



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**CÉLULAS MATO NA RETINA:  
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA POPULAÇÃO  
DE CÉLULAS PERIVASCULARES AUTOFLUORESCENTES EM SITUAÇÃO  
FISIOLÓGICA E DE RETINOPATIA**

**Maria Luísa Mendes Jorge**

**TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

**ORIENTADOR**

**Doutor José António Rebocho Esperança Pina**

**PRESIDENTE**

**Reitor da Universidade Técnica de Lisboa**

**CO-ORIENTADOR**

**Doutor Jesús Ruberte París**

**VOGAIS**

**Doutor Jesús Ruberte París**

**Doutor José António Rebocho Esperança Pina**

**Doutor Artur Manuel Perez Neves Águas**

**Doutor Miguel de Oliveira Correia**

**Doutora Graça M. Alexandre Pires L. de Melo**

**Doutor António José de Freitas Duarte**

**Doutor Mário A. P. da Silva Soares de Pinho**

**2009**

**LISBOA**

Aos meus pais  
Ao meu filho





Aos meus Mestres



## **AGRADECIMENTOS**

Cabe-nos agora o grato dever de manifestar o nosso reconhecimento a todos aqueles com quem partilhámos este percurso e que tornaram possível a realização deste trabalho. Nele estiveram envolvidas, directa e indirectamente, muitas pessoas, Mestres, Colegas, Docentes, Investigadores, Técnicos e Amigos, cujos ensinamentos, conselhos e palavras de estímulo foram fundamentais para ultrapassar cada dificuldade ao longo deste período.

Ao Senhor Professor Doutor José António Rebocho Esperança Pina, Ilustre Mestre, gostaríamos de expressar o nosso profundo agradecimento pelo privilégio da sua amizade e pela honra com que nos distinguiu ao podermos realizar esta Tese sob a sua orientação; a sua disponibilidade permanente, os seus ensinamentos orientadores e os seus conselhos foram determinantes para a concretização deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Jesús Ruberte París, Ilustre Mestre, gostaríamos de manifestar, de forma muito especial, a nossa enorme gratidão pelo honroso convite para realizar este trabalho sob a sua orientação e pelo significado que representou a oportunidade de trabalhar com a sua equipa de investigação. Agradecemos reconhecidamente a amizade com que nos distinguiu, a liberdade de pensamento que nos permitiu e o exemplo e ensinamentos permanentes que nos marcaram profundamente.

À Senhora Professora Doutora Graça Maria Alexandre Pires de Lopes de Melo, gostaríamos de agradecer a amizade e partilha de tantos anos de trabalho nas disciplinas de Anatomia, pelo acompanhamento atento no decurso da realização deste trabalho, sem esquecer o cuidado em ajustar a distribuição do serviço docente à necessidade constante das deslocações à Universidade Autónoma de Barcelona.

Ao Senhor Professor Doutor Miguel Correia, gostaríamos de expressar o nosso sincero agradecimento pela honra da sua amizade e pela atenção com que seguiu o desenvolvimento deste trabalho, pela leitura cuidadosa e crítica de variados textos produzidos durante este período e pelas suas valiosas sugestões, sem esquecer as facilidades concedidas para a realização de parte do trabalho experimental no Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Ao Senhor Professor Doutor Luís Tavares, Presidente do CIISA (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal), agradecemos reconhecidamente a amizade com que nos distinguiu, o interesse no acompanhamento do desenvolvimento dos nossos trabalhos e o estímulo constante, para além do tão necessário apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível realizar este trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Rui Manuel Horta Caldeira, Presidente do Conselho Científico da Faculdade de Medicina Veterinária, gostaríamos de expressar o nosso agradecimento pelo apoio demonstrado ao longo da realização deste trabalho e pela incedível solicitude na resolução de algumas dificuldades.

À Senhora Professora Doutora Graça Ferreira Dias, Presidente do Departamento de Morfologia e Função, gostaríamos de expressar o nosso reconhecimento pela amizade e pelo interesse com que acompanhou estes anos de trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Eduardo Marques Fontes *in memoriae*, especial homenagem, agradecendo todo o apoio e incentivo nas fases iniciais da realização do trabalho experimental.

Ao Senhor Professor Júlio Cavaco Faísca, gostaríamos de expressar o nosso mais profundo reconhecimento pela amizade com que nos distinguiu ao longo de muitos anos de trabalho, pelos ensinamentos que nos transmitiu, por todo o apoio e palavras de incentivo e pelo exemplo de competência e rigor na sua actividade como Professor de Anatomia.

A todos aqueles Docentes da Faculdade de Medicina Veterinária que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, manifestamos o nosso sincero agradecimento pela amizade e por todo o apoio que nos dispensaram.

Ao Senhor Professor Doutor Carlos Mendes Godinho de Andrade Fontes, agradecemos reconhecidamente a leitura criteriosa de alguns dos nossos trabalhos e as suas valiosas sugestões.

Ao Senhor Professor Doutor António José Duarte, agradecemos a amável cedência de murganhos que nos permitiu realizar parte do trabalho experimental em Lisboa.

À Senhora Professora Doutora Marília Ferreira, gostaríamos de agradecer a amizade com que nos distinguiu, a serenidade dos seus conselhos, o estímulo constante e, já numa fase final, a revisão atenta e cuidadosa desta Tese.

À Senhora Professora Doutora Fátima Bosch, Directora do CBATEG (*Centro de Biotecnologia Animal y Terapia Génica*) da Universidade Autónoma de Barcelona, gostaríamos igualmente de agradecer a amizade com que nos distinguiu, todo o apoio e todas as facilidades concedidas para a realização da parte experimental da presente Dissertação.

Aos elementos do grupo de investigação da Unidade de Análise Morfológica do CBATEG, Professora Doutora Ana Carretero, Professora Doutora Cristina Llombart, Dr. David Ramos, Dra. Mariana Lopez Luppó, Professor Doutor Víctor Nacher, Professor Doutor Marc Navarro, Verónica Melgarejo e Lorena Noya, agradecemos de forma especial todo o apoio e disponibilidade, tornando possível a realização de grande parte do trabalho experimental. Ao fim destes anos de convivência no CBATEG, são hoje mais do que colegas de laboratório, com quem tanto aprendemos. A estes novos Amigos, muito obrigada pela ajuda nos momentos difíceis; pelo esforço e empenho quando as horas do dia pareciam não ser suficientes para conseguir terminar um protocolo a tempo de ter os resultados, antes do regresso a Lisboa; muito obrigada, sobretudo, pela partilha dos momentos de alegria, pois as “minhas vitórias” representaram sempre uma vitória para todos.

À Senhora Professora Doutora Sabrina Tafuro, gostaríamos de expressar o nosso profundo reconhecimento pela sua amizade, dedicação e disponibilidade permanente, para além do seu inestimável contributo na realização das análises por meio de citometria de fluxo.

A todos os investigadores do CBATEG a quem, apesar de não mencionar individualmente, gostaríamos de agradecer a forma como nos acolheram nesta instituição e todo o apoio prestado ao longo destes anos.

Ao Senhor Professor Doutor Alfonso Rodriguez-Baeza, da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Barcelona, agradecemos reconhecidamente a amizade com que nos distinguiu, o interesse com que acompanhou o desenvolvimento dos nossos trabalhos e a amável cedência dos olhos humanos, circunstância que nos permitiu abordar alguns aspectos dos mecanismos fisiopatológicos retinianos e perspectivar o potencial papel das células Mato retinianas no Homem.

Ao Serviço de Microscopia da Universidade Autónoma de Barcelona, o nosso agradecimento pela grande competência e apoio técnico dispensado.

Ao Sr. Carlos Lopes, o nosso sincero agradecimento pela amizade e pelo apoio nas muitas horas de trabalho no laboratório, pela dedicação inexcelável e pelo incentivo constante.

Ao Sr. Octávio Chaveiro, o nosso agradecimento pela excelência do apoio técnico, pela amizade e incentivo nas horas de trabalho, partilhando entusiasmos e dificuldades.

À Sra. D. Cidália e Sra. D. Esperança, gostaríamos de agradecer a competência, dedicação e empenho na preparação de peças para estudo e, principalmente, pelo apoio e pela alegria com que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho.

À Sra. D. Emília e Sra. D. Elisa, gostaríamos igualmente de expressar o nosso agradecimento pela amizade, apoio e solicitude que sempre demonstraram ao longo deste período de trabalho.

Aos Amigos, à Família e a Deus agradecemos por todo o Amor.

## **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**

Na presente Dissertação incluem-se resultados originais que foram objecto de divulgação científica, tendo sido publicados ou submetidos para publicação.

### **COMUNICAÇÕES ORAIS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS:**

Mendes-Jorge, L., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Carretero, A., Melgarejo, V., Esperança-Pina, J.A. & Ruberte, J. (2005). Células perivasculares fluorescentes na retina do murganho: um novo tipo celular relacionado com a manutenção da homeostasia do olho [abstract]. *Livro de resumos do Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém, Portugal, 13-15 de Outubro, pp. 74.

Mendes-Jorge, L., Llombart, C., Ramos, D., Luppo, M., Nacher, V., Melgarejo, V., Navarro, M., Carretero, A., Alexandre-Pires, G., Correia, M., Esperança-Pina, J.A. & Ruberte, J. (2007). Células perivasculares autofluorescentes da retina: aspectos morfológicos e funcionais [abstract]. *Livro de resumos das Jornadas do Ensino Pós-Graduado da FMV/Simpósio do CIISA*, Lisboa, Portugal, 14-15 de Junho, pp. 15.

### **COMUNICAÇÕES EM PAINEL EM REUNIÕES CIENTÍFICAS:**

Mendes-Jorge, L., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Nacher, V., Melgarejo, V., Armengol, C., Correia, M., Navarro, M., Carretero, A., Esperança-Pina, J.A. & Ruberte, J. (2006). A new autofluorescent perivascular cell with scavenger function found in healthy mouse retina [abstract]. *Proceedings of the Eumorphia Third Annual Meeting – Understanding Human Disease through Mouse Genetics*, Barcelona, Spain, 23-24 February, pp. 115.

Mendes-Jorge, L., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Nacher, V., Melgarejo, V., Armengol, C., Correia, M., Navarro, M., Carretero, A., Esperança-Pina, J.A. & Ruberte, J. (2006). Autofluorescent perivascular cells: a new cell type with scavenger function found in healthy mouse retina [abstract]. *Proceedings of the XXVI Congress of the European Association of Veterinary Anatomist*, Messina, Italy, 19-22 July, pp. 149.



Mendes-Jorge, L., Ramos, D., Luppo, M., Carretero, A., Navarro, M., Nacher, V., Llombart, C., Melgarejo, V., Alexandre-Pires, G., Correia, M., Ruberte, J. & Esperança-Pina, J.A. (2007). Arteriolar annuli corrosion casts in mouse retina. *Proceedings of Advances in Vascular Casting – 2<sup>nd</sup> International Workshop*, Salzburg, Austria, 9-12 July, pp. 81-83.

Ruberte, J., Carretero, A., Navarro, M., Nacher, V., Llombart, C., Melgarejo, V., Ramos, D., Luppo, M., Mendes-Jorge, L. & Espada, I. (2007). Atlas d'Anatomia del ratolí: una eina essencial per a l'aprenentatge de l'anatomia i el fenotipatge de ratolins transgènics [abstract]. *Livro de resumos das IV Jornades de Campus d'Innovació Docent*, Barcelona, Espanha, 13-20 de Setembro, pp. 91.

Mendes-Jorge, L., Ramos, D., Luppo, M., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Nacher, V., Melgarejo, V., Correia, M., Navarro, M., Carretero, A., Tafuro, S., Rodriguez-Baeza, A., Esperança-Pina, J.A., Bosch, F. & Ruberte, J. (2008). Mato cells with scavenger function contribute to blood-retinal barrier, have a role in the retinal iron metabolism and are involved in retinopathy. *1<sup>st</sup> Internal CBATEG Meeting*, Barcelona, Spain, 18 July, pp.31.

Mendes-Jorge, L., Ramos, D., Luppo, M., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Nacher, V., Melgarejo, V., Correia, M., Navarro, M., Carretero, A., Tafuro, S., Rodriguez-Baeza, A., Bosch, F., Esperança-Pina, J.A. & Ruberte, J. (2008). As células Mato retinianas acumulam ferritina e podem desempenhar um papel central na homeostasia do ferro [abstract]. *Livro de resumos do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, I Congresso Ibérico de Epidemiologia*, INRB, INIA, Fonte Boa, Vale de Santarém, 27-29 Novembro, pp. 192.

#### **PUBLICAÇÕES EM REVISTAS INTERNACIONAIS COM ARBITRAGEM CIENTÍFICA:**

Mendes-Jorge, L., Ramos, D., Luppo, M., Llombart, C., Alexandre-Pires, G., Nacher, V., Melgarejo, V., Correia, M., Navarro, M., Carretero, A., Tafuro, S., Rodriguez-Baeza, A., Esperança-Pina, J.A., Bosch, F. & Ruberte, J. Resident autofluorescent perivascular macrophages have a scavenger function and may contribute to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Submetido em 04.02.2009; aceite para publicação em 07.03.2009.

Llombart, C., Nacher, V., Ramos, D., Luppo, M., Carretero, A., Navarro, M., Melgarejo, V., Armengol, C., Rodríguez-Baeza, A., Mendes-Jorge, L. & Ruberte, J. Morphological

characterization of pecteneal hyalocytes in the developing quail retina. *Journal of Anatomy*.  
Submetido em 12.12.2008; aceite para publicação em 12.01.2009.

#### **CAPÍTULOS DE LIVROS:**

Ruberte, J., Carretero, A., Navarro, M., Nacher, V., Ramos, D., López-Luppo, M., Melgarejo, V., Mendes, L. & Espada, I. (2008). Cap a l'Espai Europeu d'Educació Superior (EEES): Experiències docents innovadores de la UAB en ciències experimentals i tecnologies i en ciències de la salut. *Elaboració d'un atlas fotogràfic per a l'autoaprenentatge de l'anatomia del ratolí*. (pp. 137-141). Servei de Publicacions Universitat Autònoma de Barcelona. ISBN 978-84-490-2576-1.

**PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO AO ABRIGO DOS QUAIS O PRESENTE TRABALHO  
FOI REALIZADO**

**CIISA\72.retina, financiado pelo CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em  
Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa**

Investigador principal: Luísa Mendes-Jorge

**FIS PI061837, financiado pelo Instituto de Salud Carlos III e CIBER de Diabetes y  
Enfermedades Metabolicas Asociadas**

Investigador principal: Jesús Ruberte París

## **Células Mato na retina: caracterização morfológica e funcional de uma nova população de células perivasculares autofluorescentes em situação fisiológica e de retinopatia**

### **RESUMO**

A retina contém diferentes populações celulares derivadas dos monócitos: macrófagos perivasculares e células da micróglia. Neste trabalho, descreve-se a presença de um novo subtipo de macrófagos residentes, distintos das células da micróglia, localizados no espaço perivascular, em retinas humanas e de murganho. Estas células emitem uma fluorescência específica e expressam constitutivamente receptores *scavenger* da classe A. Exibem um movimento alternado constante, ao longo dos vasos sanguíneos, providenciando um revestimento adicional a áreas mais delgadas da parede vascular. Para além disso, acumulam peroxidase de rábano e lipoproteínas de baixa densidade acetiladas em circulação, sem rotura da barreira hemato-retiniana. No conjunto, estes resultados sugerem que estas células, com função *scavenger*, contribuem para o funcionamento da barreira hemato-retiniana. Acumulam, também, ferro, em lisossomas, provavelmente por um mecanismo de endocitose de ferritina, mediada por receptores TIM-2, sugerindo o seu envolvimento na homeostasia do ferro na retina e em situações de alteração desta. Em fases iniciais de degenerescência dos fotorreceptores, estas células migram para o local das lesões, sugerindo a sua participação nos processos de retinopatia. Todos estes aspectos são semelhantes aos descritos para as células Mato cerebrais. Por conseguinte, este estudo estabelece, pela primeira vez, a presença de células Mato na retina.

**PALAVRAS CHAVE:** células Mato, macrófagos perivasculares, função *scavenger*, barreira hemato-retiniana, metabolismo do ferro, retinopatia.

# **Retinal Mato cells: morphologic and functional characterization of a new autofluorescent perivascular cell population in physiological conditions and during retinopathy**

## **ABSTRACT**

The retina contains distinct populations of monocyte-derived cells: perivascular macrophages and microglia. In this work we describe the presence in mouse and human healthy retinas of a new subtype of resident macrophages, present in the perivascular space, different from microglia. These cells emitted specific autofluorescence and constitutively expressed the scavenger receptor class A. They were seen to move in an oscillatory manner along blood vessels, providing an additional coating to thinner areas of the vascular wall. Furthermore, these macrophages also accumulated blood-borne horseradish peroxidase and acetylated low-density lipoprotein without blood-retinal barrier pathological disruption. Taken together these findings suggest that these cells fulfil a major role in the scavenging of blood-borne molecules contributing to blood-retinal barrier function. In addition, they stored iron in lysosomes, probably by the TIM-2 mediated binding of ferritin, indicating they probably are involved in retinal iron homeostasis and related disorders. These cells were also early detected at lesions during photoreceptor degeneration, suggesting a possible role in the onset and development of retinopathy. All these features are consistent with those described for brain Mato cells. Thus, this study shows, for the first time, the presence of autofluorescent perivascular Mato cells in the retina.

**KEY WORDS:** Mato cells, perivascular macrophages, scavenger function, blood-retinal barrier, iron homeostasis, retinopathy.

## ÍNDICE GERAL

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	i
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	ix
<b>PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO AO ABRIGO DOS QUAIS O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	xv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xix
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xxvii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xxix
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA</b> .....	xxxí
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. RETINA .....	3
1.1. OLHO .....	3
1.2. ESTRUTURA DA RETINA .....	7
1.3. VASCULARIZAÇÃO DA RETINA .....	17
1.3.1. FORMAÇÃO DOS VASOS DA RETINA .....	19
1.3.2. PADRÃO VASCULAR DA RETINA .....	20
1.3.3. ESTRUTURA DOS VASOS SANGUÍNEOS DA RETINA .....	26
1.4. BARREIRA HEMATO-RETINIANA .....	30

2. MACRÓFAGOS .....	33
2.1. ASPECTOS GERAIS .....	33
2.2. MACRÓFAGOS DA RETINA .....	34
2.3. CÉLULAS MATO .....	36
3. RETINOPATIAS .....	39
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
1. MATERIAL .....	49
1.1. ANIMAIS .....	49
1.2. OLHOS HUMANOS .....	50
2. MÉTODOS .....	51
2.1. PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS .....	51
2.1.1. RETINAS DE MURGANHO .....	51
2.1.1.1. Perfusão Intravascular .....	51
2.1.1.2. Enucleação dos bulbos oculares .....	52
2.1.1.3. Processamento e corte de tecidos .....	52
2.1.1.4. Retinas <i>in toto</i> .....	53
2.1.2. RETINAS HUMANAS .....	54
2.2. TÉCNICA DE INJEÇÃO-REPLEÇÃO .....	55
2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO .....	56
2.3.1. MOLDES VASCULARES DE CORROSÃO .....	56
2.3.2. TECIDO INTACTO .....	57
2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO .....	59
2.5. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS .....	61
2.5.1. IMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE CORTES HISTOLÓGICOS .....	63
2.5.2. IMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE RETINAS <i>IN TOTO</i> .....	68
2.6. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS .....	69
2.6.1. LECTINAS .....	69
2.7. COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	70

2.7.1. HEMATOXILINA-EOSINA .....	70
2.7.2. <i>OIL RED O</i> .....	71
2.8. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA .....	72
2.9. ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DOS LÍPIDOS .....	73
2.10. CITOMETRIA DE FLUXO .....	75
2.11. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CÉLULAS MATO .....	78
2.12. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO <i>SCAVENGER</i> .....	79
2.13. MICROANÁLISE POR ENERGIA DISPERSIVA POR RADIAÇÃO-X .....	80
2.14. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO E ACUMULAÇÃO DE FERRITINA .....	81
2.15. MODELO DE RETINOPATIA INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE IODATO DE SÓDIO .....	82
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>83</b>
1. AUTOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS MATO DA RETINA .....	85
2. LOCALIZAÇÃO E TOPOGRAFIA DAS CÉLULAS MATO DA RETINA .....	92
3. AS CÉLULAS MATO DA RETINA SÃO MACRÓFAGOS RESIDENTES DISTINTOS DAS CÉLULAS DA MICRÓGLIA .....	99
4. AS CÉLULAS MATO DA RETINA MOVIMENTAM-SE AO LONGO DOS VASOS SANGUÍNEOS .....	103
5. AS CÉLULAS MATO DA RETINA PROVIDENCIAM UM REVESTIMENTO ADICIONAL À PAREDE VASCULAR NAS ÁREAS DE MENOR DENSIDADE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA BASAL .....	105
6. AS CÉLULAS MATO DA RETINA EXPRESSAM RECEPTORES <i>SCAVENGER</i> DA CLASSE A EM SITUAÇÃO FISIOLÓGICA .....	108
7. AS CÉLULAS MATO DA RETINA ACUMULAM MACROMOLÉCULAS EM CIRCULAÇÃO NA CORRENTE SANGUÍNEA SEM ROTURA DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA .....	111
8. AS CÉLULAS MATO DA RETINA ACUMULAM FERRO .....	114
9. AS CÉLULAS MATO DA RETINA MIGRAM PARA O LOCAL DAS LESÕES NUM MODELO DE RETINOPATIA EM MURGANHO INDUZIDA PELO IODATO DE SÓDIO .....	120
10. AS CÉLULAS MATO ESTÃO PRESENTES EM RETINAS HUMANAS .....	128



<b>DISCUSSÃO</b> .....	133
1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TOPOGRÁFICOS DAS CÉLULAS MATO DA RETINA .....	137
2. ASPECTOS FUNCIONAIS DAS CÉLULAS MATO DA RETINA.....	147
2.1. FUNÇÃO <i>SCAVENGER</i> E CONTRIBUIÇÃO PARA A MANUTENÇÃO DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA .....	147
2.2. ENVOLVIMENTO NA HOMEOSTASIA DO FERRO NA RETINA .....	150
2.3. PARTICIPAÇÃO NOS PROCESSOS DE RETINOPATIA .....	153
<b>CONCLUSÕES</b> .....	161
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	165
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	169
<b>ANEXO</b> .....	187

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Morfologia do bulbo ocular. A. Bulbo ocular de murganho. B. Secção sagital do bulbo ocular de murganho; coloração histológica tricrómica de Mallory. E, esclera; Co, córnea; Cr, corioideia; Cc, corpo ciliar; I, íris; N, nervo óptico; R, retina; Cv, câmara vítrea do bulbo ocular; C, cristalino; Ca, câmara anterior do bulbo ocular; Cp, câmara posterior do bulbo ocular; Imagens cedidas por Ruberte, J. ....	3
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática do bulbo ocular de murganho. Detalhe da constituição da retina. Túnica fibrosa do bulbo ocular (E, esclera; Co, córnea), túnica músculo-vascular do bulbo ocular (Cr, corioideia; Cc, corpo ciliar; I, íris) e túnica nervosa do bulbo ocular (PO, parte óptica da retina; PCI, parte ciliar e iridiana da retina); C, cristalino; Ca, câmara anterior do bulbo ocular; Cv, câmara vítrea do bulbo ocular; N, nervo óptico; MLI, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; MB, membrana vítrea (Bruch). A seta amarela indica a direcção da luz. ....	9
<b>Figura 3</b>	Estrutura da retina. A imagem ilustra a disposição das diferentes camadas da retina. Setas, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; cabeças de seta, membrana limitante externa. Coloração histológica hematoxilina-eosina. Barra: 23 µm. ....	10
<b>Figura 4</b>	Estrutura da retina. Disposição das diferentes camadas da retina. MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes. Microscopia electrónica de varrimento (MEV) sobre tecido intacto. Barra: 20 µm. ....	10
<b>Figura 5</b>	Detalhe dos fotorreceptores, cones e bastonetes. SE, segmento externo, SI, segmento interno. MEV sobre tecido intacto. Barra: 6 µm. ....	12
<b>Figura 6</b>	Detalhe dos fotorreceptores. Aspecto dos segmentos externos dos cones e bastonetes. MEV sobre tecido intacto. Barra: 3,5 µm. ....	12
<b>Figura 7</b>	Detalhe dos fotorreceptores. Aspecto da porção apical do segmento externo dos fotorreceptores que se relaciona com o epitélio pigmentar da retina (setas). MEV sobre tecido intacto. Barra: 11 µm. ....	13

- Figura 8** Tipos celulares da retina. Detalhe da camada nuclear interna: H, células horizontais; B, células bipolares; A, células amácrinas; Mu, células de Müller; PI, camada plexiforme interna; PE, camada plexiforme externa. Coloração histológica azul de toluidina. .... 14
- Figura 9** Molde vascular da retina. A artéria central da retina divide-se em 6 arteríolas de 2ª ordem (A). Surge acompanhada pela veia central da retina que abandona a retina, contornando-a lateralmente, enquanto recebe as vénulas de 2ª ordem (B). As vénulas de 2ª ordem surgem intercaladas com as arteríolas de 2ª ordem, num plano segmentar mais externo. Ac, artéria central da retina; A, arteríolas de 2ª ordem; V, vénulas de 2ª ordem; Vc, veia central da retina. MEV. Barras: 80 µm (A) e 45 µm (B). .... 22
- Figura 10** Disposição espacial dos vasos sanguíneos da retina. As cabeças de seta assinalam vasos localizados nos plexos vasculares interno (PVI), intermédio (PVM) e externo (PVE). CG, camada de células ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear externa. MEV sobre tecido intacto. Barra: 20 µm. .... 22
- Figura 11** Padrão vascular da retina. Injecção de tinta da China. A: Observar a zona peri-arteriolar livre de capilares (cabeças de seta) e os ramos colaterais em ângulo recto. As vénulas surgem num plano segmentar mais profundo (seta). As arteríolas de 2ª ordem terminam na periferia da retina numa rede capilar de malhas largas que se abre nas arcadas venosas periféricas ou nas vénulas de 2ª ordem. B: As arteríolas de 2ª ordem dão origem aos vasos capilares do plexo superficial. As vénulas de 2ª ordem formam-se a partir de vénulas que drenam os capilares. C: Aspecto dos capilares de pequeno calibre e distribuídos em plexos vasculares de malhas largas, para uma menor interferência com a passagem da luz. D: Aspecto da rede capilar do plexo vascular intermédio (seta), de malhas mais largas do que as da rede capilar mais profunda, do plexo vascular externo. A, arteríola de 2ª ordem; V, vénula de 2ª ordem. Barras: 570 µm (A), 225 µm (B), 235 µm (C) e 115 µm (D). .... 24
- Figura 12** Molde vascular da retina. As arteríolas pré-capilares dividem-se nos vasos capilares do plexo vascular interno; capilares de direcção perpendicular, anastomoses em forma de ponte (cabeças de seta), com origem nos capilares mais superficiais, dirigem-se profundamente, para se unir aos capilares dos plexos mais profundos. A, arteríola de 2ª ordem; V, vénula de 2ª ordem. MEV. Barra: 100 µm. .... 25
- Figura 13** Padrão vascular da retina. A: Distribuição dos vasos sanguíneos ao longo dos três plexos vasculares interno (PVI), intermédio (PVM) e externo (PVE). As arteríolas pré-capilares dividem-se nos vasos capilares do plexo vascular interno, dando também origem a ductos preferenciais (cabeça de seta). B: Aspecto dos capilares do plexo vascular intermédio. Microscopia de varrimento laser confocal (MVLC). A membrana basal foi marcada com o anticorpo anti-colagénio IV (Col IV).

