PUZZO, L.; AVITABILE, T.; LONGO, A.; TORO, M. D.; DI PIETRO, C.; PURRELLO, M.; REIBALDI, M. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases. **Molecular Vision**, vol. 19, p. 430–440, 2013.

RAMÍREZ, J. M.; RAMÍREZA, I.; SALAZAR, J. J.; DE HOZ, R.; TRIVIÑO, A. Changes of Astrocytes in Retinal Ageing and Age-related Macular Degeneration. **Experimental Eye Research**, vol. 73, no. 5, p. 601–615, Nov. 2001.

RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, vol. 200, no. 4, p. 373–383, 18 Feb. 2013.

REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Glia of the human retina. **Glia**, vol. 68, no. 4, p. 768–796, 3 Dec. 2019.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, vol. 403, no. 6772, p. 901–906, Feb. 2000.

RYAN, D. G.; OLIVEIRA-FERNANDES, M.; LAVKER, R. M. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. **Molecular Vision**, vol. 12, p. 1175–1184, 2006.

RUSSO, A.; RAGUSA, M.; BARBAGALLO, C.; LONGO, A.; AVITABILE, T.; UVA, M. G.; BONFIGLIO, V.; TORO, M. D.; CALTABIANO, R.; MARIOTTI, C.; BOSCIA, F.; ROMANO, M.; DI PIETRO, C.; BARBAGALLO, D.; PURRELLO, M.; REIBALDI, M. miRNAs in the vitreous humor of patients affected by idiopathic epiretinal membrane and macular hole. **PLOS ONE**, vol. 12, no. 3, p. e0174297, 22 Mar. 2017.

SAKAMOTO, T.; ISHIBASHI, T. HYALOCYTES. **Retina**, vol. 31, no. 2, p. 222–228, Feb. 2011.

SEBAG, J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, vol. 242, no. 8, p. 690–698, Aug. 2004.

SEBAG, J. Vitreous and Vision Degrading Myodesopsia. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 79, p. 100847, Nov. 2020.

SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, vol. 19, no. 11, p. 1439–1440, 21 Jul. 2003.

SKEIE, J. M.; ROYBAL, C. N.; MAHAJAN, V. B. Proteomic Insight into the Molecular Function of the Vitreous. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 5, p. e0127567, 28 May 2015.

SOMMER, F.; BRANDL, F.; WEISER, B.; TESSMAR, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. FACS as useful tool to study distinct hyalocyte populations. **Experimental Eye Research**, vol. 88, no. 5, p. 995–999, May 2009.

SOUNDARA PANDI, S. P.; CHEN, M.; GUDURIC-FUCHS, J.; XU, H.; SIMPSON, D. A. Extremely Complex Populations of Small RNAs in the Mouse Retina and RPE/Choroid. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 54, no. 13, p. 8140, 17 Dec. 2013.

SU, W.; LI, Z.; JIA, Y.; ZHU, Y.; CAI, W.; WAN, P.; ZHANG, Y.; ZHENG, S. G.; ZHUO, Y. microRNA-21a-5p/PDCD4 axis regulates mesenchymal stem cell-induced neuroprotection in acute glaucoma. **Journal of Molecular Cell Biology**, vol. 9, no. 4, p. 289–301, 20 Jul. 2017.

SUBIRADA, P. V.; PAZ, M. C.; RIDANO, M. E.; LORENC, V. E.; VAGLIENTI, M. V.; BARCELONA, P. F.; LUNA, J. D.; SÁNCHEZ, M. C. A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death. **European Journal of Neuroscience**, vol. 47, no. 12, p. 1429–1443, Jun. 2018.

SUNDERMEIER, T. R.; PALCZEWSKI, K. The physiological impact of microRNA gene regulation in the retina. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 69, no. 16, p. 2739–2750, 30 Mar. 2012.

SUNDERMEIER, T. R.; ZHANG, N.; VINBERG, F.; MUSTAFI, D.; KOHNO, H.; GOLCZAK, M.; BAI, X.; MAEDA, A.; KEFALOV, V. J.; PALCZEWSKI, K. DICER1 is essential for survival of postmitotic rod photoreceptor cells in mice. **The FASEB Journal**, vol. 28, no. 8, p. 3780–3791, 8 May 2014.

SUZUKI, F.; OKUNO, M.; TANAKA, T.; SANUKI, R. Overexpression of neural miRNAs miR-9/9* and miR-124 suppresses differentiation to Müller glia and promotes differentiation to neurons in mouse retina in vivo. **Genes to Cells**, vol. 25, no. 11, p. 741–752, 21 Oct. 2020.

TANIGUCHI, H.; KITAOKA, T.; GONG, H.; AMEMIYA, T. Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, vol. 181, no. 6, p. 555–560, Dec. 1999.

TORO, M. D.; REIBALDI, M.; AVITABILE, T.; BUCOLO, C.; SALOMONE, S.; REJDAK, R.; NOWOMIEJSKA, K.; TRIPODI, S.; POSARELLI, C.; RAGUSA, M.; BARBAGALLO, C. MicroRNAs in the Vitreous Humor of Patients with Retinal Detachment and a Different Grading of Proliferative Vitreoretinopathy: A Pilot Study. **Translational Vision Science & Technology**, vol. 9, no. 6, p. 23, 22 May 2020.

TRAM, N. K.; SWINDLE-REILLY, K. E. Rheological Properties and Age-Related Changes of the Human Vitreous Humor. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 6, 18 Dec. 2018.

TU, Y.; SONG, E.; WANG, Z.; JI, N.; ZHU, L.; WANG, K.; SUN, H.; ZHANG, Y.; ZHU, Q.; LIU, X.; ZHU, M. Melatonin attenuates oxidative stress and inflammation of Müller cells in diabetic retinopathy via activating the Sirt1 pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 137, p. 111274, May 2021.

TU, Y.; ZHU, M.; WANG, Z.; WANG, K.; CHEN, L.; LIU, W.; SHI, Q.; ZHAO, Q.; SUN, Y.; WANG, X.; SONG, E.; LIU, X. Melatonin inhibits Müller cell activation and pro-inflammatory cytokine production via upregulating the MEG3/miR-204/Sirt1 axis in experimental diabetic retinopathy. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 235, no. 11, p. 8724–8735, 23 Apr. 2020.

USUI-OUCHI, A.; OUCHI, Y.; KIYOKAWA, M.; SAKUMA, T.; ITO, R.; EBIHARA, N. Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with Development of Proliferative Vitreoretinal Disease. **PLoS One**, vol. 11, no. 6, p. e0158043, 2016.

VECINO, E.; RODRIGUEZ, F. D.; RUZAFI, N.; PEREIRO, X.; SHARMA, S. C. Glia–neuron interactions in the mammalian retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 51, p. 1–40, Mar. 2016.

WALLACE, V. A. Concise Review: Making a Retina-From the Building Blocks to Clinical Applications. **STEM CELLS**, vol. 29, no. 3, p. 412–417, Mar. 2011.

WOHL, S. G.; JORSTAD, N. L.; LEVINE, E. M.; REH, T. A. Müller glial microRNAs are required for the maintenance of glial homeostasis and retinal architecture. **Nature Communications**, vol. 8, no. 1, 17 Nov. 2017.

WOHL, S. G.; REH, T. A. The microRNA expression profile of mouse Müller glia in vivo and in vitro. **Scientific Reports**, vol. 6, no. 1, 14 Oct. 2016.

WOLF, J.; BONEVA, S.; ROSMUS, D.-D.; AGOSTINI, H.; SCHLUNCK, G.; WIEGHOFER, P.; SCHLECHT, A.; LANGE, C. Deciphering the Molecular Signature of Human Hyalocytes in Relation to Other Innate Immune Cell Populations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, vol. 63, no. 3, p. 9, 10 Mar. 2022.

WU, D. C. **Estudo da influência de TGF beta na família let7 em células glias de Müller**. 2018. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

WU, X.; ZENG, Y.; WU, S.; ZHONG, J.; WANG, Y.; XU, J. MiR-204, down-regulated in retinoblastoma, regulates proliferation and invasion of human retinoblastoma cells by targeting CyclinD2 and MMP-9. **FEBS Letters**, vol. 589, no. 5, p. 645–650, 31 Jan. 2015.

XU, S. microRNA expression in the eyes and their significance in relation to functions. **Progress in Retinal and Eye Research**, vol. 28, no. 2, p. 87–116, Mar. 2009.

XU, S.; WITMER, P. D.; LUMAYAG, S.; KOVACS, B.; VALLE, D. MicroRNA (miRNA) Transcriptome of Mouse Retina and Identification of a Sensory Organ-specific miRNA Cluster. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 282, no. 34, p. 25053–25066, Aug. 2007.

YANG, Y.; ZHOU, J.; LI, W. H.; ZHOU, Z.X.; XIA, X.B. LncRNA NEAT1 regulated diabetic retinal epithelial-mesenchymal transition through regulating miR-204/SOX4 axis. **PeerJ**, vol. 9, p. e11817, 23 Jul. 2021.

ZHANG, C.; MIYAGISHIMA, K. J.; DONG, L.; RISING, A.; NIMMAGADDA, M.; LIANG, G.; SHARMA, R.; DEJENE, R.; WANG, Y.; ABU-ASAB, M.; QIAN, H.; LI, Y.; KOPERA, M.; MAMINISHKIS, A.; MARTINEZ, J.; MILLER, S. Regulation of phagolysosomal activity by miR-204 critically influences structure and function of retinal pigment epithelium/retina. **Human Molecular Genetics**, vol. 28, no. 20, p. 3355–3368, 23 Jul. 2019.

ZHOU, T.; HE, C.; LAI, P.; YANG, Z.; LIU, Y.; XU, H.; LIN, X.; NI, B.; JU, R.; YI, W.; LIANG, L.; PEI, D.; EGWUAGU, C. E.; LIU, X. miR-204-containing exosomes ameliorate GVHD-associated dry eye disease. **Science Advances**, vol. 8, no. 2, 14 Jan. 2022.

ZHU, M.; MADIGAN, M. C.; VAN DRIEL, D.; MASLIM, J.; BILLSON, F. A.; PROVIS, J. M.; PENFOLD, P. L. The Human Hyaloid System: Cell Death and Vascular Regression. **Experimental Eye Research**, vol. 70, no. 6, p. 767–776, Jun. 2000.