	Barras: 120 $\mu\text{m}$ (A) e 60 $\mu\text{m}$ (B). .....	25
<b>Figura 14</b>	Constituição da parede vascular. Túnica íntima (1), túnica média (2) e túnica adventícia (3). L, lúmen; E, célula endotelial; M, célula muscular; Mu, célula de Müller; MB, membrana basal; MG, membrana glial. Microscopia electrónica de transmissão (MET). Barra: 640 nm. ....	26
<b>Figura 15</b>	Estrutura dos vasos sanguíneos retinianos. Aspecto de um capilar. L, lúmen; E, célula endotelial; P, pericito; MB, membrana basal. MET. Barra: 1,2 $\mu\text{m}$ . ....	28
<b>Figura 16</b>	Estrutura dos vasos sanguíneos retinianos. A membrana glial (cabeças de seta), formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos, reveste a parede vascular. L, lúmen; E, célula endotelial; M, célula muscular; A, astrócito; Mu, célula de Müller. MET. Barra: 185 nm. ....	28
<b>Figura 17</b>	BHR externa: aspecto das células constituintes do epitélio pigmentar da retina. A superfície lateral das membranas celulares de células vizinhas apresenta as interdigitações características. MEV sobre tecido intacto. Barra: 3,5 $\mu\text{m}$ . ....	30
<b>Figura 18</b>	BHR interna: aspecto de uma zónula de oclusão entre duas células endoteliais adjacentes. MET. Barra: 215 nm. ....	32
<b>Figura 19</b>	BHR interna. Para além das células endoteliais, esta barreira é constituída por pericitos, pela membrana basal (cabeças de seta) e pela membrana glial. L, lúmen; E, célula endotelial; Mu, célula de Müller. MET. Barra: 450 nm. ....	32
<b>Figura 20</b>	Células autofluorescentes na retina de murganho. As cabeças de seta assinalam grânulos autofluorescentes junto aos núcleos de algumas células. MVLC. Autofluor, autofluorescência; núcleos marcados com <i>To-Pro®-3 iodide</i> (vermelho). Barra: 25 $\mu\text{m}$ . ....	86
<b>Figura 21</b>	Células autofluorescentes perivasculares na retina de murganho. As setas assinalam grânulos autofluorescentes junto ao núcleo das células. A marcação imunohistoquímica com anti-colagénio IV (Col IV), marcando a membrana basal da parede vascular, mostrou que as células autofluorescentes se localizavam externamente à membrana basal, frequentemente a nível das ramificações dos vasos sanguíneos. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com <i>Hoechst Stain Solution</i> (azul). Barras: 20 $\mu\text{m}$ (A) e 12 $\mu\text{m}$ (B). ....	86
<b>Figura 22</b>	Autofluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato. A autofluorescência (Autofluor) não desapareceu em retinas fixadas com NBF 10%, com metanol a 70% ou em retinas tratadas com éter etílico, indicando que as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato (cabeças de seta) são, provavelmente, constituídas por lipoproteínas com lípidos oxidados na sua composição. MVLC. Núcleos marcados com <i>To-Pro®-3 iodide</i> (azul). Barras: 4 $\mu\text{m}$ , 4,5 $\mu\text{m}$ e 7 $\mu\text{m}$ , respectivamente. ....	88

- Figura 23** MVLC. *Fingerprint* da intensidade de emissão de fluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato retinianas (A) e dos grânulos de lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina (B). Os *fingerprints* analisados são significativamente diferentes; a fluorescência emitida pelas inclusões citoplasmáticas das células Mato tem valores de intensidade mais elevados, sensivelmente o dobro, do observado para os grânulos de lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina; para além disso, a intensidade máxima de emissão de fluorescência da lipofuscina corresponde exactamente aos valores mais baixos da intensidade de emissão de fluorescência das células Mato. A intensidade da emissão de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias. Cabeça de seta, célula Mato; V, vénula. Barras: 6  $\mu\text{m}$  (A) e 3  $\mu\text{m}$  (B). ..... 90
- Figura 24** Localização e topografia das células Mato da retina. Retinas marcadas com os anticorpos anti-colagénio IV e anti-GFAP evidenciaram que as células Mato da retina se localizavam externamente à membrana basal dos vasos sanguíneos (A e C) e que os pés vasculares das células da nevrógia não as separavam da parede vascular (B e C). As células Mato surgiam exactamente em áreas da parede vascular em que faltava o revestimento da membrana glial (B e C), estando, desta forma, em contacto directo com a membrana basal. MVLC. Cabeças de seta, inclusões citoplasmáticas autofluorescentes; Autofluor, autofluorescência; V, vaso sanguíneo. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 8  $\mu\text{m}$  (A), 5  $\mu\text{m}$  (B) e 19  $\mu\text{m}$  (C). ..... 93
- Figura 25** MET e MEV. Localização e topografia das células Mato da retina. As imagens mostram as células Mato, de forma alongada, com inclusões citoplasmáticas perinucleares (cabeças de seta), situadas entre a membrana basal e a membrana glial, no espaço perivascular. Estas células apresentam longas expansões citoplasmáticas que acompanham a parede vascular. A sua localização é coincidente com áreas da parede vascular de menor espessura e onde as *zónulas de oclusão* ligam células endoteliais adjacentes. A, astrócito; CG, camada de células ganglionares; E, célula endotelial; EP, espaço perivascular; Er, eritrócito; M, célula muscular; MB, membrana basal; MG, membrana glial; Mt, célula Mato; Mu, célula de Müller; NE, camada nuclear externa; NI, camada nuclear interna; V, vaso; ZO, zónula de oclusão; seta, expansões citoplasmáticas da célula Mato; \*, célula perivascular. Barras: 1,2  $\mu\text{m}$  (A), 850 nm (B), 18  $\mu\text{m}$  (C) e 500 nm (D) (A), 850 nm (B), 18  $\mu\text{m}$  (C) e 500 nm (D). ..... 96
- Figura 26** Representação esquemática da localização e topografia das células Mato na retina. As células Mato, com inclusões citoplasmáticas perinucleares fluorescentes, situam-se entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, no espaço perivascular, equivalente ao espaço perivascular cerebral (Virchow-Robin). A sua localização é coincidente com áreas da parede vascular de menor espessura e onde existem *zónulas de oclusão* unindo células endoteliais adjacentes. E, célula endotelial; EP, espaço perivascular; MB, membrana basal; MG, membrana glial; Mt, célula Mato; NG, célula da

	nevrógia; ZO, zónula de oclusão. ....	98
<b>Figura 27</b>	Fenótipo das células Mato da retina. Estas células são CD11b-positivas, F4/80-positivas e BM8-positivas, o que significa que as células Mato da retina pertencem a um tipo de macrófagos perivascularres distinto das células da micróglia perivascular. MVLC. As cabeças de seta assinalam as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Núcleos marcados com <i>Hoechst Stain Solution</i> (azul). Barras: 6 µm (A), 8 µm (B) e 5 µm(C). ....	100
<b>Figura 28</b>	Citometria de fluxo. A análise por meio de citometria de fluxo permitiu identificar uma população de células retinianas CD11b-positivas autofluorescentes (0,4%) e uma população de células retinianas BM8-positivas autofluorescentes (0,3%). Nenhuma destas populações foi detectada no sangue. As tabelas à direita indicam o número de células (#) detectadas por retina em cada quadrante (Q) representado no gráfico e a respectiva percentagem relativamente ao total (%). A autofluorescência das células (Autofluor) foi detectada no canal FL2. ....	100
<b>Figura 29</b>	Comportamento cinético das células Mato da retina. A sequência de imagens de retinas em cultura mostrou que as células Mato se movimentavam ao longo da superfície externa da parede vascular, num movimento oscilatório, “varrendo” a área envolvente das zonas mais “frágeis” da BHR com as quais se relacionavam. MVLC. A autofluorescência (cabeça de seta) foi usada para identificar as células Mato. Os vasos sanguíneos injectados com tinta da China com 5% de gelatina foram visualizados no modo de transmissão. Barra: 18 µm. ....	104
<b>Figura 30</b>	Áreas de baixa expressão de proteínas da membrana basal. A imunomarcção com o anticorpo anti-colagénio IV (Col IV) revelou que as células Mato (cabeça de seta) se localizavam apostas a áreas da parede vascular com uma baixa expressão desta proteína (círculo). O perfil de intensidade de emissão de fluorescência correspondente (PI) confirmou a existência de áreas de baixa expressão de colagénio IV (roxo). A escala de cores de intensidade de emissão de fluorescência é apresentada como referência. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Cabeça de seta, inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Barra: 5,5 µm. ....	107
<b>Figura 31</b>	Receptores <i>scavenger</i> . A: a marcação imunohistoquímica com o anticorpo 2F8 revelou a presença de RS-A na periferia das inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato da retina. B: a citometria de fluxo revelou a existência de uma população de células autofluorescentes 2F8-positiva na retina. Esta população de células não foi detectada no sangue. A autofluorescência das células (Autofluor) foi detectada no canal FL2. MVLC. As cabeças de seta assinalam as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Núcleos marcados com <i>Hoechst Stain Solution</i> (azul). Barra: 9 µm. ....	109
<b>Figura 32</b>	As células Mato da retina acumulam proteínas. A: seis horas após a injeção endovenosa de HRP, a revelação com DAB não detectou a saída de HRP para o parênquima retiniano,	

indicando que não há rotura da BHR. Contudo, foi detectada a presença de grânulos acastanhados de HRP no citoplasma de células perivasculares com distribuição e topografia compatíveis com as das células Mato (cabeça de seta). B: duas horas após a injeção endovenosa de Dil-ac-LDL, observou-se a presença de grânulos fluorescentes vermelhos (cabeça de seta) no citoplasma de células perivasculares com distribuição e topografia compatíveis com as das células Mato. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). V, vaso sanguíneo. Barras: 9 µm (A) e 7 µm (B). ..... 112

**Figura 33** Conteúdo em ferro. A: a microanálise por EDX revelou que nos lisossomas das células Mato (1) se encontrava uma quantidade de ferro significativamente superior à dos citoplasmas das células Mato (2) e de Müller (3). Nestes, a quantidade de ferro era semelhante, mas ainda assim, significativamente maior do que a detectada no espaço extracelular perivascular (4). Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± erro padrão de 9 quantificações, nos quatro tipos de estruturas analisadas; \* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,0001$ . B: quantificação do conteúdo em ferro no lisossoma da célula Mato e no espaço perivascular por meio de microanálise por EDX. Apesar da quantidade de ferro acumulada nos lisossomas das células Mato, os níveis de ferro no espaço extracelular perivascular mantinham-se em valores basais. L, lúmen; E, célula endotelial; Mt, célula Mato; EP, espaço perivascular; Mu, célula de Müller... 115

**Figura 34** Vesículas de endocitose nas células Mato da retina. A microanálise por EDX revelou que, nas vesículas de endocitose, o ferro se localizava na periferia das mesmas, sugerindo que a proteína transportadora do ferro, transferrina, se encontrava ainda ligada ao seu receptor de membrana. As imagens mostram a selecção das estruturas analisadas e os pontos de incidência do feixe de radiação da microanálise por EDX: 1, ponto de incidência da radiação, na periferia da vesícula de endocitose; 2, ponto de incidência da radiação, no centro da vesícula de endocitose. Barra: 570 nm. .... 116

**Figura 35** Endocitose de ferritina. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-TIM-2 mostrou a existência destes receptores de membrana específicos para a ferritina. E, eritrócito; Autofluor, autofluorescência; Cabeça de seta, inclusão citoplasmática autofluorescente da célula Mato. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 7 µm. .... 118

**Figura 36** As células Mato acumulam ferritina. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-ferritina mostrou a existência de ferritina (setas) nas células Mato. Autofluor, autofluorescência; Cabeça de seta, inclusão citoplasmática autofluorescente da célula Mato. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 5 µm. .... 118

**Figura 37** Endocitose de ferritina. A: seis horas após a injeção endovenosa de ferritina de baço de cavalo, o teste histoquímico usado para detectar ferro nas retinas (reacção de Azul da Prússia) revelou a presença de grânulos azul turquesa no citoplasma de células perivasculares com uma distribuição e

- topografia compatível com as das células Mato (seta). Não foi detectado ferro nas retinas de murganhos não injectados. Er, eritrócito. Barra: 8  $\mu\text{m}$ . ..... 119
- Figura 38** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). A: aspecto de uma retina normal. B: 48 horas após a injeção de iodato de sódio, a desorganização dos núcleos da camada nuclear externa e a diminuição do número de fotorreceptores é evidente. A marcação com o anticorpo anti-GFAP (vermelho) mostrou uma clara proliferação das células de Müller. Coloração histológica Hematoxilina-Eosina. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). CG, camada de células ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear externa. Barras: 30  $\mu\text{m}$ . ..... 122
- Figura 39** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Aspecto da retina com lesões degenerativas a nível dos fotorreceptores. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-2F8, revelada com DAB, evidenciou a presença de células com RS-A, marcadas a castanho (setas), a nível da camada nuclear externa, 48 horas após a injeção de iodato de sódio. NE, camada nuclear externa; NI, camada nuclear interna. Barra: 15  $\mu\text{m}$ . ..... 124
- Figura 40** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Redução do número de fotorreceptores. A marcação dos cones com a lectina PNA (vermelho) evidencia extensas áreas com uma significativa redução do número de fotorreceptores e onde apenas se encontram os núcleos da camada nuclear interna (azul). Estas zonas são coincidentes com a presença de diversas células autofluorescentes (setas) localizadas preferencialmente nos bordos das zonas com lesões. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 16  $\mu\text{m}$ . ..... 124
- Figura 41** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Migração das células Mato. 48 horas após a injeção de iodato de sódio, observa-se a presença de células autofluorescentes BM8 e 2F8-positivas (células Mato) na camada nuclear externa. Estas células nunca foram observadas nesta localização em retinas normais. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 25  $\mu\text{m}$  (A) e 33  $\mu\text{m}$  (B). ..... 126
- Figura 42** Células Mato em retinas humanas. A e B: as cabeças de seta assinalam grânulos autofluorescentes junto aos núcleos de células perivasculares. Retinas marcadas com os anticorpos anti-colagénio IV (C) e anti-GFAP (D) mostram que as células Mato da retina se localizam no espaço perivascular, entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e os pés vasculares das células da nevrógia que revestem a sua superfície abluminal. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* e com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 7,5  $\mu\text{m}$  (A), 7  $\mu\text{m}$  (B), 15  $\mu\text{m}$  (C) e 15  $\mu\text{m}$  (D). ..... 129
- Figura 43** A coloração com *oil red O* permitiu confirmar a presença de lípidos nas inclusões citoplasmáticas de células perivasculares



com localização e topografia compatíveis com as das células  
Mato (seta). V, vaso sanguíneo. Barra: 28  $\mu\text{m}$ . ..... 130

**Figura 44**

Retina humana. A: aspecto de uma retina saudável. B: aspecto  
de uma retina com retinopatia; a presença de gliose reactiva  
indica o estabelecimento de um processo de retinopatia; nesta  
retina pode observar-se a presença de células  
autofluorescentes (cabeça de seta) no local das lesões, a nível  
da camada nuclear externa. CG, camada de células  
ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear  
externa; Retinop, retinopatia. MVLC. Núcleos marcados com  
*Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 24  $\mu\text{m}$ . ..... 130

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Anticorpos primários. ....	61
<b>Tabela 2</b>	Anticorpos secundários. ....	62
<b>Tabela 3</b>	Fluorocromos. ....	62
<b>Tabela 4</b>	Lectinas. ....	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Ac** - acetilada

**AGE** - produtos avançados de glicação (*advanced glycation endproducts*)

**BA** - filtro de emissão (*barrier filter emission*)

**DAB** - diaminobenzidina

**BHR** - barreira hemato-retiniana

**DM** - espelho dicróico (*dichroic mirror*)

**EX** - excitação (*excitation*)

**EDX** - energia dispersiva por radiação-X

**GFAP** - proteína glial fibrilar acídica (*glial fibrillary acidic protein*)

**HRP** - peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*)

**IgG** - Imunoglobulina da classe G

**LDL** - lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

**NBF** - formaldeído tamponado (*neutral buffered formaline*)

**MET** - microscopia electrónica de transmissão

**MEV** - microscopia electrónica de varrimento

**MVLC** - microscopia de varrimento laser confocal

**MHC-I/II** - complexo de histocompatibilidade maior da classe I/II

**PBI** - PBS + 0,1% Igepal

**PO<sub>4</sub>** - solução tampão de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBS** - solução tampão de fosfato (*phosphate buffer saline*)

**RS-A** - receptores *scavenger* da classe A

**VEGF** - factor de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*)

**WB** - solução tampão (*wash buffer*)



## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

**Å** - angström (submúltiplo do metro, m)

**CO<sub>2</sub>** - dióxido de carbono

**Fe<sup>2+</sup>** - ião ferroso

**Fe<sup>3+</sup>** - ião férrico

**g** - grama (submúltiplo do quilograma, kg)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - água oxigenada

**kg** - quilograma (Unidade SI de massa)

**kV** - quilovolts (múltiplo do volt, V)

**l** - litro (Unidade SI de volume)

**M** - molaridade, concentração molar ou concentração em mol/L; razão da quantidade de matéria (*mol*) por volume de solução (em litros)

**mg** - miligrama (submúltiplo do quilograma, kg)

**ml** - mililitro (submúltiplo do litro, l)

**mm** - milímetro (submúltiplo do metro, m)

**mm<sup>2</sup>** - milímetro quadrado (submúltiplo do metro quadrado, m<sup>2</sup>)

**nm** - nanómetro (submúltiplo do metro, m)

**pH** - simétrico do logaritmo decimal da actividade hidrogeniónica

**r.p.m.** - rotações por minuto, unidade de frequência usada para medir a velocidade rotacional

**U.I.** - unidades internacionais

**UV** - ultravioleta

**µg** - micrograma (submúltiplo do quilograma, kg)

**µl** - microlitro (submúltiplo do litro, l)

**µm** - micrómetro (submúltiplo do metro, m)

° - grau

°C - grau Celcius ou centígrado (Unidade SI da grandeza temperatura)

**λ** - comprimento de onda



# **INTRODUÇÃO**





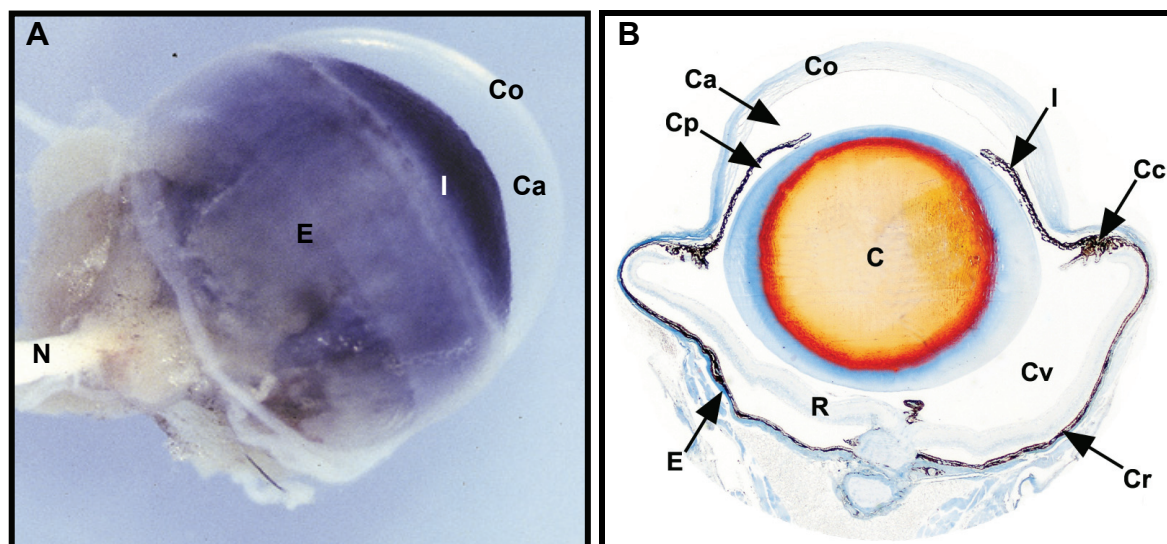
## INTRODUÇÃO

### 1. RETINA

#### 1.1. OLHO

O *olho* é um órgão especializado na função visual. Situado na órbita, é constituído pelo *bulbo ocular* e pelos *órgãos anexos ao bulbo ocular*, músculos extrínsecos do bulbo ocular, bainha do bulbo ocular (Tenon), pálpebras, conjuntiva e aparelho lacrimal. Incorpora o nervo óptico, as túnicas do bulbo ocular, o cristalino e as câmaras intrabulbares (Figura 1).

As células capazes de transformar a luz recebida em impulsos nervosos – *fotorreceptores* – em conjunto com as células neuronais de integração estão localizadas na retina (Figura 1). As restantes estruturas oculares ou constituem elementos de suporte da retina ou estão envolvidas no processo de focagem das imagens que nela se formam.



**Figura 1.** Morfologia do bulbo ocular. A. Bulbo ocular de murganho. B. Secção sagital do bulbo ocular de murganho; coloração histológica tricrômica de Mallory. E, esclera; Co, córnea; Cr, corioideia; Cc, corpo ciliar; I, íris; N, nervo óptico; R, retina; Cv, câmara vítrea do bulbo ocular; C, cristalino; Ca, câmara anterior do bulbo ocular; Cp, câmara posterior do bulbo ocular. Imagens cedidas por Ruberte, J.

O bulbo ocular (*Bulbus oculi*), de forma sensivelmente esférica, é composto por três túnicas concêntricas que constituem as suas paredes: uma *túnica fibrosa* (mais exterior), uma *túnica músculo-vascular* (camada intermédia, pigmentada e profusamente vascularizada) e uma *túnica nervosa* (a mais interna), constituída pela retina (Figura 1 B). No seu interior existem diversos meios transparentes: o *corpo vítreo*, que preenche a câmara vítrea do bulbo ocular, o *crystalino* e o *humor aquoso*, contido nas câmaras anterior e posterior do bulbo ocular (Esperança-Pina, 1998).

A túnica fibrosa do bulbo ocular (*Tunica fibrosa bulbi*) divide-se na esclera, porção opaca mais posterior, e na córnea, porção transparente mais anterior (Figura 1 B).

A esclera (*Sclera*) é uma membrana opaca que apresenta geralmente cor branca. É constituída por tecido conjuntivo fibroso, contendo fibras de colagénio de tipo I entrecruzadas com fibras elásticas (Gonçalves & Bairos, 2006). Reveste cerca de 80% da superfície exterior do bulbo ocular. Dá inserção aos músculos extrínsecos do bulbo ocular e é atravessada pelas veias vorticosas e pelas artérias e nervos ciliares. A sua abertura posterior permite a passagem do nervo óptico. Esta abertura apresenta-se coberta anteriormente pela lâmina cribiforme (*Lamina cribosa*), com numerosos orifícios para passagem dos feixes do nervo óptico e da artéria e veia central da retina.

A córnea (*Cornea*) é uma membrana transparente e avascular que se une ao bordo anterior da esclera, união conhecida por limbo da córnea (*Limbus cornae*). É significativamente mais convexa do que esta última, apresentando formas variadas consoante as espécies. No murganho, por exemplo, apresenta uma forma circular (Smith, 2002). O estroma da córnea, delimitado anteriormente pela membrana elástica anterior (Bowman) e pelo epitélio corneano anterior e posteriormente pela membrana elástica posterior (Descemet) e pelo epitélio corneano posterior, é constituído por queratócitos e por colagénio de tipo I e IV (Gonçalves & Bairos, 2006). A córnea é innervada pelos nervos ciliares que formam um plexo na sua superfície.

A túnica músculo-vascular do bulbo ocular (*Tunica vasculosa bulbi*) contém a maior parte dos vasos sanguíneos; é composta pela *coroideia* (porção posterior), *corpo ciliar* (porção média) e *íris* (porção anterior) (Figura 1 B).

A coroideia (*Choroidea*), situada entre a retina e a esclera, é uma membrana conjuntivo-vascular, com células pigmentares, limitada anteriormente pela *ora serrata* e posteriormente pela área de passagem do nervo óptico. É constituída por diferentes camadas: *lâmina supracoroideia* (a mais exterior), *espaço pericoroideu* (espaço vascular que contém vasos linfáticos, ramos das artérias ciliares longas e curtas, veias vorticosas e nervos ciliares), *lâmina vascular* (contém volumosos vasos sanguíneos), *lâmina coroidocapilar* (é constituída por capilares e reveste interiormente a lâmina vascular) e *lâmina basilar* (estrato externo da membrana vítrea (Bruch), colocada entre a coroideia e o epitélio pigmentar da retina) (Gonçalves & Bairos, 2006). O seu elevado conteúdo em melanina permite absorver a luz que atravessa a retina, evitando a sua refacção no interior do bulbo ocular. A coroideia possui, em algumas espécies, dorsalmente ao disco do nervo óptico, uma zona avascular, de forma semilunar, de diferente coloração consoante a espécie considerada e que apresenta um característico brilho metálico, designada por tapete lúcido (*Tapetum lucidum*). Esta formação anatómica funciona como um espelho que permite que os feixes de luz não absorvidos pelos fotorreceptores sejam reflectidos para a retina, contribuindo, deste modo, para aumentar significativamente a eficácia da visão nocturna. Contudo, o rato e o murganho não possuem tapete lúcido (Wise, Dollery & Henkind, 1971).

O corpo ciliar (*Corpus ciliare*) localiza-se entre a íris e a coroideia, constituindo uma espécie de anel saliente na face interior do bulbo ocular. É formado por uma porção anterior, o músculo ciliar (*Musculus ciliares*), e por uma porção posterior, o processo ciliar (*Processus ciliares*) (Esperança-Pina, 2000). O processo ciliar, constituído por um conjunto de pregas ciliares (*Plicae ciliares*) que formam a coroa ciliar (*Corona ciliares*), é a estrutura envolvida na secreção do humor aquoso. O músculo ciliar, em forma de anel, é o responsável pela acomodação do cristalino (Esperança-Pina, 2000).

A íris (*Iris*) continua anteriormente a coroideia e a porção anterior da retina cega. Funciona como um diafragma. É uma estrutura em forma de coroa circular, constituída por um estroma fibrovascular pigmentado, que pode assumir, nas diferentes espécies, coloração variada, bem como perfis diferentes, consoante o seu grau de contracção. Apresenta uma perfuração central designada por pupila (*Pupilla*). Na íris existem dois círculos arteriosos, estando um situado perifericamente (anel maior da íris) e outro centralmente (anel menor da íris).

A túnica nervosa do bulbo ocular (*Tunica interna bulbi*) é o estrato mais interior do bulbo ocular (Figuras 1 B e 2) e é constituída pela retina (*Retina*). Tem por função receber e transmitir as impressões luminosas ao nervo óptico que, por sua vez, as transmite ao córtex cerebral.

No interior do bulbo ocular existem diferentes meios transparentes: o *corpo vítreo*, o *cristalino* e o *humor aquoso* (Figuras 1 B e 2).

O humor aquoso (*Humor aquosus*) é um líquido que preenche o espaço entre a córnea e o cristalino. A íris divide este espaço em duas câmaras, a câmara anterior (*Camara anterior*) e a câmara posterior (*Camara posterior*) do bulbo ocular. O humor aquoso é continuamente produzido pelos processos ciliares e é drenado através do seio venoso da esclera (Schlemm), no ângulo irido-corneano. É responsável pelo aporte de nutrientes às estruturas avasculares vizinhas, córnea e cristalino. A convexidade fixa da superfície externa da córnea é o principal mecanismo responsável pela focagem da luz na retina e a pressão hidrostática, a nível da câmara anterior do bulbo ocular, ajuda a manter a forma desta estrutura.

O cristalino (*Lens*) é um disco transparente, avascular, biconvexo, situado atrás da pupila, suspenso no bulbo ocular pelas fibras zonulares (Zinn). Revestido por uma cápsula, contém, subjacentes ao epitélio subcapsular, as fibras do cristalino, células epiteliais modificadas, em forma de prisma de seis faces, dispostas paralelamente a cada uma das faces do cristalino. Ocupa, no murganho, cerca de 75% do espaço intra-bulbar (Smith, 2002). A face anterior relaciona-se com a pupila, com a face posterior da íris e com os processos ciliares. A face posterior relaciona-se com o corpo vítreo. Juntamente com a córnea foca a luz na superfície da retina.

O corpo vítreo (*Corpus vitreum*) é uma estrutura de consistência gelatinosa, transparente e incolor que preenche a câmara vítrea do bulbo ocular (*Camara vitrea*). Envolvido pela membrana hialoideia (*Membrana vitrea*), é atravessado pelo canal hialoideu (*Canalis hyaloideus*) que dá passagem à artéria hialoideia, no feto. O corpo vítreo providencia suporte estrutural ao bulbo ocular, oferecendo, contudo, um meio transparente para a passagem da luz. Nos murganhos, é proporcionalmente mais pequeno do que nos humanos, uma vez que a maior parte do bulbo ocular é ocupada pelo cristalino (Smith, 2002).

## 1.2. ESTRUTURA DA RETINA

A retina forma-se a partir da vesícula óptica, uma evaginação do diencéfalo que, por sua vez, se invagina, originando a tábula óptica bilaminar, de onde provêm as duas camadas da retina (epitélio pigmentar e retina neuro-sensorial). O pedículo óptico, que liga a vesícula óptica ao cérebro, origina o nervo óptico. A neuro-retina e o nervo óptico constituem o “oftalmocéfalo” pois representam uma expansão do encéfalo projectada para o interior da órbita (Costa & Morato, 1984; Carlson, 1999).

A retina estende-se desde o disco do nervo óptico até à pupila. É constituída por três porções: *parte óptica da retina* (porção posterior), *porção ciliar da retina* (porção média) e *porção iridiana da retina* (porção anterior) (Figura 2).

Existe uma parte sensível à luz, que se estende desde o nervo óptico até à *ora serrata* (parte óptica da retina) e uma parte cega, insensível à luz (porções ciliar e iridiana da retina).

De uma forma geral, a retina apresenta duas regiões especiais, não coincidentes: a *papila* ou *disco do nervo óptico* (*Discus nervi optici*), correspondente ao ponto de saída do nervo óptico e de passagem da artéria e veia central da retina, e a *mácula lútea* (*Macula lutea*), área altamente sensível da retina. No centro da mácula lútea encontra-se a *fóvea central* (*Fovea centralis*), situada no eixo central do olho. Esta última constitui a área de maior acuidade visual, por conter a mais elevada densidade de cones e por ser a área de maior transparência da retina. A transparência é maior pelo facto de, nesta zona, a retina ser mais delgada, contendo apenas fotorreceptores, e por ser avascular, recebendo os nutrientes e o oxigénio a partir da rede capilar que a rodeia (Slatter, 2001). Contudo, os roedores não possuem fóvea central nem mácula lútea e o disco do nervo óptico é coincidente com o eixo central do olho (Smith, 2002).

Consideram-se 10 camadas distintas na retina, desde a mais interior, que se relaciona com o corpo vítreo, até à mais exterior, que se relaciona com a coróideia (Figuras 2, 3 e 4):

1 – Membrana limitante interna (*Stratum limitans internum*): é constituída pelas expansões citoplasmáticas das células de Müller e separa a retina do corpo vítreo.

2 – Camada de fibras do nervo óptico (*Stratum neurofibrarum*): formada por feixes de axónios não mielinizados das células ganglionares. Estes agrupam-se, a nível do disco do nervo óptico, e perfuram a coroideia e a esclera, onde abandonam o bulbo ocular para dar origem ao nervo óptico. Estas fibras nervosas, bem como os vasos sanguíneos, estão rodeados pelos processos celulares dos astrócitos e das células de Müller.

3 – Camada de células multipolares ou ganglionares (*Stratum ganglionicum*): constituída por uma fileira de corpos celulares de células ganglionares, amácrinas e de astrócitos (Jeon, Strettoi & Masland, 1998; Antonetti *et al.*, 2006).

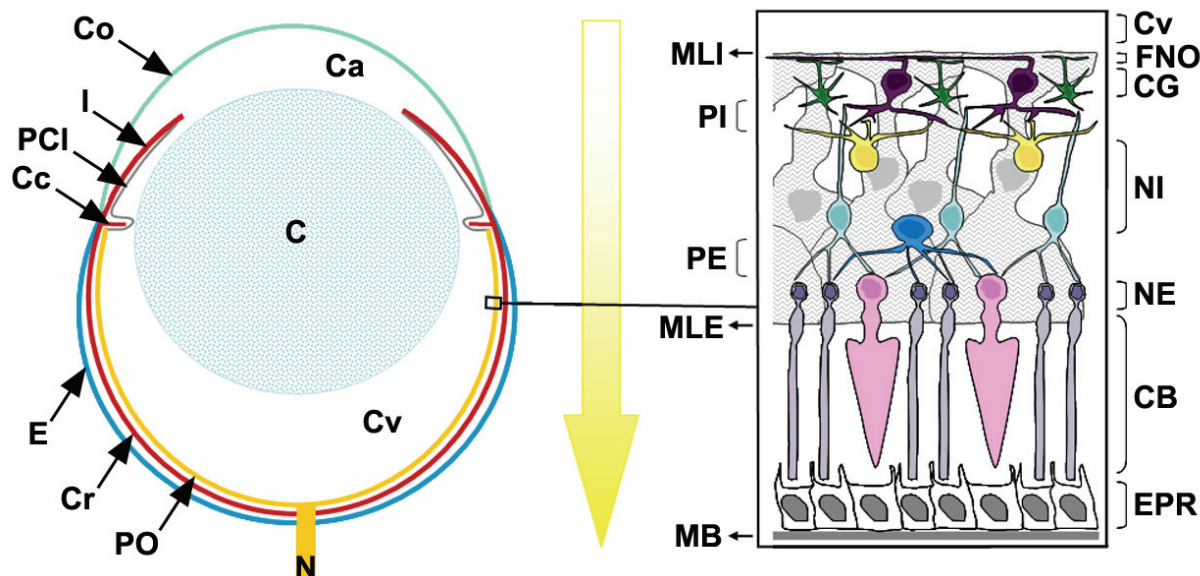
4 – Camada plexiforme interna (*Stratum plexiforme internum*): corresponde ao local de sinapse entre as células bipolares e amácrinas e as células ganglionares.

5 – Camada nuclear ou granulosa interna (*Stratum nucleare internum*): constituída pelos corpos celulares das células bipolares, amácrinas e horizontais de associação e das células de Müller. As células bipolares são as mais abundantes e fazem sinapse entre os fotorreceptores e as células ganglionares. As células horizontais e as células amácrinas interpõem-se entre estas últimas. As células de Müller são células da nevrógia responsáveis pela manutenção da estrutura da retina. Os seus prolongamentos citoplasmáticos distribuem-se por entre as demais células constituintes da retina, formando colunas que ocupam todo o espaço existente entre elas, numa extensão que vai desde a câmara vítrea do bulbo ocular até à membrana limitante externa.

6 – Camada plexiforme externa (*Stratum plexiforme externum*): nesta camada ocorre a articulação entre os axónios dos fotorreceptores, cones e bastonetes, e os dendritos das células bipolares e horizontais.

7 – Camada nuclear ou granulosa externa (*Stratum nucleare externum*): este estrato retiniano é constituído pelos corpos celulares dos cones e bastonetes.

8 – Membrana limitante externa (*Stratum limitans externum*): não é uma membrana propriamente dita; é formada pelas expansões citoplasmáticas das células de Müller que, nessa zona, se unem aos fotorreceptores.

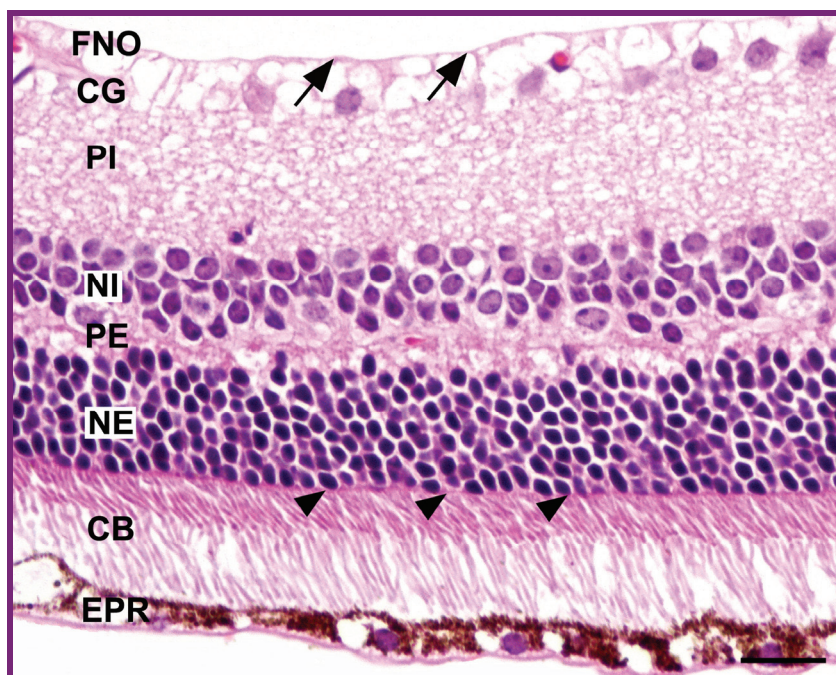


**Figura 2.** Representação esquemática do bulbo ocular de murganho. Detalhe da constituição da retina. Túnica fibrosa do bulbo ocular (E, esclera; Co, córnea), túnica músculo-vascular do bulbo ocular (Cr, coroideia; Cc, corpo ciliar; I, íris) e túnica nervosa do bulbo ocular (PO, parte óptica da retina; PCI, parte ciliar e iridiana da retina); C, cristalino; Ca, câmara anterior do bulbo ocular; Cv, câmara vítrea do bulbo ocular; N, nervo óptico; MLI, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; MB, membrana vítrea (Bruch). A seta amarela indica a direção da luz.

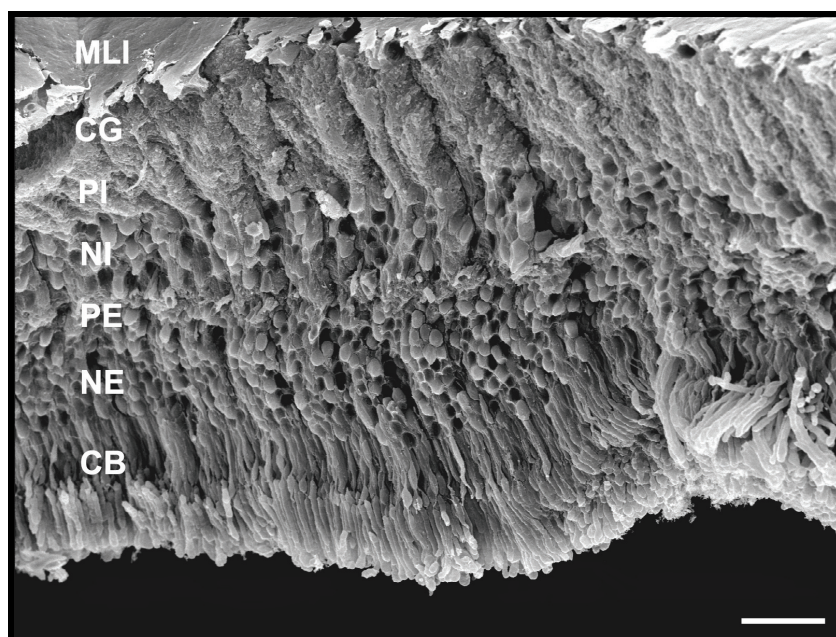
9 – Camada de cones e bastonetes (*Stratum neuroepitheliale*): os fotorreceptores, cones e bastonetes, são constituídos por um segmento externo, um segmento interno, uma região nuclear e uma região sináptica. Neste estrato retiniano encontram-se os segmentos internos e externos dos fotorreceptores. A porção apical destes últimos relaciona-se com o epitélio pigmentar da retina.

10 – Camada de células pigmentares ou epitélio pigmentar da retina (*Stratum pigmentosum*): é o estrato mais exterior da retina. Adjacente à coroideia, reveste praticamente todo o interior do bulbo ocular. De cor negra, uma vez que as suas células contêm grânulos de melanina, absorve e elimina todos os raios luminosos não captados pela parte sensível da retina (Strauss, 2005). Estas células relacionam-se com a membrana vítrea (Bruch).





**Figura 3.** Estrutura da retina. A imagem ilustra a disposição das diferentes camadas da retina. Setas, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; cabeças de seta, membrana limitante externa. Coloração histológica hematoxilina-eosina. Barra: 23  $\mu$ m.



**Figura 4.** Estrutura da retina. Disposição das diferentes camadas da retina. MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; PI, camada plexiforme interna; NI, camada nuclear interna; PE, camada plexiforme externa; NE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes. Microscopia electrónica de varrimento (MEV) sobre tecido intacto. Barra: 20  $\mu$ m.

A retina é uma estrutura capaz de transformar a informação recebida pelos fotorreceptores, estímulos no comprimento de onda de luz visível, sob a forma de energia fotoquímica, em estímulos eléctricos. Esta informação é modulada e transmitida por neurotransmissores ou através de alterações de potencial de membrana ao longo de uma série de células neuronais retinianas (células bipolares, horizontais, amácrinas e células ganglionares). O influxo nervoso propaga-se então pelos axónios das células ganglionares que, uma vez reunidos no nervo óptico, o transmitem ao córtex visual.

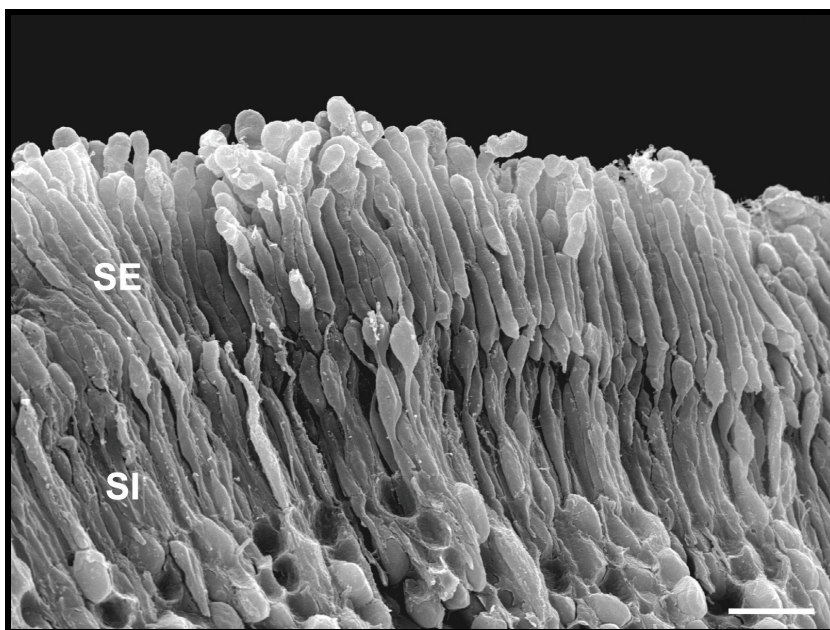
A retina é constituída por cinco tipos principais de células responsáveis pelas funções sensorial, reguladora, nutritiva e imuno-reguladora. A visão normal está, por conseguinte, na dependência da normal inter-relação e integração funcional das células neuronais, das células da nevrógliã, microglíocitos, células vasculares e células do epitélio pigmentar da retina.

O primeiro tipo celular referido reúne os diferentes tipos de células neuronais presentes na retina: fotorreceptores e células neuronais de associação, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares.

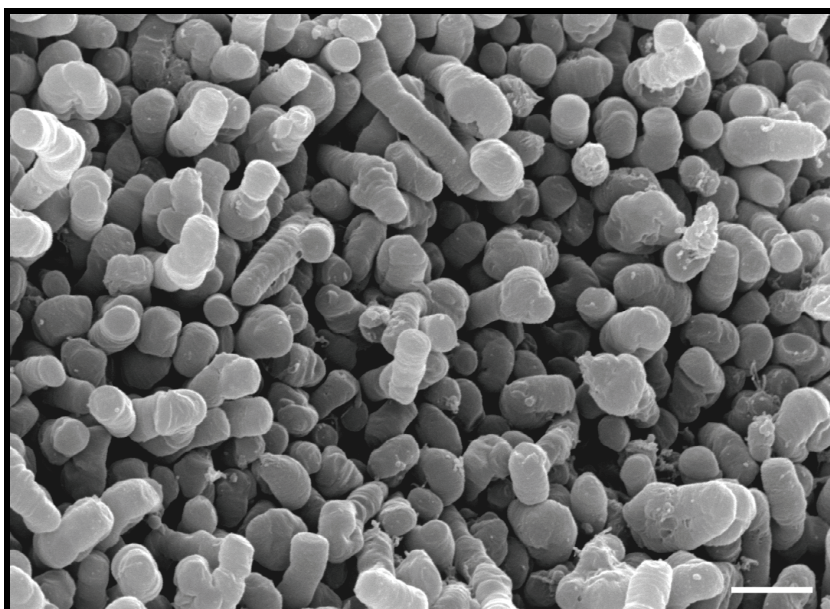
1.1. *Fotorreceptores*: são células especializadas, sensíveis à luz, localizadas nas camadas mais externas da retina; quando excitadas pela energia luminosa, estimulam as células nervosas adjacentes, gerando um impulso nervoso que se propaga pelo nervo óptico até ao córtex visual (Figuras 5, 6 e 7).

Existem dois tipos diferentes de células fotorreceptoras com diferentes tipos de pigmento visual na sua constituição: os *cones* e os *bastonetes*. Os cones, activos em regime fotópico, têm um grande poder de resolução, são sensíveis à luz brilhante e são responsáveis pela visão cromática. Os bastonetes, activos em regime escotópico, são mais sensíveis a condições de pouca luminosidade. No murganho, os bastonetes representam cerca de 95-97% dos fotorreceptores, sendo o seu número aproximado de 6,4 milhões, o que está relacionado com os hábitos nocturnos desta espécie (Jeon *et al.*, 1998; Smith, 2002).

Nos segmentos externos dos fotorreceptores encontra-se acumulado o pigmento visual, disposto em pilhas de discos, rodeados por membrana celular (Figuras 5, 6 e 7). A sensibilidade à luz de cada tipo de fotorreceptor depende do tipo de pigmento que contém, uma vez que este determina o comprimento de onda da luz que pode absorver.

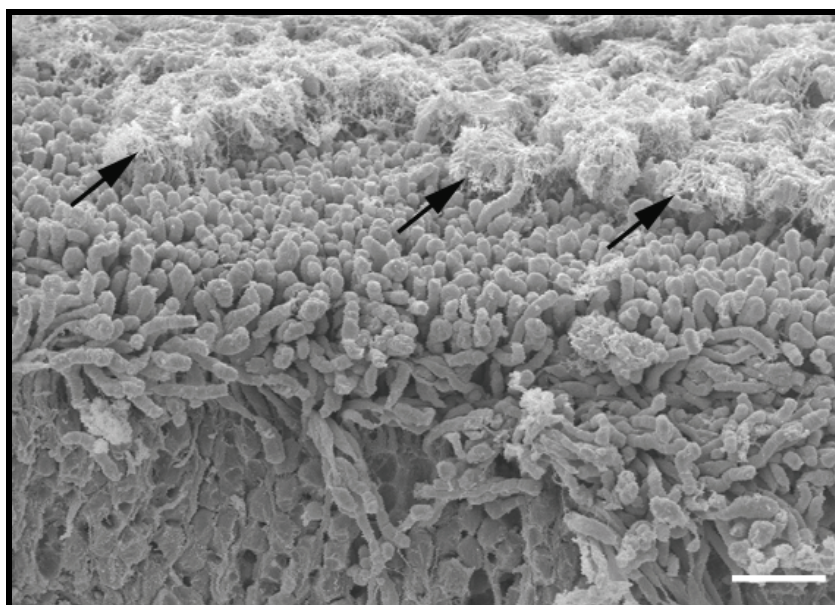


**Figura 5.** Detalhe dos fotorreceptores, cones e bastonetes. SE, segmento externo, SI, segmento interno. MEV sobre tecido intacto. Barra: 6  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Detalhe dos fotorreceptores. Aspecto dos segmentos externos dos cones e bastonetes. MEV sobre tecido intacto. Barra: 3,5  $\mu\text{m}$ .





**Figura 7.** Detalhe dos fotorreceptores. Aspecto da porção apical do segmento externo dos fotorreceptores que se relaciona com o epitélio pigmentar da retina (setas). MEV sobre tecido intacto. Barra: 11  $\mu$ m.

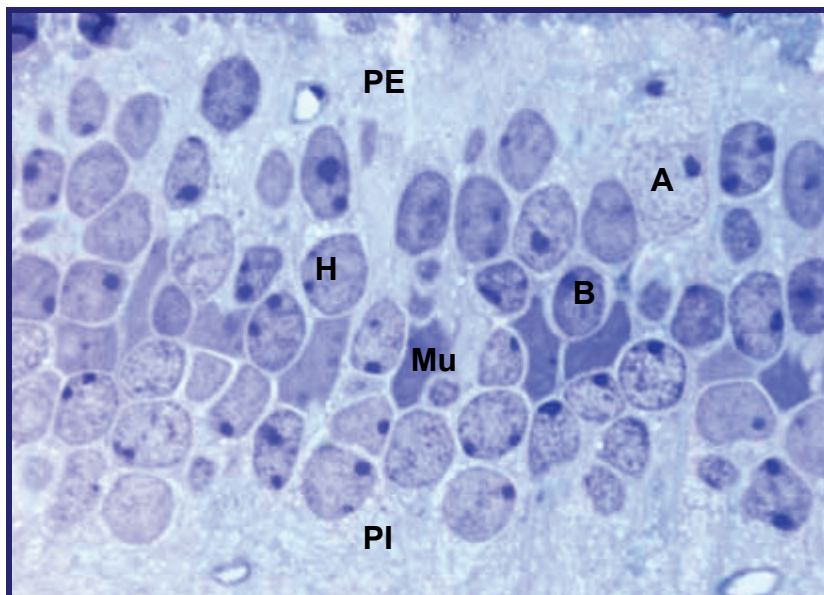
As moléculas de pigmento visual são constituídas por uma proteína – opsina – ligada a um grupo prostético – 11-*cis*-retinal. Quando se dá a absorção de um fóton, o grupo 11-*cis*-retinal sofre uma isomerização, transformando-se no *trans*-retinal, com a consequente alteração da estrutura tridimensional da opsina. Esta nova conformação da molécula de pigmento é um sinal de detecção de luz, conduzindo ao encerramento dos canais de sódio na membrana celular e dando início à cascata de fototransdução, a nível da célula fotorreceptora. As alterações no potencial de membrana dos cones e bastonetes, em resposta à absorção de luz, vão alterar a taxa de libertação de neurotransmissores, gerando um potencial de acção ao longo de todas as células envolvidas na transmissão do impulso nervoso (Wolf, 2004).

O processo de absorção de luz e de transdução de energia provoca o desgaste dos pigmentos visuais. As células do epitélio pigmentar da retina fagocitam os segmentos externos dos fotorreceptores e são as responsáveis pela reciclagem do *trans*-retinal, para nova síntese de pigmento visual, bem como pela reciclagem de outras moléculas necessárias à contínua regeneração dos segmentos externos dos fotorreceptores (Wolf, 2004).

1.2. Nas camadas mais internas da retina estão presentes os *neurónios de associação* (Figura 8):

- *Células bipolares*: são os neurónios de associação mais abundantes, constituindo cerca de 41% das células da camada nuclear interna (Jeon *et al.*, 1998);
- *Células horizontais*: os seus prolongamentos formam a camada plexiforme externa; fazem sinapse com as uniões sinápticas entre os fotorreceptores e as células bipolares, modulando a actividade sináptica. Constituem aproximadamente 3% das células da camada nuclear interna (Jeon *et al.*, 1998);
- *Células amácrinas*: os seus prolongamentos formam a camada plexiforme interna; localizam-se no limite interno da camada nuclear interna, fazendo sinapse com os complexos sinápticos das células bipolares e ganglionares. Constituem cerca de 40% das células da camada nuclear interna (Jeon *et al.*, 1998).

1.3. *Células ganglionares*: dispostas numa fileira, contribuem para a formação da camada das células ganglionares. Os seus axónios vão constituir as fibras do nervo óptico.



**Figura 8.** Tipos celulares da retina. Detalhe da camada nuclear interna: H, células horizontais; B, células bipolares; A, células amácrinas; Mu, células de Müller; PI, camada plexiforme interna; PE, camada plexiforme externa. Coloração histológica azul de toluidina.

O segundo tipo celular retiniano supracitado diz respeito às células da *nevrógli*a: o tecido glial confere suporte aos diferentes elementos celulares, mantendo a integridade estrutural da retina. Engloba as células de Müller e os astrócitos.

- *Células de Müller*: os núcleos destas células encontram-se na camada nuclear interna (Figura 8), onde constituem cerca de 16% das células aí presentes (Jeon *et al.*, 1998). O seu citoplasma atravessa toda a retina, dispondo-se de forma colunar desde a câmara vítrea do bulbo ocular, onde formam a membrana limitante interna, até à camada de cones e bastonetes, onde formam a membrana limitante externa. A sua particular topografia transforma estas células em elementos fundamentais na manutenção da integridade estrutural da retina. Os seus prolongamentos citoplasmáticos envolvem os axónios das células ganglionares e os vasos sanguíneos (Hollander *et al.*, 1991).
- *Astrócitos*: confinados às regiões vascularizadas da retina, envolvem, com os seus prolongamentos citoplasmáticos, os vasos sanguíneos e os axónios não mielinizados das células ganglionares (Hollander *et al.*, 1991). Estão ausentes nas espécies com retinas avasculares, como o coelho e o cavalo (Schnitzer, 1987; Stone & Dreher, 1987; Haddad *et al.*, 2001). Os astrócitos, constringindo os vasos sanguíneos, desempenham igualmente um importante papel na manutenção da sua integridade estrutural (Zhang & Stone, 1997).

Os prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller e dos astrócitos que revestem os vasos sanguíneos designam-se por *pés vasculares*. O íntimo contacto que se estabelece entre as células da *nevrógli*a e as estruturas vasculares, associado à interposição dos pés vasculares destas células entre os vasos sanguíneos e o parênquima retiniano, explica o envolvimento das células de Müller e dos astrócitos no aporte de nutrientes e nos mecanismos de regulação das células neuronais retinianas (Gardner *et al.*, 2002; Newman, 2003; Antonetti *et al.*, 2006).

O terceiro tipo celular retiniano referido é representado pelas *células da micrógli*a: os microglíocitos são considerados os *macrófagos residentes* da retina. Presentes nas camadas mais superficiais da retina, encontram-se, normalmente, não activados. São células que apenas são activadas mediante a acção de determinados estímulos,

participando na defesa contra microrganismos, na imuno-regulação, na fagocitose e regeneração tecidual (Roitt, Brostoff. & Male, 2001; Chen, Yang & Kijlstra, 2002).

As características morfológicas e funcionais mais relevantes das *células do epitélio pigmentar da retina* e das estruturas *vasculares* descrevem-se nos capítulos seguintes.

### 1.3. VASCULARIZAÇÃO DA RETINA

A retina exhibe um delicado compromisso entre a função visual (necessidade da maior transparência possível para passagem da luz) e a vascularização (necessidade de oxigenação), de tal forma que as estruturas vasculares constituem menos de 5% de toda a massa retiniana (Gardner *et al.*, 2002). Efectivamente, os capilares retinianos são escassos e de pequeno calibre (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier, 2003), com uma distribuição espacial característica ao longo das diferentes camadas da retina, de forma a assegurar a menor interferência possível com a passagem da luz que tem de atravessar toda a espessura da retina para alcançar os fotorreceptores. Na retina humana, por exemplo, a fóvea central, a área de maior acuidade visual, é completamente avascular, precisamente para oferecer um menor impedimento à passagem da luz (Slatter, 2001). Nos roedores, contudo, não existe fóvea central e toda a retina é vascularizada (Smith, 2002).

O fluxo sanguíneo da retina é relativamente baixo (Alm & Bill, 1973) o que, aliado ao elevado consumo de oxigénio pelas células nervosas (Bristow, Griffiths, Andrews, Johnson & Turnbull, 2002), justifica algumas das particularidades da sua árvore vascular. A geometria do sistema vascular e a sua distribuição espacial, bem como a estrutura dos vasos sanguíneos retinianos, constituem factores determinantes na manutenção da função visual da retina (Correia, 1984).

Nos vertebrados pode encontrar-se uma grande variabilidade quanto ao tipo de vascularização retiniana, apesar de, na maioria dos animais, a retina ser uma estrutura avascular e, efectivamente, a presença de vasos intra-retinianos constituir uma excepção (Wise *et al.*, 1971).

Pensa-se existir uma correlação directa entre a espessura da retina e o tipo de vascularização que se estabelece. Nas retinas mais delgadas, com uma espessura inferior a 150  $\mu\text{m}$ , o aporte de oxigénio e nutrientes pelos vasos da coróideia é suficiente para suprir as necessidades dos estratos mais internos. No entanto, se a espessura da retina exceder os 150  $\mu\text{m}$ , esta deverá ser vascularizada (Chase, 1982; Buttery, Hinrichsen, Weller & Haight, 1991). Aparentemente, para além de um determinado limiar de espessura é necessário o aporte adicional de oxigénio e nutrientes por meio de vasos intra-retinianos.



A retina das espécies submamíferas (excepto a da enguia) é avascular, isto é, não contém vasos sanguíneos intra-retinianos. O aporte de nutrientes e oxigénio são responsabilidade de vasos da coroideia e do corpo vítreo. São disso exemplo, os vasos vítreos dos peixes teleósteos, dos anfíbios e dos répteis. Alguns répteis, como crocodilos e cobras, possuem uma rede vascular no corpo vítreo, *conus papillaris*, que se assemelha ao pecten das aves (Wise *et al.*, 1971).

Na retina dos mamíferos, no entanto, os vasos sanguíneos invadem a neuroectoderme, a partir do disco do nervo óptico, dando origem a vasos intra-retinianos. Na maioria dos mamíferos, a retina recebe sangue, por conseguinte, através de dois sistemas vasculares distintos: os vasos sanguíneos da coroideia e os vasos sanguíneos da retina. Desde o estrato mais externo da retina até à camada nuclear externa, a retina recebe sangue dos vasos da coroideia, estando os restantes estratos dependentes da circulação intra-retiniana (Smith, 2002).

Jonhson (1901) e Leber (1903) propuseram a definição de quatro tipos de retina em função das características da sua vascularização: euangiótica ou holoangiótica, pseudoangiótica ou paurangiótica, angiótica ou merangiótica e anangiótica (Wise *et al.*, 1971).

A retina do murganho e do homem, detentora de um tipo de vascularização em que os vasos se distribuem por toda a retina, desde o disco do nervo óptico até à periferia, constitui um tipo de retina *euangiótica* ou *holoangiótica* (Germer *et al.*, 1998). Neste tipo de retinas, a árvore vascular está na dependência da artéria central da retina ou de ramos cílio-retinianos, como é o caso do cão, que emergem do disco do nervo óptico (Esperança-Pina, 2007). É constituída por arteríolas, vénulas e por uma relativamente extensa rede de capilares. Este tipo de vascularização é característica de alguns insectívoros, roedores, carnívoros, de alguns ungulados e de todos os primatas (Wise *et al.*, 1971).

Retinas do tipo *pseudoangiótico* ou *paurangiótico*, com os vasos sanguíneos distribuídos ao redor do disco do nervo óptico, podem ser encontradas em espécies como o cobaio, o elefante e o cavalo (De Schaepdrijver, Simoens, Lauwers & De Geest, 1989; Barnett, Crispin, Lavach & Matthews, 1995; Yu & Cringle, 2001).

Um padrão diferente é o existente nos lagomorfos, coelho e lebre, do tipo *angiótico* ou *merangiótico* (Wise *et al.*, 1971; Ramirez *et al.*, 2001), em que não existem vasos sanguíneos intra-retinianos, mas sim uma estreita banda de vasos supra-retinianos ou intravítreos que formam feixes capilares, de forma radial, sobre a camada de fibras do nervo óptico.

Num outro extremo, encontramos a retina das aves que é completamente avascular, com um padrão do tipo *anangiótico*. Nas aves existe o pecten ocular (*Pecten oculi*), estrutura densamente vascularizada, que imerge junto ao nervo óptico, projectando-se para o interior da câmara vítrea do bulbo ocular, sendo o responsável pelo aporte de nutrientes e oxigénio à retina (Wolburg, Liebner, Reichenbach & Gerhardt, 1999).

### **1.3.1. FORMAÇÃO DOS VASOS DA RETINA**

No homem, da 14<sup>a</sup> à 21<sup>a</sup> semana de gestação, formam-se os primeiros vasos sanguíneos, na parte central da retina, por um processo de vasculogénese. As células precursoras migram a partir do disco do nervo óptico e os angioblastos diferenciam-se, formando os cordões vasculares primitivos que irão dar origem aos vasos sanguíneos (Flynn & Chan-Ling, 2006). Posteriormente, formam-se os restantes vasos, por um processo de angiogénese. Ocorre um aumento da densidade vascular, na região central da retina, e forma-se o plexo vascular profundo, por volta da 25<sup>a</sup> semana de gestação. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos, contudo, só está completo por volta das 36<sup>a</sup>-40<sup>a</sup> semanas (Hughes, Yang & Chang-Ling, 2000).

Ao contrário do homem, o murganho nasce com uma retina praticamente avascular. É no decurso das duas primeiras semanas de vida pós-natal que ocorre o processo de vascularização desta estrutura. Os vasos crescem de forma radial, a partir do disco do nervo óptico, até à periferia da retina, de forma semelhante ao que ocorre no feto humano, e é nesta altura que se estabelecem os três plexos vasculares característicos (Connolly, Hores, Smith & D'Amore, 1988).

Ao longo do desenvolvimento embrionário observa-se, contudo, a existência de uma rede vascular transitória, o sistema vascular hialóide, constituído pelos vasos hialoideus, situados no corpo vítreo e que se originam a partir da artéria hialoideia (*A. hialoidea*). Esta última, ramo da artéria central da retina (*A. centrales retinae*), penetra na tacícula óptica, através da fenda coroideia, dando origem também à túnica vascular do cristalino (*Tunica vascularis lentis*). Após o nascimento, ocorre a regressão gradual dos vasos hialoideus, deixando de existir estas estruturas vasculares (Carlson, 1999; Ito & Yoshioka, 1999).

### 1.3.2. PADRÃO VASCULAR DA RETINA

Como referido, na maioria dos mamíferos, o aporte sanguíneo à retina está na dependência dos vasos sanguíneos da coroideia e da retina. Os estratos mais externos são vascularizados pelos vasos sanguíneos da coroideia; a partir da camada plexiforme externa, todos os outros estratos da retina recebem sangue dos vasos intra-retinianos. (Smith, 2002).

Os vasos da retina, de uma forma geral, provêm de duas artérias: a artéria oftálmica externa (*A. ophthalmica externa*) que se origina a partir da artéria carótida externa (*A. carotis externa*) e a artéria oftálmica interna (*A. ophthalmica interna*) que se origina a partir da artéria carótida interna (*A. carotis interna*). No murganho, contudo, e à semelhança do que ocorre no homem, existe apenas uma artéria que vasculariza o olho: a artéria oftálmica (*A. ophthalmica*), ramo da artéria carótida interna (Smith, 2002; Esperança-Pina, 2007).

A artéria oftálmica origina a artéria central da retina (*A. centralis retinae*) que penetra no bulbo ocular, rodeada por fibras do nervo óptico, e emerge a nível do disco do nervo óptico. No murganho, a artéria central da retina ramifica-se em 5 a 7 arteríolas de 2ª ordem que divergem de forma radial até à periferia da retina (Figura 9).

Neste trabalho, foi adoptada a classificação dos vasos sanguíneos proposta por Esperança-Pina (2007), segundo a qual se designam por (i) *arteríolas* ou *vénulas de 1ª ordem*, (ii) *arteríolas* ou *vénulas de 2ª ordem* e (iii) *arteríolas pré-capilares*, *arteríolas terminais*, *metarteríolas* ou *vénulas pós-capilares*, os vasos que apresentam calibres compreendidos entre 200 e 100 µm, 100 e 30 µm e entre 30 µm e o calibre dos capilares, respectivamente;

denominam-se *ductos preferenciais*, os vasos com um calibre entre 10 e 15  $\mu\text{m}$ , que se originam nas arteríolas pré-capilares e que terminam directamente nas vénulas pós-capilares; todos os vasos sanguíneos com um calibre inferior a 9  $\mu\text{m}$  são designados por *capilares*.

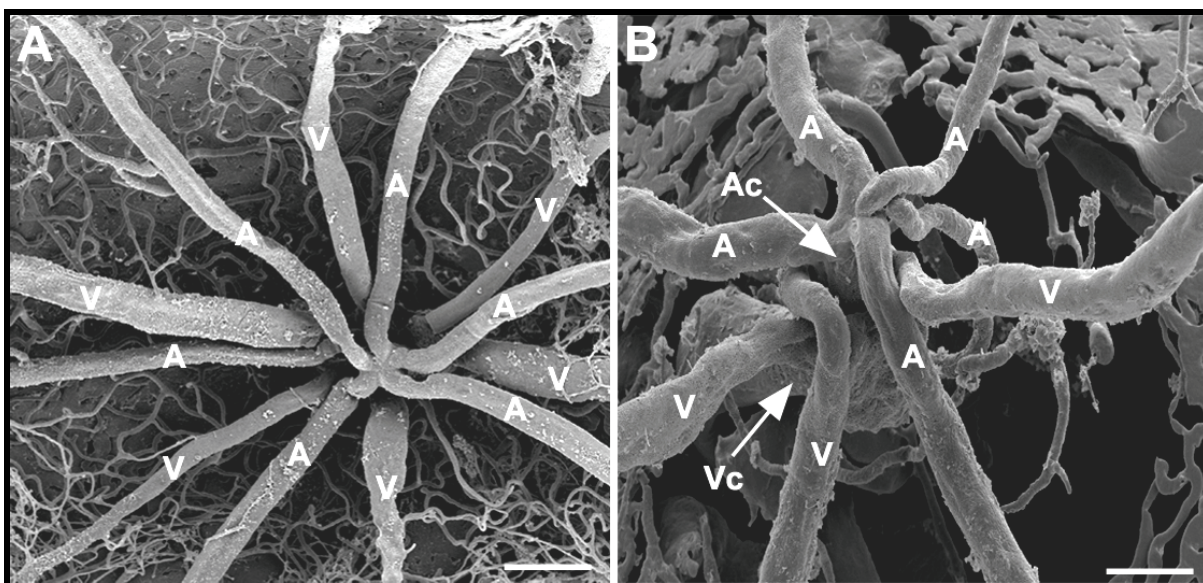
Os vasos sanguíneos retinianos apresentam uma geometria e distribuição espacial característica, organizando-se de forma a constituir três plexos vasculares, localizados em planos segmentares distintos, anastomosados entre si por meio de vasos de direcção perpendicular (Figura 10): *plexo vascular interno*, a nível da camada de fibras do nervo óptico e da camada de células ganglionares, *plexo vascular intermédio*, na face interna da camada nuclear interna e *plexo vascular externo*, a nível da camada plexiforme externa (Paques *et al.*, 2003). Não existem vasos sanguíneos intra-retinianos para além destas camadas.

Os vasos de maior calibre (arteríolas e vénulas de 2ª ordem) encontram-se na porção mais interna da retina, distribuindo-se na camada de fibras do nervo óptico e na camada de células ganglionares, estando separados da membrana limitante interna por uma delgada camada de elementos neuronais e da nevrógia.

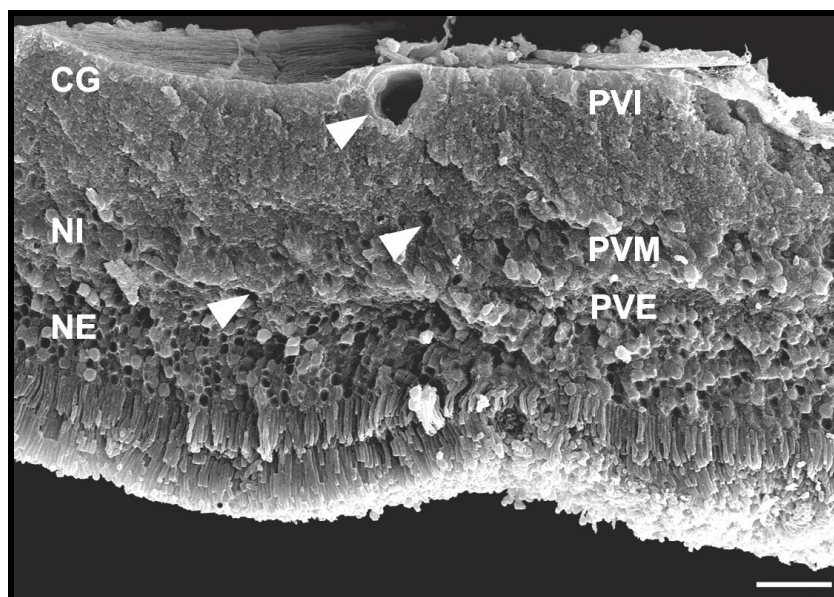
Cada arteríola de 2ª ordem divide-se, por meio da formação de colaterais, em arteríolas pré-capilares (Figuras 11 e 12). As *arteríolas pré-capilares* ramificam-se, por meio de divisões dicotómicas, nos capilares do plexo vascular interno, não participando na formação dos capilares dos plexos vasculares intermédio e externo.

Observa-se, igualmente, a ocorrência de divisões das arteríolas de 2ª ordem em ângulo recto. Estes ramos colaterais não se mantêm nesse plano mais interno; pelo contrário, afundam-se na espessura da retina para dar origem aos capilares retinianos dos plexos vasculares intermédio e externo (Figuras 12 e 13). Existem também capilares de direcção perpendicular, anastomoses em forma de ponte, com origem nos capilares mais superficiais, que se dirigem profundamente para se unir aos capilares dos plexos mais profundos (Figura 12).

As arteríolas de 2ª ordem terminam por meio de uma divisão dicotómica, originando duas arteríolas pré-capilares que, na periferia da retina, alimentam uma rede capilar de malhas largas. Estes vasos capilares podem terminar em vénulas pós-capilares ou então nas *arcadas venosas periféricas* (Figura 11).



**Figura 9.** Molde vascular da retina. A artéria central da retina divide-se em 6 arteríolas de 2ª ordem (A). Surge acompanhada pela veia central da retina que abandona a retina, contornando-a lateralmente, enquanto recebe as vénulas de 2ª ordem (B). As vénulas de 2ª ordem surgem intercaladas com as arteríolas de 2ª ordem, num plano segmentar mais externo. Ac, artéria central da retina; A, arteríolas de 2ª ordem; V, vénulas de 2ª ordem; Vc, veia central da retina. MEV. Barras: 80  $\mu$ m (A) e 45  $\mu$ m (B).



**Figura 10.** Disposição espacial dos vasos sanguíneos da retina. As cabeças de seta assinalam vasos localizados nos plexos vasculares interno (PVI), intermédio (PVM) e externo (PVE). CG, camada de células ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear externa. MEV sobre tecido intacto. Barra: 20  $\mu$ m.

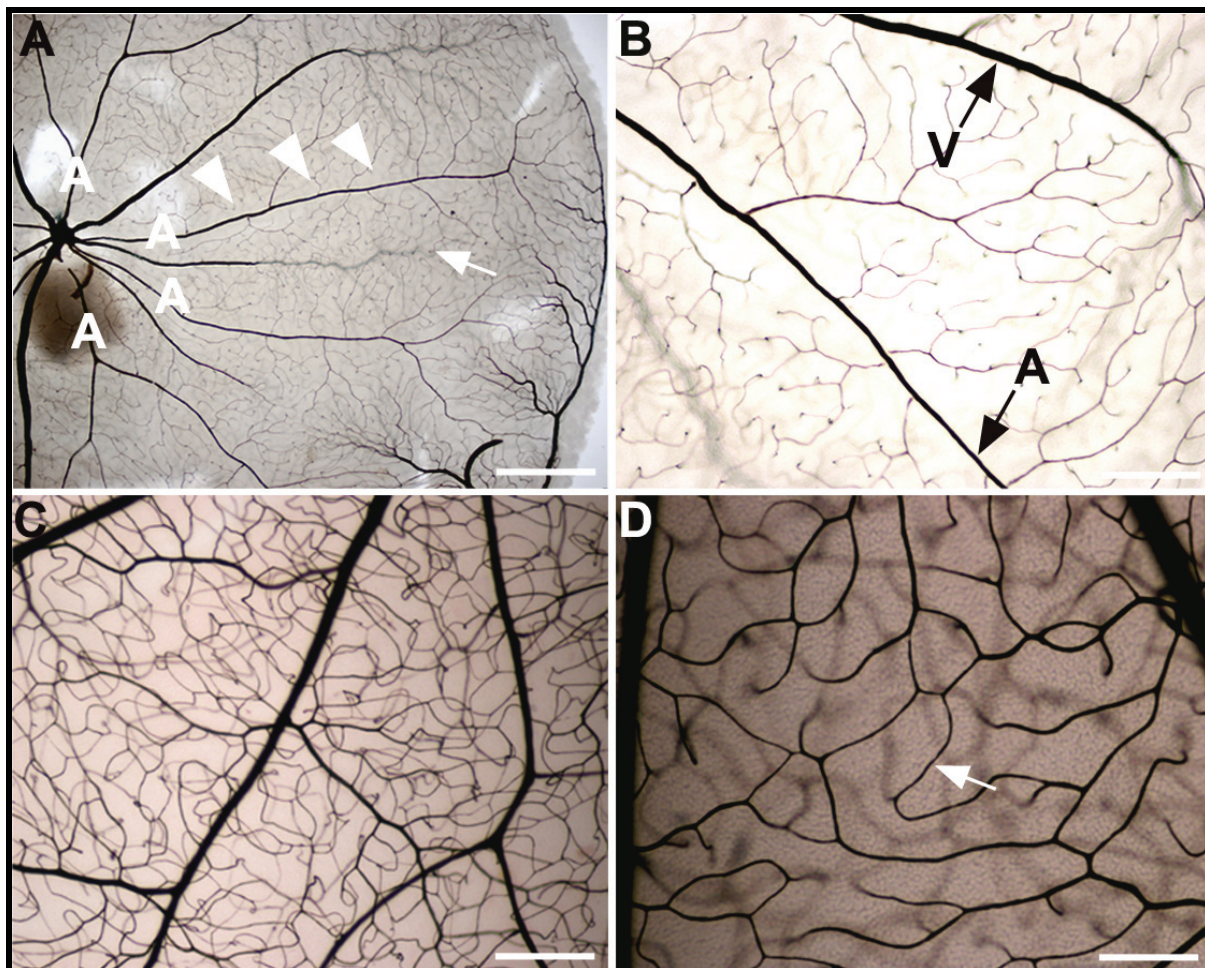
As arteríolas de 2ª ordem caracterizam-se, igualmente, por dar origem a *ductos preferenciais* que, destacando-se das arteríolas pré-capilares, drenam directamente para as vénulas pós-capilares mais superficiais. Os ductos preferenciais podem actuar como um *bypass* em relação à rede capilar. Esta disposição determina um fluxo de sangue preferencial nas camadas mais superficiais da retina (Figura 11 A e B).

Existe uma zona bem definida, peri-arteriolar, livre de capilares (Figura 11 A). Esta zona está descrita em algumas espécies e parece estar relacionada não só com o processo de remodelação vascular que ocorre durante o desenvolvimento dos vasos sanguíneos (Wise *et al.*, 1971), mas também, e segundo observações mais recentes, com os valores de pO<sub>2</sub> nas arteríolas. O compromisso entre a máxima visão/máxima oxigenação permite uma menor densidade vascular nesta zona (Funk, 1997).

Na periferia da retina, a nível da *ora serrata*, formam-se vénulas de 2ª ordem que recebem sangue directamente de canais preferenciais ou de largas arcadas capilares. Os capilares retinianos drenam para vénulas pós-capilares e estas para vénulas de 2ª ordem, vasos dispostos de forma intercalada com as estruturas vasculares arteriais. As vénulas de 2ª ordem unem-se, originando a veia central da retina (*V. centralis retinae*) que, por sua vez, conduz o sangue à veia oftálmica (Figuras 9 e 11).

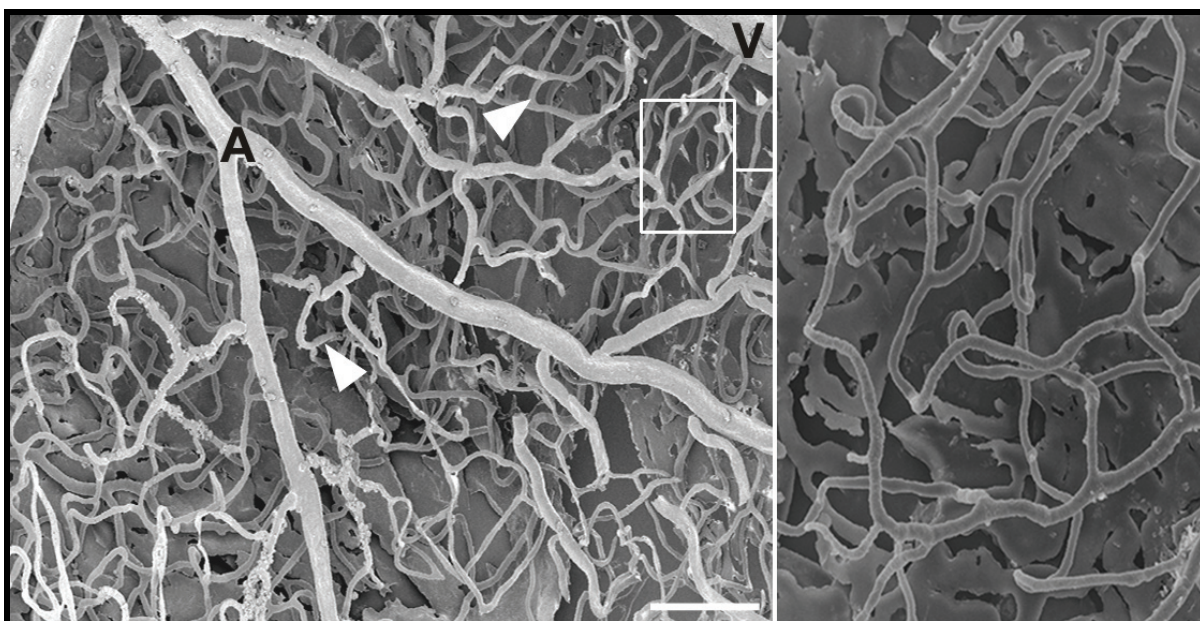
No homem, o padrão de distribuição da árvore vascular é ligeiramente diferente. Para além da existência de uma área completamente desprovida de vasos sanguíneos (fóvea central), a artéria central da retina origina apenas quatro arteríolas, as arteríolas nasais superior e inferior da retina (*Arteriola nasalis retinae superior/inferior*) e as arteríolas temporais superior e inferior da retina (*Arteriola temporalis retinae superior/inferior*) que se ramificam para dar origem aos capilares. Estes distribuem-se, de forma semelhante, ao longo de três plexos vasculares. O plexo vascular mais profundo, no entanto, não se adentra pela camada plexiforme externa, mantendo-se no limite entre esta e a camada nuclear interna (Erickson, Sundstrom & Antonetti, 2007).



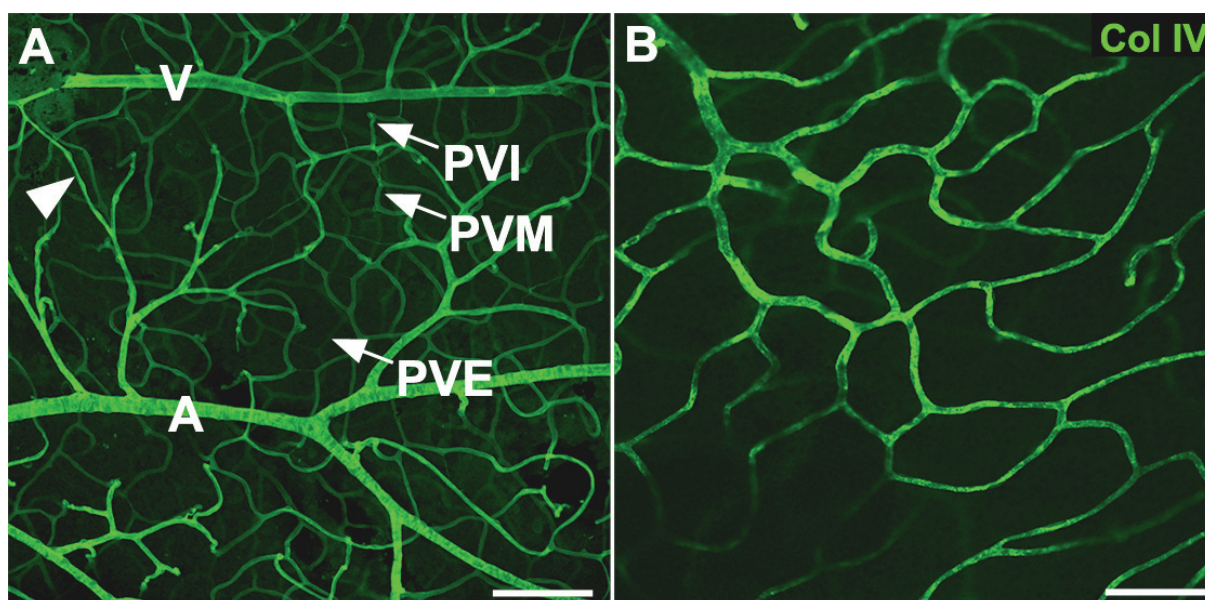


**Figura 11.** Padrão vascular da retina. Injeção de tinta da China. A: Observar a zona peri-arteriolar livre de capilares (cabeças de seta) e os ramos colaterais em ângulo recto. As vénulas surgem num plano segmentar mais profundo (seta). As arteríolas de 2ª ordem terminam na periferia da retina numa rede capilar de malhas largas que se abre nas arcadas venosas periféricas ou nas vénulas de 2ª ordem. B: As arteríolas de 2ª ordem dão origem aos vasos capilares do plexo superficial. As vénulas de 2ª ordem formam-se a partir de vénulas que drenam os capilares. C: Aspecto dos capilares de pequeno calibre e distribuídos em plexos vasculares de malhas largas, para uma menor interferência com a passagem da luz. D: Aspecto da rede capilar do plexo vascular intermédio (seta), de malhas mais largas do que as da rede capilar mais profunda, do plexo vascular externo. A, arteríola de 2ª ordem; V, vénula de 2ª ordem. Barras: 570  $\mu\text{m}$  (A), 225  $\mu\text{m}$  (B), 235  $\mu\text{m}$  (C) e 115  $\mu\text{m}$  (D).





**Figura 12.** Molde vascular da retina. As arteríolas pré-capilares dividem-se nos vasos capilares do plexo vascular interno; capilares de direcção perpendicular, anastomoses em forma de ponte (cabeças de seta), com origem nos capilares mais superficiais, dirigem-se profundamente, para se unir aos capilares dos plexos mais profundos. A, arteríola de 2ª ordem; V, vénula de 2ª ordem. MEV. Barra: 100 µm.



**Figura 13.** Padrão vascular da retina. A: Distribuição dos vasos sanguíneos ao longo dos três plexos vasculares interno (PVI), intermédio (PVM) e externo (PVE). As arteríolas pré-capilares dividem-se nos vasos capilares do plexo vascular interno, dando também origem a ductos preferenciais (cabeça de seta). B: Aspecto dos capilares do plexo vascular intermédio. Microscopia de varrimento laser confocal (MVL). A membrana basal foi marcada com o anticorpo anti-colagénio IV (Col IV). Barras: 120 µm (A) e 60 µm (B).

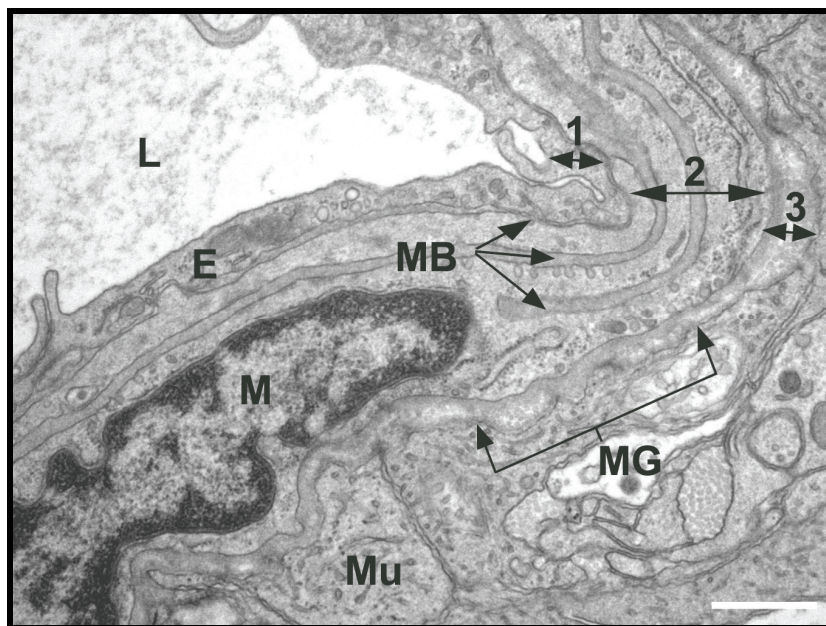


### 1.3.3. ESTRUTURA DOS VASOS SANGUÍNEOS DA RETINA

Os vasos sanguíneos da retina são estruturas adaptadas a responder às exigências de um metabolismo muito elevado, a efectuar a regulação do fluxo sanguíneo e a participar na barreira hemato-retiniana (BHR). A sua morfologia, ao longo da árvore vascular, apresenta particularidades únicas, atendendo às especificidades funcionais do tipo de vaso considerado.

A *artéria central da retina*, com uma estrutura em tudo semelhante a uma qualquer artéria de pequeno calibre, quando entra na retina, dividindo-se nos ramos intra-retinianos, perde o tecido elástico da sua parede e as arteríolas, em que se vai sucessivamente ramificando, vão tendo um menor diâmetro e uma menor espessura da parede.

As *arteríolas* retinianas, à semelhança dos vasos sanguíneos venosos de calibre correspondente, as *vénulas*, apresentam-se constituídas, de uma forma geral, por três túnicas concêntricas: túnica interna ou íntima, túnica média ou própria e túnica externa ou adventícia (Figura 14).



**Figura 14.** Constituição da parede vascular. Túnica íntima (1), túnica média (2) e túnica adventícia (3). L, lúmen; E, célula endotelial; M, célula muscular; Mu, célula de Müller; MB, membrana basal; MG, membrana glial. Microscopia electrónica de transmissão (MET). Barra: 640 nm.

*Túnica íntima:* é a túnica mais interna; é constituída por uma camada única de células endoteliais, dispostas paralelamente ao eixo do vaso, e por tecido conjuntivo subendotelial.

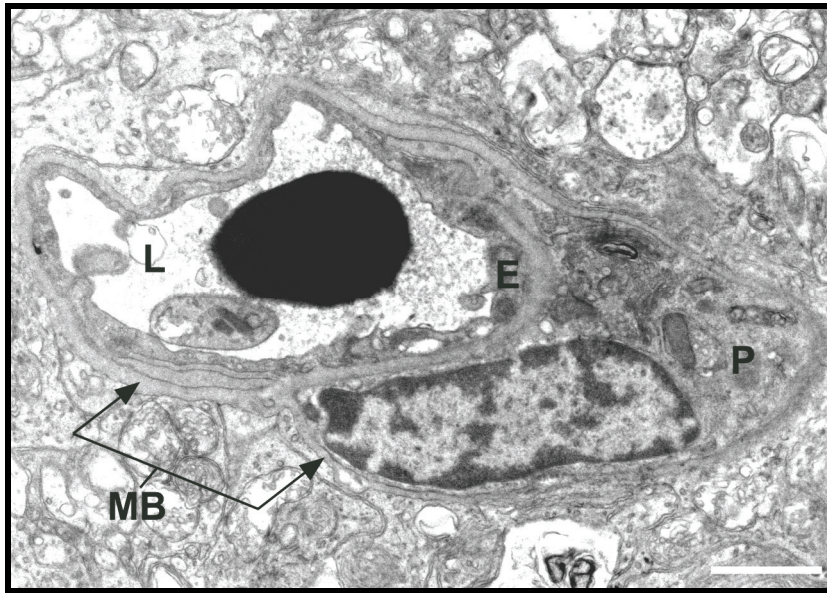
*Túnica média:* é composta por múltiplas camadas de células musculares lisas. Estas células musculares apresentam uma disposição circular e estão separadas entre si pela membrana basal. Nas arteríolas de maior diâmetro, observam-se cinco a sete camadas de células musculares. No entanto, este número vai decrescendo gradualmente, para uma ou duas camadas, à medida que o vaso se vai ramificando e se afasta do disco do nervo óptico. As arteríolas pré-capilares apenas possuem um revestimento descontínuo de músculo liso e nos vasos de menor calibre, capilares e vénulas pós-capilares, a túnica média é constituída apenas por uma camada de pericitos. Somente nas vénulas de maior diâmetro as células musculares lisas voltam a substituir os pericitos.

*Túnica adventícia:* é a mais externa; contém fibras de colagénio dispostas em diferentes direcções.

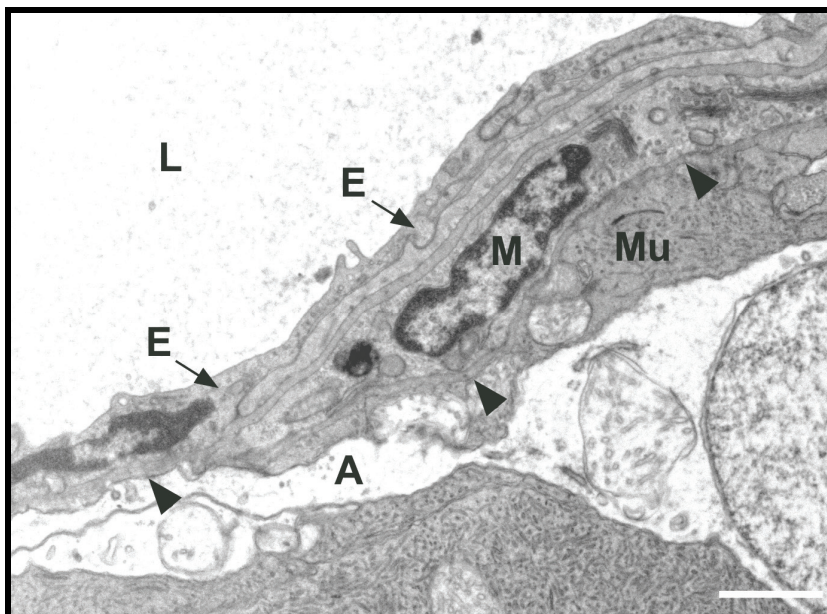
As *vénulas* retinianas, dispostas de forma intercalada com os correspondentes vasos arteriais, apresentam, para além das características gerais referidas, algumas particularidades:

O sistema venoso inicia-se junto à *ora serrata*, onde recebe sangue a partir da rede capilar. As veias vão aumentando de calibre e espessura ao receber os vasos afluentes e à medida que se aproximam do disco do nervo óptico. A veia central da retina, localizada lateralmente à artéria central da retina, tem um diâmetro superior a esta, embora apresente uma menor espessura da parede.

O lúmen vascular venoso está igualmente delimitado por *células endoteliais* e pela *membrana basal*, que contudo é mais delgada do que a das arteríolas correspondentes. Em vez de células musculares lisas, presentes apenas nas veias de maior calibre, a túnica média é constituída por uma camada descontínua de *pericitos*, completamente envolvidos pela membrana basal.



**Figura 15.** Estrutura dos vasos sanguíneos retinianos. Aspecto de um capilar. L, lúmen; E, célula endotelial; P, pericito; MB, membrana basal. MET. Barra: 1,2  $\mu$ m.



**Figura 16.** Estrutura dos vasos sanguíneos retinianos. A membrana glial (cabeças de seta), formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos, reveste a parede vascular. L, lúmen; E, célula endotelial; M, célula muscular; A, astrócito; Mu, célula de Müller. MET. Barra: 185 nm.

A rede de *capilares* da retina, interposta entre os sistemas arterial e venoso, apresenta também características únicas. Os delgados capilares retinianos surgem organizados numa rede de malhas largas ao longo dos três plexos vasculares. A sua parede é formada por *células endoteliais*, *pericitos* e *membrana basal* (Figura 15).

As *células endoteliais* dos vasos retinianos são células alongadas, com expansões citoplasmáticas, que delimitam completamente o lúmen vascular. Organizadas numa única camada, relacionam-se entre si por intermédio de zónulas de oclusão (*Zonulae occludens*) dispostas em bandas que rodeiam completamente células adjacentes (Azevedo, 2006). Com estas características, este endotélio, do tipo não fenestrado, constitui um dos componentes fundamentais da BHR (Figuras 15 e 16).

Os *pericitos* ou células de Rouget são células contrácteis, completamente rodeadas pela membrana basal. A eles se atribuem funções de regulação do fluxo sanguíneo, da permeabilidade capilar e controlo da proliferação capilar (Herman & D'Amore, 1985; Sims, 1986; Gardner *et al.*, 2002).

A *membrana basal* funciona como uma moldura de suporte para as células endoteliais e pericitos, fixando os vasos sanguíneos ao tecido circundante; constitui também um componente fundamental da BHR, actuando como uma barreira na difusão de partículas e elementos celulares a partir do sangue. É formada por três camadas: uma zona média densa, a lâmina densa (*lamina densa*), limitada por uma camada interna mais electrolucente, a lâmina lúcida (*lamina lucida* ou *lamina rara*), e por uma camada externa, a lâmina reticular (*pars fibroreticularis*). Produzida pelas células endoteliais, pericitos e células do tecido conjuntivo, a membrana basal é constituída por colagénio de tipo IV, glicoproteínas como laminina (laminina 8 e laminina 10), fibronectina, entactina e proteoglicanos (Junqueira & Carneiro, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Todos os vasos sanguíneos da retina estão separados do parênquima retiniano pela membrana glial (*Glia limitans*), formada pelos pés vasculares das células da nevrógia, células de Müller e astrócitos, que delimita o chamado *espaço perivascular* (Figura 16). A membrana glial, por conseguinte, para além de providenciar suporte estrutural aos elementos celulares retinianos, separa e isola o parênquima retiniano dos vasos sanguíneos.

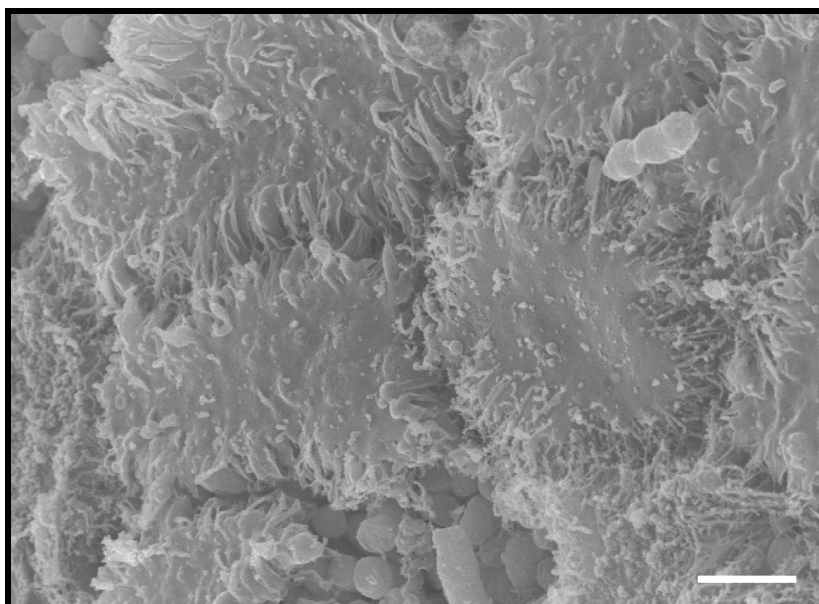


### 1.4. BARREIRA HEMATO-RETINIANA

Na retina existe um complexo sistema de restrição da permeabilidade entre o sangue e o parênquima retiniano, no sentido de isolar este último das constantes variações a que o sangue está sujeito, protegendo a retina da acção de estímulos lesivos.

Considerada como uma parte especial da barreira hemato-encefálica, a BHR é estabelecida a dois níveis distintos: a *barreira hemato-retiniana interna*, formada pelo endotélio dos vasos retinianos, e a *barreira hemato-retiniana externa*, constituída pelo epitélio pigmentar da retina, na interface coróideo-epitelial. Caracteriza-se pela existência de zónulas de oclusão entre as células constituintes da barreira e pela relativa escassez de vesículas endocíticas, propriedades que limitam a difusão de solutos através desta barreira (Cunha-Vaz, 1976, 2004; Laties, Rapoport & McGlenn, 1979; Gardner *et al.*, 2002).

As células do epitélio pigmentar, BHR externa, isolam os fotorreceptores dos vasos sanguíneos fenestrados da coróideia (Figura 17). As células do endotélio vascular retiniano, sem fenestras, BHR interna, separam o parênquima retiniano do sangue.



**Figura 17.** BHR externa: aspecto das células constituintes do epitélio pigmentar da retina. A superfície lateral das membranas celulares de células vizinhas apresenta as interdigitações características. MEV sobre tecido intacto. Barra: 3,5  $\mu$ m.

As *zónulas de oclusão* são regiões onde as membranas citoplasmáticas de células adjacentes parecem fundir-se, obliterando o espaço intercelular (Figura 18). Nessas áreas, complexos constituídos por proteínas transmembranárias formam conjuntos de fibras que se anastomosam com as fibras correspondentes de células adjacentes. Duas destas proteínas, ocludina e claudina, cruzam toda a membrana citoplasmática, restringindo a passagem de fluidos entre células adjacentes. As restantes proteínas localizam-se no citoplasma periférico e têm como função manter a organização estrutural das *zónulas de oclusão*. O número e a complexidade destas junções intercelulares estão em correlação com a maior ou menor hermeticidade da barreira (Gardner *et al.*, 2002).

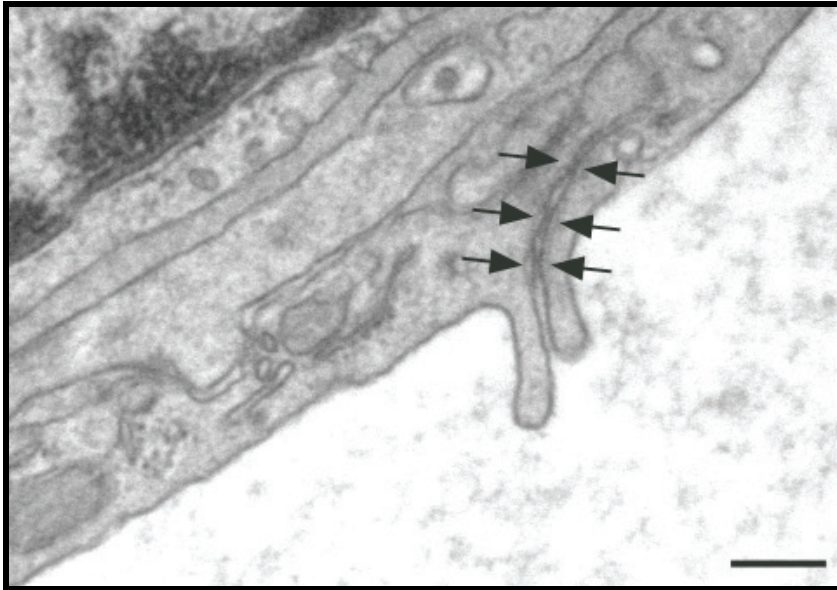
Para além do endotélio vascular, fazem parte integrante da BHR interna outros elementos estruturais adicionais: *pericitos*, *membrana basal* e *membrana glial*.

Os *pericitos*, devido à sua estreita interacção com as células endoteliais, estão associados à manutenção da integridade estrutural da BHR e da permeabilidade vascular (Herman & D'Amore, 1985; Sims, 1986; Gardner *et al.*, 2002).

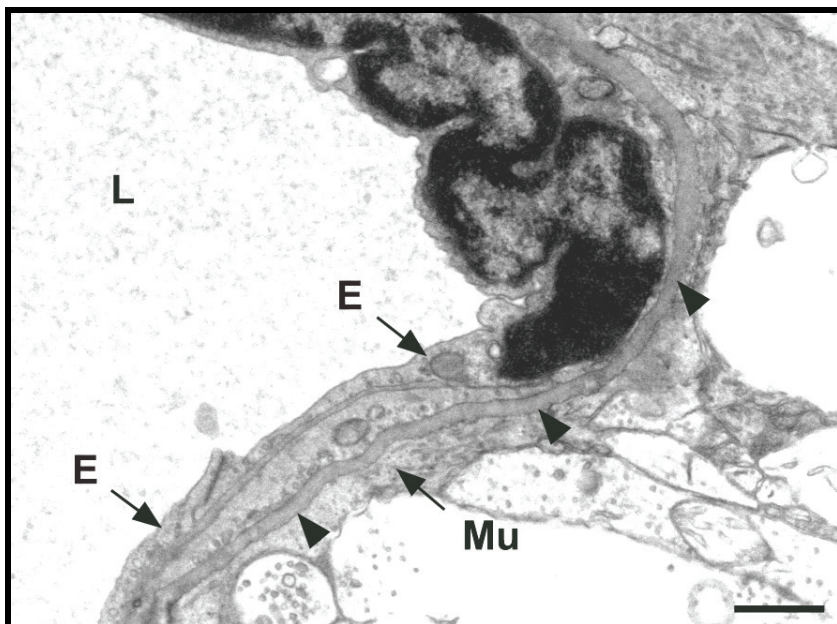
A *membrana basal* constitui um componente fundamental da BHR interna, providenciando suporte estrutural e funcionando como uma segunda barreira na difusão de partículas e elementos celulares a partir do sangue (Wang *et al.*, 2006).

As *células da nevrógliã*, envolvendo os vasos sanguíneos com os seus pés vasculares, reforçam o isolamento do parênquima retiniano, estando igualmente envolvidas nos processos de indução, manutenção e modulação da BHR (Gardner *et al.*, 2002).

A BHR é, portanto, uma barreira de difusão selectiva que exclui determinados elementos celulares e moleculares do parênquima retiniano, garantindo um controlo estrito do meio extra-celular. Isola a retina, mantendo um meio apropriado para o bom funcionamento neuronal e prevenindo possíveis estímulos lesivos (Vinores, 1995; Abbott, 2002). A alteração da BHR é frequentemente observada na patologia retiniana; ocorre em fases iniciais destes processos e é responsável, em muitas circunstâncias, pelo desencadear das lesões, uma vez que determina alterações do meio extra-celular com repercussões importantes na função visual (Cunha-Vaz, 1976). A rotura da BHR está largamente confinada às vénulas (Xu, Forrester, Liversidge & Crane, 2003; Xu, Dawson, Crane & Liversidge, 2005). Constitui uma característica da retinopatia diabética e é uma das principais causas responsáveis pela perda de visão (Xu, Qaum & Adamis, 2001).



**Figura 18.** BHR interna: aspecto de uma zónula de oclusão entre duas células endoteliais adjacentes. MET. Barra: 215 nm.



**Figura 19.** BHR interna. Para além das células endoteliais, esta barreira é constituída por pericitos, pela membrana basal (cabeças de seta) e pela membrana glial. L, lúmen; E, célula endotelial; Mu, célula de Müller. MET. Barra: 450 nm.

## 2. MACRÓFAGOS

### 2.1. ASPECTOS GERAIS

As células mãe indiferenciadas da linha mielóide, presentes na medula óssea do adulto e no saco vitelino, fígado e baço, durante o desenvolvimento pré-natal, originam as células precursoras dos monócitos, os promonócitos, que, posteriormente, se diferenciam em monócitos. Os monócitos em circulação na corrente sanguínea atravessam a parede vascular e, a nível dos diferentes tecidos, diferenciam-se em macrófagos.

Os macrófagos tecidulares residentes exibem características morfológicas e funcionais específicas, consoante o órgão em que se encontram, como ocorre, por exemplo, com as células de Kupffer, no fígado, ou com as células da micróglia, no cérebro e na retina. No entanto, podemos considerar que estas células do sistema mononuclear fagocítico, largamente distribuídas pelo organismo, apresentam duas funções principais:

- *Fagocitose* de agentes patogénicos, detritos celulares e outros antígenos;
- *Apresentação antigénica* a linfócitos T.

Os macrófagos são, portanto, intervenientes da resposta imunitária, agindo como uma primeira linha de defesa contra a infecção (Roitt *et al.*, 2001).

Uma função dos macrófagos é contribuir para a eliminação de agentes infecciosos ou outras substâncias estranhas e minimizar os danos por eles causados. Os macrófagos fagocitam activamente microrganismos e detritos celulares, captando-os, processando-os e eventualmente eliminando-os. A presença de receptores específicos de membrana, como os receptores *scavenger*, aos quais se ligam moléculas da superfície microbiana e outras moléculas de natureza diversa, constituem um factor fundamental para esta função. Os anticorpos, por meio da activação do complemento, ou actuando como opsoninas, concorrem igualmente para facilitar a fagocitose, através da ligação dos receptores dos macrófagos com o componente 3b do complemento (C3b) ou com a porção Fc das moléculas de imunoglobulinas.



A apresentação antigénica é outra das funções dos macrófagos, considerada como a interface entre a resposta imunitária inata e adaptativa (Roitt *et al.*, 2001). Os macrófagos expressam o complexo de histocompatibilidade maior da classe II (MHC-II). Têm, portanto, a capacidade de processar e apresentar determinados peptídeos antigénicos a linfócitos T. Estes linfócitos T activados vão libertar mediadores responsáveis pela activação de linfócitos B e/ou T citotóxicos, desempenhando um papel fundamental no desencadeamento e na manutenção da resposta imunitária face a determinado antigénio.

### 2.2. MACRÓFAGOS DA RETINA

A retina contém diferentes populações de células da linhagem mielóide, onde se incluem as células da micróglia e as células perivasculares (Dick, Ford, Forrester & Sedgwick, 1995; Provis, Penfold, Edwards & van Driel, 1995; Zhang, Lam & Tso, 2005a) e que se distinguem entre si pelas respectivas características morfológicas, topográficas e de expressão antigénica.

As *células da micróglia* são consideradas um tipo especial de *macrófagos residentes* da retina. De aspecto ramificado, localizam-se nas camadas mais superficiais desta estrutura. Normalmente, não se encontram activadas, sendo-o apenas na sequência do efeito de determinados estímulos, tal como ocorre em situações de degenerescência das células nervosas ou em processos inflamatórios (Chen *et al.*, 2002).

Esta população celular divide-se em três grupos principais, de acordo com a respectiva localização e fenótipo: *micróglia perivascular*, localizada no espaço perivascular; *micróglia paravascular*, cujos núcleos se localizam no parênquima retiniano, fora do espaço perivascular, mas cujos prolongamentos contactam com os vasos sanguíneos, e *micróglia parenquimatosa*, localizada no parênquima retiniano (Provis *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002).

A designação de *células perivasculares* diz respeito, de uma forma genérica, a uma população heterogénea de células, localizada no espaço perivascular. Engloba diferentes tipos celulares, incluindo células da micróglia ramificadas, células dendríticas (Xu, Dawson, Forrester & Liversidge, 2007b) e outros macrófagos perivasculares (Provis *et al.*, 1995).

Existe alguma controvérsia relativamente à origem das células da micróglia. Embora alguns autores sugiram uma origem neuroepitelial (Hutchins, Dickson, Rashbaum & Lyman, 1990; Hao, Richardson & Fedorff, 1991), estudos mais recentes apontam para uma origem hematopoiética (De Groot, Huppes, Sminia, Kraal & Dijkstra, 1992; Eglitis & Mezey, 1997).

No decurso da embriogénese, as células precursoras dos microgliócitos chegam à retina a partir do disco do nervo óptico, da periferia da retina e dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento e distribuição das células da micróglia ocorre, contudo, por dois processos diferentes. Numa primeira fase, as células precursoras migram para a retina, previamente ao desenvolvimento dos vasos sanguíneos, e diferenciam-se nas células ramificadas da *micróglia parenquimatosa*. Estas células são CD45 e MHC-I/II-positivas, sem que, no entanto, expressem outros epitopos específicos dos macrófagos. Numa fase posterior, um segundo tipo de precursores, que expressam marcadores específicos dos macrófagos, invadem a retina, acompanhando as células precursoras dos vasos sanguíneos, e originam um outro tipo de células, as células da *micróglia peri e paravascular* (Chen *et al.*, 2002).

Em condições fisiológicas, assiste-se a uma lenta renovação desta população de células da micróglia que ocorre também por meio de dois processos distintos: proliferação de células da micróglia parenquimatosa e recrutamento de células monocíticas em circulação que, migrando através da BHR, se vão posteriormente diferenciar em microgliócitos (Lawson, Perry & Gordon, 1992).

A micróglia constitui um tipo celular retiniano imunocompetente. Quando activadas, as células da micróglia desempenham um importante papel na manutenção da homeostasia, na resposta inflamatória e em processos degenerativos ou outro tipo de lesões tecidulares (Xu *et al.*, 2007a). Participam na resposta imunitária e no processo de regeneração dos tecidos, fagocitando microrganismos invasores e detritos celulares (Chen *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002; Chan, Magnus & Gold, 2001). Estão envolvidas no desencadear dos processos inflamatórios retinianos e, quando activadas, actuam também como células apresentadoras de antigénio (Chew, Takanohashi & Bell, 2006).

Em resposta a uma lesão tecidular, os monócitos circulantes são rapidamente recrutados para o local, diferenciando-se então em células macrofágicas, chamadas a participar na resposta inflamatória (Xu, Chen, Mayer, Forrester & Dick, 2007a).

Na retinopatia com degenerescência dos fotorreceptores, as células da micróglia activadas migram e acumulam-se nos locais das lesões (Ng & Streilein, 2001; Zhang *et al.*, 2005b). Todavia, não há um entendimento claro relativamente ao mecanismo de migração destas células, podendo este constituir apenas uma consequência ou, pelo contrário, ser precisamente a causa determinante da morte dos fotorreceptores.

A migração de células da micróglia para o espaço sub-retiniano foi igualmente observada em animais velhos, ocorrendo, provavelmente, para coadjuvar as células do epitélio pigmentar na remoção de detritos celulares, resultantes da reciclagem contínua dos segmentos externos dos fotorreceptores, que se tornam menos eficientes com o envelhecimento (Xu, Chen, Manivannan, Lois & Forrester, 2008).

As células da micróglia têm, para além disso, a capacidade de produzir moléculas neurotróficas e/ou neuroprotectoras implicadas na sobrevivência neuronal (Nakajima & Kohsaka, 2004) e na regeneração vascular (Ritter *et al.*, 2006).

### 2.3. CÉLULAS MATO

Em 1981, Mato e Ookawara descreveram, pela primeira vez, em cérebro de rato, um tipo celular perivascular autofluorescente a que chamaram “*fluorescent granular perithelial cells*” e que, posteriormente, viriam a ser conhecidas por células Mato (Mato, Ookawara & Saito-Taki, 1986b).

As células Mato localizam-se no espaço perivascular (Virchow-Robin) da microvasculatura cerebral dos mamíferos, compreendido entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, formada pelos pés vasculares dos astrócitos, interpondo-se, desta forma, entre os vasos sanguíneos e o parênquima cerebral (Mato & Ookawara, 1981).

São células que se caracterizam pela presença de numerosos corpos de inclusão autofluorescentes no seu citoplasma. Os corpos de inclusão são lisossomas secundários, ricos em enzimas hidrolíticas, capazes de hidrolisar e armazenar substâncias proteicas e lipídicas (Mato, Ookawara, Mato & Namiki, 1985; Mato, Sakamoto, Ookawara, Mato & Suzuki, 1998). Os lípidos oxidados são conhecidos por emitir fluorescência e a autofluorescência das células Mato está relacionada com a presença de lípidos oxidados,

constituintes de lipoproteínas, contidos nos corpos de inclusão (Mato, Ookawara, Aikawa & Kawasaki, 1981; Mato *et al.*, 1996).

As células Mato, de forma alongada e com prolongamentos citoplasmáticos que envolvem o vaso ao qual estão apostas, são observadas, preferencialmente, nos locais de ramificação dos vasos sanguíneos (Mato *et al.*, 1981; Mato & Mato, 1983).

São células da linha mononuclear fagocítica, continuamente renovada a partir de monócitos circulantes. Nos roedores, surgem numa fase precoce do período pós natal; na segunda semana após o nascimento, estas células começam a diferenciar-se, atingindo o pico da sua actividade fagocítica aos três meses (Mato *et al.*, 1985). Constituem uma pequena população celular que se distingue das restantes células perivasculares, pericitos e micróglia, pela sua localização, morfologia, imunofenótipo e funções (Mato *et al.*, 1985; Mato, Aikawa, Mato & Kurihara, 1986a).

São células macrofágicas residentes que expressam epitopos e receptores de membrana, tais como, MHC-II e Fc, respectivamente, para além de apresentarem outros marcadores comuns aos macrófagos: F4/80, clone Cl:A3-I, CD11b e F4/80, clone BM8 (Mato *et al.*, 1996).

As células Mato expressam constitutivamente receptores *scavenger* da classe A, desempenhando um papel fundamental na captação de lipoproteínas de baixa densidade modificadas (Mato *et al.*, 1996; Mato, Ookawara & Sakamoto, 1997a). Em condições fisiológicas, captam e acumulam, nos seus corpos de inclusão, macromoléculas, lípidos e proteínas exógenas, administradas por via endovenosa e intraventricular, e detritos celulares, sendo por isso designadas como as células *scavenger* do cérebro (Mato, Ookawara, Sano & Kurihara, 1982), contrariamente ao que ocorre com as células da micróglia que, em condições fisiológicas, por se não encontrarem activadas, não exibem capacidade fagocítica. As células da micróglia apenas manifestam capacidade fagocítica quando são activadas na sequência de uma determinada lesão (Mato *et al.*, 1985).

Estas características associadas à sua topografia, constituindo uma rede de células com função *scavenger* que envolve a microvasculatura cerebral, estiveram na base da sua classificação como elemento constituinte da barreira hemato-encefálica, reforçando a capacidade desta barreira na exclusão de determinadas substâncias do parênquima

cerebral (Mato *et al.*, 1996 e 1997a; Mato *et al.*, 1998; Mato, Takeuchi, Ookawara, Yamanaka, Mashiko & Ogura, 2001).

As células Mato participam no metabolismo lipídico e acumulam lípidos em condições fisiológicas (Mato *et al.*, 1985 e 1999). Em situação de lesão tecidual, hipercolesterolemia ou hipertensão, as células Mato podem apresentar alterações degenerativas, determinando, conseqüentemente, alterações vasculares (Mato, Sakamoto & Ookawara, 1997b).

As células Mato expressam MHC-II, desempenhando um papel chave no desencadeamento e manutenção da resposta imunitária. Através da produção e libertação de citocinas, estão envolvidas nos processos de activação e migração das células da micróglia para os locais da lesão tecidual (Mato *et al.*, 1998).

Embora constituindo uma pequena população a nível do sistema nervoso central, são células imuno-reguladoras fundamentais. São potenciais sensores de alterações do sistema nervoso central e foram, mais recentemente, identificadas como alvo preferencial do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Williams, Alvarez & Lackner, 2001).

### 3. RETINOPATIAS

De uma forma geral, podem considerar-se como as retinopatias de maior impacto clínico, por constituírem as principais causas de perda de visão no homem, a retinopatia diabética, a degenerescência macular relacionada com a idade, a retinopatia por oclusão venosa, a retinopatia de prematuridade e a retinite pigmentosa.

O enorme impacto da perda de visão, a variadíssimos níveis da vida dos indivíduos afectados, torna premente a necessidade de um conhecimento mais aprofundado relativamente à etiopatogenia destas afecções, circunstância que tem despertado o maior interesse dos investigadores, principalmente, no sentido de encontrar soluções terapêuticas mais eficazes que possam ser instituídas desde as fases mais precoces do desenvolvimento das lesões.

#### **Retinopatia diabética**

A retinopatia diabética surge como uma complicação da diabetes *mellitus* de tipo 1 e de tipo 2, a nível ocular. Constitui a patologia mais comum do “olho diabético” e é a principal causa da perda de visão na população adulta, nos países desenvolvidos (Barber, 2003). Todas as formas de diabetes se caracterizam pela presença de hiperglicémia crónica, responsável pelas lesões que se desenvolvem a nível da retina ou de outros tecidos, como por exemplo, a nível do rim e dos nervos periféricos (Brownlee, 2004).

A hiperglicémia prolongada determina alterações metabólicas significativas que estão na base das lesões celulares. A redução da glicose, transformando-se em sorbitol, a produção de diacilglicerol e a formação de produtos avançados de glicação (AGEs, *advanced glycation endproducts*) são alguns dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento das lesões (Brownlee, 2004).

Distinguem-se duas fases na evolução da doença: a fase não proliferativa e a fase proliferativa.

Na fase não proliferativa ocorre um aumento da permeabilidade vascular, o espessamento da membrana basal e a redução do número de pericitos (Ruberte *et al.*, 2004).

O aumento da permeabilidade vascular deve-se principalmente à rotura da BHR, em grande parte devido à acção do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) sobre as proteínas constituintes das zónulas de oclusão das células endoteliais (Gardner *et al.*, 2002). As alterações precoces a nível da BHR poderão ser consideradas como a causa determinante para o início da doença, uma vez que conduzem ao aparecimento de edema, de pequenas hemorragias (Cunha-Vaz, Faria de Abreu & Campos, 1975) e à morte celular, por deficiente capacidade de manutenção da composição do meio extracelular (Barber, 2003). Com o decorrer da doença, desenvolvem-se outras lesões, tais como micro-aneurismas, edema macular, rotura de capilares, diminuição do fluxo sanguíneo, oclusão capilar e o conseqüente aparecimento de zonas de isquémia (Aiello *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 2002).

Provavelmente, a hipóxia e a hiperglicémia determinam o início da segunda fase da doença, a fase proliferativa. Esta caracteriza-se pelo aparecimento de novos vasos sanguíneos, por meio de um processo de angiogénese. A neovascularização constitui o evento mais significativo da retinopatia diabética por ser a principal causa da perda de visão (Knott & Forrester, 2003).

Ocorrem, contudo, alterações em outras células da retina, para além das alterações vasculares referidas. O aumento da apoptose (Barber, 2003), a resposta reactiva das células da nevrógia (Rungger-Brandle, Dosso & Leuenberger, 2000; Mizutani, Gerhardinger & Lorenzi, 1998), a activação das células da micróglia (Zeng, Ng & Ling, 2000) e a alteração do metabolismo do glutamato (Gardner *et al.*, 2002) podem ser considerados factores neurodegenerativos que justificariam algumas deficiências da função visual no início da diabetes, numa fase em que ainda se não observam alterações vasculares (Barber, 2003).

A activação das células da micróglia, em consequência das lesões neuronais, conduz à libertação de citocinas, numa tentativa de, por meio da resposta inflamatória, se poder preservar a função neuronal. Contudo, o ciclo que se inicia perpetua as alterações que se estabelecem, a nível dos diferentes células retinianas, células neuronais, células da nevrógia e células vasculares (Antonetti *et al.*, 2006), ocasionando alterações da visão. As alterações da função visual podem, portanto, ser consideradas como um efeito directo da

diabetes e não apenas como alterações secundárias à rotura da BHR (Lieth, Gardner, Barber & Antonetti, 2000). Segundo alguns autores, parece mais provável que sejam estas alterações celulares as responsáveis pelas alterações da auto-regulação do fluxo sanguíneo retiniano, que o mecanismo inverso (Gardner *et al.*, 2002).

Apesar da controvérsia relativamente ao tipo celular retiniano preferencialmente vulnerável à hiperglicémia, parece, contudo, ser possível que uma lesão inicial nas células endoteliais, com rotura da BHR, possa determinar o aparecimento de alterações a nível das células neuronais, das células da nevrógia, com activação das células microgliais, bem como afectar as suas inter-relações, ou que, pelo contrário, uma alteração metabólica nestas últimas células possa ser a responsável pelas alterações a nível da BHR. Seja qual for o caso, uma alteração prolongada nas inter-relações neuro-vasculares está, certamente, na base do estabelecimento da retinopatia diabética (Gardner *et al.*, 2002).

### **Degenerescência macular relacionada com a idade**

Actualmente, a esperança média de vida, nos países desenvolvidos, é superior a 80 anos. No entanto, a qualidade de vida, nestes anos adicionais, pode estar significativamente comprometida, devido aos efeitos de determinadas doenças degenerativas, entre as quais se inclui a degenerescência macular relacionada com a idade. Existem cerca de 30-50 milhões de pessoas afectadas por este tipo de degenerescência das células neuronais da mácula lútea que constitui a principal causa de perda de visão irreversível em indivíduos com mais de 60 anos (Gehrs, Anderson, Johnson & Hageman, 2006).

A degenerescência macular relacionada com a idade caracteriza-se pela progressiva perda de visão central devido a alterações degenerativas e de neovascularização da mácula lútea, a área de maior acuidade visual da retina. É uma afecção ocular bilateral que apresenta duas fases principais de evolução: a fase seca ou atrófica e a fase húmida.

Considerada uma doença de etiopatogenia complexa, ocorre associada a quatro factores de risco principais: envelhecimento, tabagismo, aumento do índice da massa corporal e hereditariedade (Clemons, Milton, Klein, Seddon & Ferris, 2005).



A contínua reciclagem de segmentos externos dos cones e bastonetes é fundamental no processo de regeneração dos fotorreceptores. As células do epitélio pigmentar da retina são as responsáveis pela remoção diária dos segmentos externos destas células (Ryeom *et al.*, 1996) e, por conseguinte, a existência de células do epitélio pigmentar da retina viáveis constitui uma condição essencial para o normal metabolismo e funcionamento dos fotorreceptores.

Durante a degenerescência macular relacionada com a idade, as células do epitélio pigmentar sofrem alterações degenerativas e não funcionam de forma adequada, ocorrendo a concomitante degenerescência e morte dos fotorreceptores (Gehrs *et al.*, 2006).

A *fase seca* da doença caracteriza-se pela degenerescência dos fotorreceptores e pela acumulação de grande quantidade de material proteico e lipídico, rico em colesterol, e ferro no espaço compreendido entre o epitélio pigmentar da retina e a membrana vítrea (Bruch). Estes depósitos são conhecidos por *drusas* (designação derivada do termo alemão *drusen*) devido ao seu aspecto de esferas brilhantes rodeadas por um anel de hiperpigmentação (Crabb *et al.*, 2002; Hahn, Milam & Dunaief, 2003; Gehrs *et al.*, 2006) e considerados um sinal patognomónico da degenerescência macular relacionada com a idade (Anderson, Mullins, Hageman & Johnson, 2002)

Os detritos celulares, resultantes da morte das células do epitélio pigmentar da retina e dos fotorreceptores, constituem um estímulo inflamatório crónico e um potencial núcleo de formação de drusas, num processo semelhante ao observado noutras doenças degenerativas, como é o caso da doença de Alzheimer e da aterosclerose, onde a acumulação extracelular de placas e depósitos determina uma resposta inflamatória local (Anderson *et al.*, 2002). O processo inflamatório que se estabelece e a participação dos macrófagos nesta fase são considerados factores fundamentais na patogenia da degenerescência macular relacionada com a idade (Killingsworth, Sarks & Sarks, 1990; Anderson *et al.*, 2002; Ambati *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2004b).

De uma forma geral, a doença evolui para a *fase húmida* (Gehrs *et al.*, 2006). Esta caracteriza-se pela presença de exsudados e/ou sangue no espaço sub-retiniano, entre a neuro-retina e o epitélio pigmentar da retina, e/ou no espaço entre o epitélio pigmentar da retina e a membrana vítrea (Bruch). Durante esta fase, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, a partir dos vasos capilares da coroideia, que penetram através da membrana vítrea (Bruch) e do epitélio pigmentar da retina e se dirigem para o espaço sub-retiniano

e/ou para o espaço entre o epitélio pigmentar da retina e a membrana vítrea (Bruch). As hemorragias a esse nível produzem o descolamento da retina e a degenerescência dos fotorreceptores e, em consequência, a perda de visão permanente (Sarks, Sarks & Killingsworth, 1997; Gehrs *et al.*, 2006).

A fase húmida da doença afecta apenas 10% dos doentes, contudo é mais grave do que a fase seca. A neovascularização a partir dos vasos da coroideia é responsável por aproximadamente 80% dos casos de cegueira que ocorrem na degenerescência macular relacionada com a idade (Gehrs *et al.*, 2006).

### **Retinopatia por oclusão venosa**

Os diferentes tipos celulares retinianos, células vasculares, células neuronais e nevróglia interagem no sentido de assegurar a manutenção da integridade estrutural e das funções da retina. As alterações vasculares necessariamente terão repercussão sobre os restantes tipos celulares retinianos, interferindo com o seu normal funcionamento (Zheng, Gong, Hatala & Kern, 2007).

A oclusão venosa da retina é uma afecção comum, observada sobretudo em indivíduos adultos. Constitui a segunda patologia vascular de maior frequência, depois da retinopatia diabética, e é uma causa importante de perda de visão (Rehak, 2008). A oclusão da veia central da retina ou a oclusão de ramos venosos retinianos, caracterizadas, ao exame oftalmoscópico, pela dilatação e tortuosidade vascular típica, são acompanhadas de edema, hemorragia, isquémia e exsudados, podendo ocorrer edema macular, neovascularização, hemorragias intravítreas e descolamentos de retina (Margolis, Singh & Kaiser, 2006). As lesões retinianas e o grau de perda de função visual estão directamente relacionados com a extensão da zona de isquémia que a oclusão vascular determina (Robinson & Halpern, 1992).

A etiopatogenia desta afecção não é completamente conhecida, mas parece ocorrer mais frequentemente em idades superiores aos 65 anos, associada a hipertensão sistémica, diabetes *mellitus*, aterosclerose, hiperlipidémia, tabagismo e a hipertensão ocular (O'Mahoney, Wong & Ray, 2008). Enquanto a oclusão da veia central da retina é

multifactorial, a oclusão de ramos venosos retinianos pode ocorrer na sequência da combinação de três mecanismos primários: compressão das veias nos locais de sobreposição artério-venosas, com conseqüente turbulência do fluxo sanguíneo, alterações degenerativas da parede vascular e factores hematológicos alterados, como por exemplo, valores de hematócrito e fibrinogénio plasmático elevados (Cheung *et al.*, 2008; Rehak, 2008).

A evolução da doença depende do grau de oclusão, da integridade da perfusão arterial e da eficiência no estabelecimento de uma circulação colateral. A presença de edema macular, a neovascularização e as hemorragias intravítreas contribuem para uma evolução menos favorável e eventual perda de visão (Rehak, 2008).

### **Retinopatia de prematuridade**

O aumento da sobrevivência de bebés prematuros, devido aos avanços nos cuidados pré e neo-natais, teve como conseqüência o aparecimento de uma população de crianças de alto risco de desenvolvimento de retinopatia de prematuridade (Karna, Muttineni, Angel & Karmaus, 2005)

A retinopatia de prematuridade é uma doença vascular retiniana caracterizada por uma neovascularização extensa que pode conduzir ao aparecimento de descolamentos de retina e cegueira (Bányász *et al.*, 2006). É a principal causa de perda de visão em crianças, nos países desenvolvidos: 50% dos bebés prematuros, de baixo peso (com menos de 1250 g de peso à nascença), apresentam lesões características desta doença (Csak, Szabo, Szabo & Vannay, 2006).

A retinopatia de prematuridade apresenta duas fases:

- *Fase 1*: ocorre imediatamente após o parto. A administração de oxigénio determina o aparecimento de hiperóxia e a diminuição de VEGF, com a conseqüente interferência na vascularização retiniana. Observa-se um menor desenvolvimento da árvore vascular e o aparecimento de zonas de isquémia, com a conseqüente interferência no normal funcionamento das células neuronais.

Para além da componente genética (Dunai *et al.*, 2008), o aparecimento de zonas de isquémia na retina pode ser determinado pelo facto dos bebés serem prematuros e, portanto, por ainda se não ter dado o completo desenvolvimento das estruturas vasculares (Cooke, Drury, Mountford & Clark, 2004). A administração de oxigénio aos bebés prematuros, no entanto, é responsável pelo aparecimento de zonas de isquémia, uma vez que a hiperóxia induz a produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio, responsáveis pelo aparecimento de vasoconstrição, morte das células endoteliais e obliteração dos vasos sanguíneos (Karna *et al.*, 2005).

- *Fase 2*: a hipóxia induz um aumento da expressão de factores angiogénicos, VEGF e de angiopoietina 2, com a consequente formação de novos vasos sanguíneos retinianos (Cooke *et al.*, 2004). O processo de neovascularização pode progredir e causar descolamentos de retina, hemorragias e a consequente perda de visão.

### **Retinite pigmentosa**

A retinite pigmentosa engloba um conjunto de doenças retinianas degenerativas, incluídas no vasto grupo das retinopatias hereditárias, que conduz à perda de visão. As mutações a nível de mais de 40 genes, responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas no metabolismo dos fotorreceptores e na cascata de fototransdução, constituem o principal factor etiológico (Neidhardt *et al.*, 2008).

Este tipo de retinopatia representa uma das principais causas de perda de visão, nos adultos, com uma incidência aproximada de 1:4000, a nível mundial (Sen *et al.*, 2008).

Do ponto de vista estrutural, a retinite pigmentosa caracteriza-se por uma diminuição progressiva do número de fotorreceptores, com a concomitante diminuição do campo de visão, podendo terminar por produzir cegueira. Na maioria dos casos, ocorre a degenerescência dos bastonetes, causando diminuição da visão periférica e da visão nocturna. Observa-se deposição de pigmento, diminuição da vasculatura retiniana e atrofia do epitélio pigmentar da retina (Gandra *et al.*, 2008). Apenas numa fase mais tardia da doença ocorre degenerescência dos cones, com a consequente diminuição da visão central (Phelan & Bok, 2000).



# **MATERIAL E MÉTODOS**



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. MATERIAL**

#### **1.1. ANIMAIS**

Neste trabalho foram utilizados murganhos (*Mus músculos*) da estirpe ICR (CD-1) (Harlan Laboratories, Inc.), com idades compreendidas entre 1 e 6 meses. Os animais, 200 murganhos, foram fornecidos pelo SER-CBATEG (*Servicio de Estabulación de Ratonos del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica*) da Universidade Autónoma de Barcelona; 40 murganhos foram graciosamente cedidos pelo Professor Doutor António José Duarte, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com uma dieta comercial standard (2018S da Harlan Teklad Global Diets®) e mantidos num ciclo de luz/escuridão de 12 horas, com luz a partir das 8 horas da manhã.

Ainda que a estirpe de murganhos C57/BI6 seja frequentemente utilizada em trabalhos experimentais e tenha sido adoptada precisamente como modelo base nos projectos europeus EUMORPHIA (*European Union Mouse Research for Public Health and Industrial Applications*) e EUMODIC (*The European Mouse Disease Clinic*), a eleição de murganhos ICR para modelo, neste trabalho experimental, foi determinada pelo facto de a caracterização da função *scavenger* das células Mato da retina e, em particular, o estudo dos receptores *scavenger* da classe A, constituir um dos pilares desta investigação. O anticorpo 2F8 liga-se especificamente aos receptores *scavenger* da classe A e é o anticorpo comumente utilizado para a sua identificação. No entanto, o polimorfismo dos receptores *scavenger* da classe A, existente nos murganhos C57/BI6, é responsável pela perda de imuno-reactividade 2F8 destes receptores, detectada nesta estirpe (Daugherty, Whitman, Block & Rateri, 2000), particularidade que inviabiliza a possibilidade de utilizar estes murganhos como modelo experimental para a caracterização morfofuncional das células em estudo.



### **1.2. OLHOS HUMANOS**

As retinas humanas utilizados neste estudo foram graciosamente cedidas pelo Professor Doutor Alfonso Rodriguez-Baeza da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Barcelona.

Os olhos pertenciam a 5 dadores, três homens de 83, 99 e 85 anos (dador 2, 4 e 5), e duas mulheres de 89 e 86 anos (dador 1 e 3).

A enucleação dos bulbos oculares foi realizada 5,5 horas, 8 horas, 3 horas, 10 horas e 4,5 horas após a morte dos dadores 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, após a qual foram submetidos a um processamento de fixação inicial e mantidos em álcool a 70° durante várias semanas.

## 2. MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo “*Comité de Ética en Experimentación Animal*” da Universidade Autónoma de Barcelona.

Os murganhos da estirpe ICR (CD-1) podem apresentar a mutação Pde6b<sup>rd1</sup> que se traduz na degenerescência pós-natal dos fotorreceptores. Por esta razão foi sempre efectuada a confirmação da presença de todas as camadas retinianas em cada retina utilizada neste trabalho experimental.

### 2.1. PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

#### 2.1.1. RETINAS DE MURGANHO

Os animais foram eutanasiados por meio de anestesia com halotano (Fluothane®, Astra Zeneca Farmacêutica Spain S.A., Spain), seguida de deslocamento cervical (Van Zutphen, Baumans & Beynem, 2001), nos casos em que não houve necessidade de proceder à perfusão do leito vascular.

##### 2.1.1.1. Perfusão intravascular

Previamente à eutanásia dos animais, em algumas técnicas, realizou-se a perfusão intravascular de determinada substância, respeitando o seguinte protocolo:

1. *Administração de Heparina*: administrar 0,1 ml de heparina (5000 U.I./ml) por via intraperitoneal. A administração de anticoagulantes providencia um melhor preenchimento dos vasos sanguíneos e a quase total remoção do sangue existente no lúmen vascular (Esperança-Pina & Pais, 1997).
2. *Anestesia*.
3. *Canulação da artéria aorta*: colocar os animais anestesiados em decúbito dorsal e fixar os membros em abdução. Após toracotomia, proceder à canulação da artéria aorta torácica, com um cateter de diâmetro apropriado.
4. *Injecção da solução de perfusão*.

### 2.1.1.2. Enucleação dos bulbos oculares

Após a eutanásia dos animais, procedeu-se à enucleação dos bulbos oculares que foram, de seguida, lavados em solução tampão de fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*) 0,1M pH 7,4.

### 2.1.1.3. Processamento e corte de tecidos

#### Inclusão em parafina

O processamento das amostras para inclusão em parafina e posterior corte, respeitou o seguinte protocolo:

1. *Fixação*: fixar os bulbos oculares em formaldeído a 10% (NBF, *neutral buffered formalin*), durante 24 horas, à temperatura ambiente.
2. *Lavagem*: eliminar o fixador com 4 passagens em Igepal (Sigma-Aldrich) a 0,1% em solução tampão de fosfato (PBI), durante 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.
3. *Desidratação*: imergir as amostras numa bateria de álcoois de graduação crescente, desde o álcool a 70° até ao álcool absoluto (70°, 80°, 96° e 100°), realizando 2 passagens de 3-4 horas em cada álcool; passar 1 hora em xilol, para diafanização das peças.
4. *Inclusão em parafina*: imergir as peças em parafina a 57°C, durante 24 horas, realizando uma mudança da parafina durante esse tempo.
5. *Formação do bloco de parafina* (inclusão propriamente dita).
6. *Cortes com micrótopo*: realizar cortes sagitais dos olhos, com 4 µm de espessura; micrótopo Shandon Retraction AS325 (Rankin Biomedical Corp., EUA).

7. *Colagem dos cortes*: deitar os cortes num banho de água destilada aquecida a 50-55°C. Passar as lâminas, previamente tratadas com silano (Sigma-Aldrich), sob os cortes, de forma a que estes adiram ao vidro.

8. *Secagem* a 60°C durante 30 minutos.

#### **2.1.1.4. Retinas *in toto***

Após a enucleação dos bulbos oculares, as retinas foram obtidas por meio de dissecação com recurso a um microscópio estereoscópico (lupa binocular) Nikon SMZ-1000 (Nikon Corp.)

1. *Extracção da retina*: numa placa de dissecação, com base de latex, contendo PBS, fixar cada bulbo ocular com pinças de insectos (FST<sup>®</sup>, Heidelberg, Alemanha) a nível do pólo anterior (vértice da superfície curva anterior da córnea) e do pólo posterior (vértice da superfície curva posterior da esclera) do mesmo. Após uma incisão ao longo do limbo da córnea, extrair o cristalino através da pupila. Separar a retina da coroideia; seccionar o nervo óptico e extrair a retina, deixando o epitélio pigmentar da retina aderido à coroideia.

2. *Fixação*: distender a retina com o auxílio de pinças de insectos e fixar em NBF a 10%, durante 2 horas, à temperatura ambiente.

3. *Lavagem*: parar a fixação, por meio de 4 passagens em PBI, durante 30 minutos cada, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.

### 2.1.2. RETINAS HUMANAS

Os olhos humanos, conservados em álcool a 70°, a 4°C, foram submetidos ao seguinte processamento inicial:

1. *Fixação*: imediatamente após a enucleação, os olhos foram fixados em solução de Zamboni (paraformaldeído a 4% + 150 ml/l ácido pícrico em PBS, pH 7,4), durante 24 horas, a 4°C.
2. *Lavagem*: o fixador foi eliminado com 3-4 passagens em PBS, durante 1-2 dias, a 4°C.
3. *Desidratação parcial*: os olhos foram passados por uma bateria de álcoois de graduação crescente, desde o álcool a 30° até ao álcool a 70° (30°, 50° e 70°). As peças ficaram em álcool a 70°, a 4°C, várias semanas.

As retinas foram obtidas por meio de dissecação. Seccionaram-se segmentos de retina com uma área de aproximadamente 12 mm<sup>2</sup> para realização das diferentes técnicas de estudo.

#### **Inclusão em parafina**

Após 4 lavagens em PBI, durante 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação da amostra, o processamento das retinas humanas, para inclusão em parafina, respeitou um protocolo idêntico ao descrito para a inclusão em parafina dos bulbos oculares de murganho.

#### **Retinas *in toto***

Os segmentos de retina foram lavados em PBI durante 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação da amostra, para ulterior processamento, segundo as diferentes técnicas de estudo de retinas *in toto*.

## 2.2. TÉCNICA DE INJEÇÃO-REPLEÇÃO

A microvascularização da retina foi estudada através da observação de retinas injectadas com tinta da China com 5% de gelatina para microscopia (Sigma-Aldrich).

O protocolo de execução da técnica foi o seguinte:

1. *Injecção-repleção*: foi respeitado o protocolo de *perfusão intravascular* descrito, injectando 1 ml da solução a utilizar:

**Tinta da China com 5% de gelatina:**

1 ml tinta da China + 9 ml água destilada + 0,5 g gelatina

2. Após a enucleação do bulbo ocular, as retinas foram obtidas e fixadas como descrito.

3. *Lavagem*: foram realizadas 4 passagens em PBI, durante 30 minutos cada, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.

4. *Montagem das lâminas* – as retinas foram montadas segundo o seguinte protocolo:

Montar as lâminas com *Gel Mount* (Biomeda Corp., EUA).

Cobrir com lamela.

Secar 1 hora à temperatura ambiente.

Selar com verniz.

5. *Observação*: as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 (Nikon Corp., Japão) e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F (Nikon Corp.).

### 2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

#### 2.3.1. MOLDES VASCULARES DE CORROSÃO

Os aspectos da microvascularização da retina foram estudados através da observação de moldes vasculares retinianos num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-5410 (Jeol Lda.). A técnica de moldes vasculares para microscopia electrónica de varrimento (MEV) consiste na perfusão da rede vascular do órgão em estudo com meio de moldagem adequado, após a sua fixação (Esperança-Pina & Pais, 1998). A moldagem do sistema vascular permite estudar as estruturas, uma vez que a forma destas fica marcada no meio de moldagem como se fosse um negativo.

O meio de moldagem utilizado foi a resina acrílica Mercocox™ Corrosion Casting System (Ladd Research Industries, EUA).

O protocolo de preparação dos moldes vasculares foi o seguinte:

1. *Fixação-perfusão*: foi respeitado o protocolo de *perfusão intravascular* descrito. O leito vascular foi perfundido com gluteraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4.

2. *Injecção do meio de moldagem*: injectar 1,5 ml de Mercocox, 10 minutos depois da injecção do fixador. No final da injecção, laquear o vaso, para impedir o refluxo do meio de moldagem.

Para controlar o grau de preenchimento do leito vascular, recorreu-se ao critério do nariz seco, "*dry nose criterion*", que consiste na injecção de meio de moldagem até que se observe a saída de transudado do nariz do animal, e ao critério do preenchimento dos vasos da coroideia.

3. *Polimerização*: colocar o animal num banho de água quente, a 40°C, durante 1 hora.

Enuclear os bulbos oculares.

Colocar os bulbos oculares num banho de água quente, a 40°C, por um período de 24 horas.

4. *Corrosão*: colocar os bulbos oculares numa solução corrosiva de hidróxido de potássio (KOH) a 7,5% em água destilada, a 40°C, o tempo necessário para se obter a completa dissolução dos tecidos. Mudar a solução corrosiva cada 24 horas.
5. *Limpeza do molde vascular*: lavar com água destilada, a 40°C. Renovar a água cada 24 horas, até que o molde se apresente limpo.
6. *Secagem*: secar ao ar, à temperatura ambiente.
7. *Montagem dos moldes vasculares*: montar os moldes nos suportes de alumínio, próprios para microscopia electrónica de varrimento, fixando-os com fita-gomada bilateral condutora.
8. *Metalização*: revestir os moldes com uma fina película de ouro, num metalizador, em atmosfera rarefeita, através de um cátodo de ouro a 400 Å e com uma voltagem de 4-7 kV.
9. *Observação no microscópio electrónico de varrimento*.

### 2.3.2. TECIDO INTACTO

A preparação das peças para MEV sobre tecido intacto respeitou o seguinte protocolo:

1. *Obtenção das amostras de tecido*: extrair a retina, como descrito.
2. *Fixação*: distender a retina e fixar em gluteraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, durante 2 horas, a 4°C. Seccionar em fragmentos de aproximadamente 3-5 mm de largura.
3. *Lavagem*: eliminar o fixador com 2 passagens de 15 minutos em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4.
4. *Pós-fixação*: tratar com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, durante 1 hora, a 4°C.



5. *Lavagem*: efectuar 3 passagens de 15 minutos em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4.
6. *Desidratação*: imergir as amostras numa bateria de álcoois de graduação crescente, desde o álcool a 70° até ao álcool absoluto:
  - Álcool a 70°, 15 minutos à temperatura ambiente;
  - Álcool a 90°, 15 minutos à temperatura ambiente;
  - Álcool a 95°, 15 minutos à temperatura ambiente;
  - Álcool a 100°, 3 passagens de 15 minutos cada à temperatura ambiente.
7. *Secagem*: secar pelo *método de ponto crítico*; colocar as amostras num aparelho de *ponto crítico*, mergulhadas em acetona a 100%. O CO<sub>2</sub> líquido substitui gradualmente a acetona nas amostras. Após aquecimento a 36°C, o CO<sub>2</sub> volatiliza e deixa as peças preparadas para o passo seguinte.
7. *Montagem das amostras de tecido*: montar as amostras de tecido nos suportes de alumínio, próprios para microscopia electrónica de varrimento, fixando-as com fita-gomada bilateral condutora.
8. *Metalização*: metalizar as amostras de tecido, por meio do revestimento com uma fina película de ouro, num metalizador, em atmosfera rarefeita, através de um cátodo de ouro a 400 Å e com uma voltagem de 4 a 7 kV.
9. *Observação no microscópio electrónico de varrimento*.

## 2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

O processo de preparação das amostras para estudo por meio de microscopia electrónica de transmissão (MET) obedeceu ao seguinte protocolo:

1. *Obtenção das amostras de tecido*: extrair a retina como descrito.

Colocar a retina sobre uma gota de fixador (gluteraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4).

Seccionar a retina em fragmentos com uma área de 1 mm<sup>2</sup>, correspondentes às áreas central, intermédia e periférica da retina

2. *Fixação*: fixar numa solução de gluteraldeído a 2,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, durante 2 horas, a 4°C.

3. *Lavagem*: realizar 4 lavagens de 30 minutos em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4.

Deixar toda a noite em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, a 4°C.

4. *Pós-fixação*: tratar com tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4, durante 2 horas, a 4°C.

5. *Lavagem*: realizar 4 lavagens de 30 minutos em água destilada, à temperatura ambiente.

6. *Desidratação*: colocar as peças numa série de soluções de acetona em concentração crescente:

Acetona a 70%, toda a noite;

Acetona a 80%, 2 passagens de 10 minutos;

Acetona a 90%, 2 passagens de 10 minutos;

Acetona a 96%, 3 passagens de 10 minutos;

Acetona a 100%, 3 passagens de 10 minutos.

7. *Infiltração*: colocar as peças numa série de soluções, para acrescentar gradualmente a resina:

Acetona-resina Spur 3:1 toda a noite;  
Acetona-resina Spur 3:2 durante 5 horas;  
Acetona-resina Spur 1:1 toda a noite;  
Acetona-resina Spur 2:3 durante 5 horas;  
Acetona-resina Spur 1:3 toda a noite;  
Resina Spur 100% durante 2 dias.

8. *Polimerização*: elaborar os blocos de resina, por polimerização em moldes de silicone, em estufa a 60°C, durante 3 dias.

9. *Corte*: efectuar cortes semifinos (1 µm) e ultrafinos (60-80 nm) dos blocos, num ultramicrótomo.

Os cortes semifinos foram submetidos a uma coloração com azul de toluidina a 1% (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha). Foram utilizados para observações no microscópio óptico e serviram para escolher as zonas do bloco para obter os cortes ultrafinos.

10. *Montagem das grelhas*: montar os cortes ultrafinos em grelhas de cobre de 200 mesh (SPI). Contrastar com solutos de metais pesados, acetato de uranilo a 4% em álcool a 50° e citrato de chumbo, para observação no microscópio electrónico de transmissão JEOL-JEM 100 CXII (Jeol Lda.).

## 2.5. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS

As técnicas imunohistoquímicas têm por base a utilização de anticorpos que se ligam especificamente a determinados epitopos, permitindo, deste modo, identificar diferentes tipos celulares ou, a nível subcelular, diferentes constituintes celulares, que contêm o epitopo específico.

A visualização da ligação *anticorpo-antígeno* foi realizada com o recurso a um anticorpo secundário biotinizado, específico do anticorpo primário utilizado, que, por sua vez, se une a um cromogénio determinado, conjugado com estreptavidina.

Neste estudo, foram utilizados cortes de retina incluída em parafina e retinas *in toto*. Para cada tipo, foi elaborado um protocolo próprio, em função das especificidades da amostra. O controlo negativo de cada técnica foi sempre realizado, suprimindo a adição do anticorpo primário. As retinas foram processadas em câmara escura para obviar a extinção da fluorescência.

### Anticorpos primários utilizados:

**Tabela 1.** Anticorpos primários.

ANTICORPO	Diluição	Especificidade	Origem
Anti-Colagénio IV (Col IV)	1:200	membrana basal dos vasos sanguíneos	Chemicon International
Anti-Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	1:500	células de Müller e astrócitos	Dako Cytomation
Anti-CD11b	1:50	macrófagos	Serotec
Anti-F4/80, clone CI:A3-I	1:100	micróglia e macrófagos	BMA Biomedicals
Anti-F4/80, clone BM8	1:50	macrófagos residentes (não marca micróglia)	eBioscience
Anti-CD204, clone 2F8	1:50	receptores <i>scavenger</i> da classe A	Serotec
Anti-ferritina	1:100	ferritina	Abcam
Anti-TIM-2	1:100	receptor de ferritina TIM-2	eBioscience

Na preparação dos anticorpos primários foi adicionado 10% de soro bloqueador específico, com o objectivo de assegurar a menor marca de fundo:

Soro de cabra (*Normal Goat Serum*, BioNova);

Soro de coelho (*Normal Rabbit Serum*, Sigma-Aldrich).

Os anticorpos monoclonais anti-murganho carecem da utilização do kit MOM™ (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, EUA) na respectiva preparação, com o propósito de promover o bloqueio das imunoglobulinas endógenas. Deste modo, o anticorpo secundário apenas irá reconhecer o anticorpo primário e não as imunoglobulinas endógenas do murganho.

### Anticorpos secundários utilizados:

**Tabela 2.** Anticorpos secundários.

ANTICORPO	Diluição	Origem
Anti-IgG de cabra biotilado	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IgG de coelho biotilado	1:100	Vector Laboratories
Anti-IgG de rato biotilado	1:100	Vector Laboratories

### Cromogénios utilizados:

#### Diaminobenzidina (DAB) para microscopia óptica

A amplificação do sinal foi feita com *Immunopure ABC staining Kit Standard* (Pierce ® Biotechnology Inc., EUA). A revelação foi realizada com DAB (Sigma-Aldrich), seguida de coloração com hematoxilina de Mayer (Merck).

#### Fluorocromos para microscopia laser confocal

**Tabela 3.** Fluorocromos.

CROMOGÉNIO	Diluição	Excitação	Emissão	Origem
Estreptavidina conjugada com <i>Alexa Fluor® 488</i>	1:100	488 nm	519, 520 nm	Molecular Probes
Estreptavidina conjugada com <i>Alexa Fluor® 546</i>	1:100	543 nm	572, 573 nm	Molecular Probes
Estreptavidina conjugada com <i>FluoroLink™ Cy™5</i>	1:500	633 nm	666 nm	Amersham Bioscience

Os fluorocromos convencionais, emitindo no espectro de luz verde ou vermelha, *Alexa Fluor® 488* e *Alexa Fluor® 546*, respectivamente, não foram utilizados de forma sistemática, para evitar interferências com a captação da autofluorescência característica dos corpos de inclusão das células Mato. Por esta razão, sempre que a intenção era visualizar os corpos de inclusão autofluorescentes, foi utilizado um fluorocromo de emissão no espectro de luz infravermelha: *FluoroLink™ Cy™5*.

**Para coloração dos núcleos foram utilizados:**

*Hoechst Stain Solution* (Sigma-Aldrich): Excitação: 405 nm e Emissão: 460 nm.

*To-Pro®-3 iodide* (Molecular Probes): Excitação: 633 nm e Emissão: 661 nm.

### 2.5.1. IMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE CORTES HISTOLÓGICOS

O processamento das amostras em cortes histológicos de retina, incluída em parafina, para realização das técnicas imunohistoquímicas, respeitou o seguinte protocolo:

1. *Desparafinação*: 2 passagens de 5 minutos em xilol.
2. *Rehidratação*: 2 passagens em álcool a 100° durante 5 minutos cada;  
2 passagens em álcool a 96° durante 5 minutos cada;  
1 passagem em álcool a 80° durante 5 minutos;  
1 passagem em álcool a 70° durante 5 minutos.
3. *Lavagem*: 1 passagem em água destilada de 5 minutos;  
1 passagem em Solução Tampão (WB, *wash buffer*) de 5 minutos.
4. *Inibição da actividade da peroxidase endógena* (para amostras cuja revelação é efectuada com DAB):  
1 passagem em WB + 10% água oxigenada a 33% de 5 minutos;  
1 passagem em WB de 5 minutos.

### 5. *Recuperação antigénica: Pré-tratamento das amostras em Panela de Pressão*

Preparação da solução de pré-tratamento:

0,294 g ácido cítrico + 1,8 g citrato de sódio + 750 ml água destilada

Colocação das amostras na panela de pressão.

Ebulição na solução de pré-tratamento durante 4 minutos.

Arrefecimento da amostra à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

1 passagem PBI durante 5 minutos.

### 6. *Montagem da câmara de incubação.*

7. *Lavagem:* lavar em água destilada 5 minutos;

lavar em WB 5 minutos.

8. ***Incubação do anticorpo primário***, em câmara húmida, a 4°C, durante toda a noite. As diluições de trabalho e o protocolo de preparação de cada anticorpo foram os seguintes:

#### 8.1. ***Retinas de murganho – preparação do anticorpo***

Anticorpos policlonais:

Anti-Col IV (1:200) + WB + 10% soro bloqueador

Anti-GFAP (1:500) + WB + 10% soro bloqueador

Anti-Ferritina (1:100) + WB + 10% soro bloqueador

Anticorpos monoclonais:

1. *Incubar* com Reagente Bloqueador de IgG do Kit MOM (36 µl/ml de PBS) 1 hora, à temperatura ambiente.

2. *Lavar:* 3 lavagens de 5 minutos com PBI.

3. *Incubar* os anticorpos diluídos na Solução de Diluição do Kit MOM 5 minutos:

Anti-F4/80 (1:100) + Solução de Diluição + 10% soro bloqueador

Anti-CD11b (1:50) + Solução de Diluição + 10% soro bloqueador

Anti-F4/80 (BM8) (1:50) + Solução de Diluição + 10% soro bloqueador

Anti-CD204 (2F8) (1:50) + Solução de Diluição + 10% soro bloqueador

Anti-TIM-2 (1:100) + Solução de Diluição + 10% soro bloqueador

**8.2. Retinas humanas – preparação do anticorpo**

Anti-Col IV (1:20) + WB + 10% soro bloqueador

Anti-GFAP (1:1000) + WB + 10% soro bloqueador

9. *Lavagem*: 3 lavagens de 5 minutos em PBI.

10. **Incubação do anticorpo secundário**, em câmara húmida, à temperatura ambiente, durante 2 horas:

**10.1. Retinas de murganho – preparação do anticorpo**

Anticorpos policlonais – os anticorpos secundários dos anticorpos policlonais foram preparados, nas respectivas concentrações, em WB:

Anti-Col IV: anti IgG de coelho biotilado (1:100)

Anti-GFAP: anti IgG de coelho biotilado (1:100)

Anticorpos monoclonais – os anticorpos secundários dos anticorpos monoclonais foram preparados, nas respectivas concentrações, numa solução contendo Concentrado de Proteína do Kit MOM (1:12,5) + PBS:

IgG anti-rato biotilada (1:100)

**10.2. Retinas humanas – preparação do anticorpo**

Os anticorpos secundários foram preparados, nas respectivas concentrações, em WB:

Anti-Col IV: anti IgG de cabra biotilado (1:100)

Anti-GFAP: anti IgG de coelho biotilado (1:100)

11. *Lavagem*: 3 lavagens de 5 minutos em PBI.



12. **Revelação:** a visualização da união anticorpo-antígeno (revelação) pode ser obtida por diferentes métodos e, em consequência, o protocolo de processamento das amostra é específico para cada um deles.

### 12.1. **Revelação para microscopia óptica**

**Amplificação do sinal:** incubação do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase *Immunopure ABC staining kit Standard*, em câmara húmida, à temperatura ambiente, durante 1 hora, na concentração de 1:50 em WB.

**Lavagem:** 3 lavagens, de 5 minutos cada, em PBI.

**Revelação:** Lavagem em solução tampão de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{PO}_4$ ), 10 minutos.

Preparação da solução de revelação: 100ml  $\text{PO}_4$  + 50mg DAB + 2 $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$

1 passagem na solução de revelação durante 5-20 minutos.

Lavagem em  $\text{PO}_4$  durante 5 minutos.

Lavagem em água destilada durante 5 minutos.

**Coloração:** Coloração com hematoxilina de Mayer, durante 3 segundos.

**Desidratação:** 1 passagem em álcool a 70° durante 5 minutos.

1 passagem em álcool a 80° durante 5 minutos.

2 passagens em álcool a 96° de 5 minutos cada.

2 passagens em álcool a 100° de 5 minutos cada.

3 passagens em xilol de 5 minutos cada.

**Montagem das lâminas:** montar as lâminas com Entellan® (Merck) e cobrir com lamela.

Selar com verniz.

**Observação:** as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F.

### 12.2. Revelação para microscopia laser confocal

*Incubação do fluorocromo*, em câmara húmida, a 4°C, durante toda a noite ou à temperatura ambiente, durante 2 horas:

Estreptavidina conjugada com *FluoroLink™ Cy™5* (1:500) + PBS

Estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor® 488* (1:100) + PBS

Estreptavidina conjugada com *Alexa Fluor® 546* (1:100) + PBS

*Lavagem:* 3 lavagens de 5 minutos em PBI.

*Coloração dos núcleos:*

a. *Hoechst Stain Solution*, durante 15 minutos.

Não é necessário lavar.

b. *To-Pro®-3 iodide* (1:100) + PBS durante 5 minutos.

Lavar: 3 passagens de 5 minutos em PBI.

*Montagem das lâminas:*

Montar as lâminas com *Gel Mount* (meio aquoso para fluorescência) e cobrir com lamela.

Secar 1 hora à temperatura ambiente.

Selar com verniz.

*Observação:*

As retinas foram observadas num microscópio de varrimento laser confocal Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH, Alemanha).

### 2.5.2. IMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE RETINAS *IN TOTO*

As diluições de trabalho e a preparação dos anticorpos e dos cromogénios respeitaram os protocolos anteriormente descritos. Depois de fixadas, as retinas foram submetidas a um processamento que compreende os seguintes passos:

1. *Lavagem*: 4 lavagens de 15 minutos em PBI, à temperatura ambiente, com agitação a 80 r.p.m.
2. *Permeabilização*: Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% em PBS, 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação a 80 r.p.m.
3. *Lavagem*: 4 lavagens de 15 minutos em PBI, com agitação a 80 r.p.m.  
1 lavagem de 15 minutos em WB, com agitação a 80 r.p.m.
4. *Incubação do anticorpo primário*: toda a noite a 4°C ou 2 horas à temperatura ambiente.
5. *Lavagem*: 4 lavagens de 15 minutos em PBI, com agitação a 80 r.p.m.
6. *Incubação do anticorpo secundário*: toda a noite a 4°C ou 2 horas à temperatura ambiente.
7. *Lavagem*: 4 lavagens de 15 minutos em PBI, com agitação a 80 r.p.m.
8. *Incubação do cromogénio*: toda a noite a 4°C ou 2 horas à temperatura ambiente.
9. *Lavagem*: 4 lavagens de 15 minutos em PBI, com agitação a 80 r.p.m.
10. *Coloração dos núcleos*.
11. *Montagem das lâminas*: montar as lâminas com *Gel Mount* e cobrir com lamela.  
Secar 1 hora à temperatura ambiente.  
Selar com verniz.
12. *Observação*: as retinas foram observadas num microscópio de varrimento laser confocal Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH).

## 2.6. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

Foram realizadas técnicas histoquímicas em retinas *in toto* e em cortes histológicos de retinas incluídas em parafina, por meio da marcação com a lectina *Arachis hypogaea* (PNA) conjugada com biotina. As retinas foram processadas em câmara escura.

### 2.6.1. LECTINAS

As lectinas são glicoproteínas de origem vegetal, de tipo não imune, que têm a capacidade de se ligar a hidratos de carbono (Acarin, Vela, González & Castellano, 1994). Encontram-se largamente distribuídas no Reino Vegetal, tendo sido identificadas em mais de 800 espécies de plantas. Actuam, ligando-se especificamente a um determinado radical glucídico, para o qual exibem uma afinidade muito elevada. Esta propriedade permite a realização de estudos analíticos de polissacarídeos e glucoconjugados, baseados na identificação precisa dos açúcares simples que os constituem, com um interesse particular no estudo da composição das membranas celulares.

#### Lectinas utilizadas:

**Tabela 4.** Lectinas.

Lectina	Afinidade	Marca	Origem
PNA	N-acetil-β-D-galactosamina; β-D-galactosamina	Cones (fotorreceptores)	Sigma-Aldrich

O protocolo de execução desta técnica é idêntico ao anteriormente descrito para as técnicas imunohistoquímicas, embora com algumas particularidades. A incubação da lectina corresponde ao passo de incubação do anticorpo primário. Não há incubação com nenhum anticorpo secundário, pois a lectina está conjugada com biotina que se liga directamente à estreptavidina conjugada com o fluorocromo.

A diluição de trabalho e o protocolo de preparação da lectina foi o seguinte:

25 µg PNA/ml de PBS + 0,5% de Triton X-100

A incubação foi efectuada a 4°C, durante toda a noite.

### 2.7. COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

#### 2.7.1. HEMATOXILINA-EOSINA

A coloração histológica com hematoxilina-eosina obedeceu ao seguinte protocolo:

1. *Desparafinação*: 2 passagens em xilol de 5 minutos.
2. *Rehidratação*: 2 passagens em álcool a 100° durante 5 minutos cada;  
2 passagens em álcool a 96° durante 5 minutos cada;  
1 passagem em álcool a 80° durante 5 minutos;  
1 passagem em álcool a 70° durante 5 minutos.
3. *Lavagem*: 1 passagem em água corrente de 5 minutos.
4. *Hematoxilina de Harris*: 1 passagem 5-10 minutos.
5. *Lavagem*: 1 passagem em água corrente de 5 minutos.
6. *Ácido clorídrico a 0,25%* em álcool a 70°: 1 passagem rápida.
7. *Lavagem*: 1 passagem em água corrente de 5 minutos.
8. *Eosina*: 1 passagem de 30 segundos-1 minuto.
9. *Desidratação rápida*: 2 passagens em álcool a 96° durante 5 minutos cada;  
1 passagem em álcool a 100° durante 5 minutos.
10. *Diafanização*: 2 passagens em xilol durante 5 minutos cada.
11. *Montagem das lâminas*: montar as lâminas com Entellan® e cobrir com lamela.  
Selar com verniz.
12. *Observação*: as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F.

### 2.7.2. OIL RED O

A coloração com *oil red O* (Sigma-Aldrich) é utilizada para demonstrar a presença de lípidos nos tecidos. Após a coloração, os lípidos apresentam cor vermelha (Bancroft & Gamble, 2002). Para pesquisar a presença de lípidos nas inclusões citoplasmáticas das células Mato, submetem-se as retinas ao seguinte protocolo de coloração:

1. *Preparação da Solução de Oil red O:*

Juntar: 0,9 g Red oil O + 100 ml 2-propanol a 100%

Repouso durante toda a noite.

Filtrar.

Diluir: 180 ml da solução preparada + 120 ml água destilada

Colocar a 4°C durante toda a noite.

Filtrar.

Repouso de 30 minutos.

Filtrar antes de usar.

2. *Obtenção das amostras*, como descrito.

3. *Lavagem*: lavar com 2-propanol a 60%.

4. *Coloração*: tratar com a Solução de *Oil red O* durante 30 minutos.

5. *Lavagem*: lavar com álcool a 60°, 15-20 segundos.

Lavar por meio de duas passagens em água corrente, durante 20 minutos cada.

6. *Imersão*: imergir em glicerina 1 hora.

7. *Montagem*: montar a lâmina com glicerina e cobrir com lamela.

Secar 1 hora à temperatura ambiente e selar com verniz.

8. *Observação*: as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F.

### 2.8. ANÁLISE DA AUTOFLUORESCÊNCIA

A emissão de fluorescência de uma substância ou partícula pode ser analisada, em microscopia de varrimento laser confocal, por meio da realização de um varrimento ao longo do espectro de luz (varrimento de  $\lambda$ ). Esta metodologia permite medir a intensidade de emissão de fluorescência de uma determinada substância, ao longo de todo o espectro de luz, para um determinado comprimento de onda de excitação. A intensidade de emissão de fluorescência é específica para cada componente químico, definindo um perfil de intensidade de emissão de fluorescência característico (*fingerprint*<sup>1</sup>).

O espectro de emissão de fluorescência dos corpúsculos de inclusão das células autofluorescentes perivasculares retinianas (células Mato) e da lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina foram analisados num microscópio de varrimento laser confocal Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH).

A extracção da retina por dissecção tem como consequência a separação da neuro-retina da camada de células do epitélio pigmentar da retina, permanecendo esta última aderente à corioideia. Por este motivo, para estudo das células do epitélio pigmentar da retina procedeu-se à extracção da corioideia, em cuja superfície interna se encontra unida a camada de células referida. As retinas *in toto* e as corioideias, com o epitélio pigmentar da retina aderente, foram aplanadas e fixadas em NBF a 10%, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavadas em PBS, foram montadas em lâminas com meio de montagem para fluorescência, como descrito anteriormente. O modo de transmissão foi usado para visualização dos vasos sanguíneos.

---

<sup>1</sup> termo inglês usado para designar a variação da intensidade de emissão de fluorescência ao longo do espectro de luz, específica de uma partícula, para um determinado comprimento de onda de excitação.

## 2.9. ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DOS LÍPIDOS

Os lípidos simples, não conjugados, são arrastados pela acção do metanol e do éter etílico. Contudo, os lípidos ligados a proteínas resistem à extracção por meio destes solventes orgânicos (Feeney, 1978; Bancroft & Gamble, 2002).

Para determinar o tipo de lípidos presentes nas inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato, submetem-se retinas *in toto* à acção destes solventes de lípidos, segundo o seguinte protocolo:

1. *Obtenção das amostras*, como descrito.

2. *Fixação e lavagem*:

### **Metanol a 70% pH 7,4:**

*Preparação do Metanol a 70%:* 7 ml metanol (Panreac) + 3 ml PBS

*Fixação:* distender a retina e fixar em metanol a 70% em PBS durante 2 horas, à temperatura ambiente.

*Lavagem:* lavar, por meio de 4 passagens em PBS, durante 30 minutos cada, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.

### **Éter etílico:**

*Fixação:* distender a retina e fixar em éter etílico (Sigma-Aldrich), durante 20 minutos, à temperatura ambiente.

*Rehidratação:* 2 passagens em álcool a 100° durante 5 minutos cada;  
2 passagens em álcool a 96° durante 5 minutos cada;  
1 passagem em álcool a 80° durante 5 minutos;  
1 passagem em álcool a 70° durante 5 minutos.



*Lavagem:* lavar, por meio de 4 passagens em PBS, durante 30 minutos cada, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.

3. *Coloração dos núcleos:* *To-Pro®-3 iodide* (1:100) + PBS durante 5 minutos.

Lavar: 3 passagens de 5 minutos em PBI.

4. *Montagem das lâminas:* Montar as lâminas com *Gel Mount* e cobrir com lamela.

Secar 1 hora à temperatura ambiente e selar com verniz.

5. *Observação:*

As retinas foram observadas num microscópio de varrimento laser confocal Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH).

## 2.10. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo usa as propriedades de dispersão de luz das partículas e de excitação e emissão de luz dos fluorocromos, para gerar uma série de dados sobre células ou constituintes celulares. A suspensão de células, marcadas com determinado anticorpo, ligado a um fluorocromo, é injectada, atravessando uma câmara, onde se efectua a passagem célula a célula da amostra. Deste modo, as células são expostas individualmente a um laser de determinado comprimento de onda. A luz que a célula, em suspensão nesse fluxo contínuo, faz dispersar, em direcção frontal ou lateral, é captada por detectores e essa informação é processada. A combinação da informação veiculada por estes dois tipos de dispersão, permite analisar características das células ou de componentes celulares, de forma individual, e identificar diferentes populações celulares.

As células Mato da retina foram estudadas por meio de citometria de fluxo. Para o efeito, foram utilizadas retinas e sangue de 30 murganhos.

Para marcação das células foram usados os seguintes anticorpos:

CD11b (BD Pharmingen) conjugado com APC (*allophycocyanin*);  
Anti - F4/80 (BM8), biotinilado (eBioscience);  
Anti - CD204 (2F8), biotinilado (Serotec).

Nos dois últimos anticorpos, usou-se estreptavidina conjugada com FluoroLink™ Cy™5 como fluorocromo. A autofluorescência das células Mato foi detectada no canal FLH2 (verde).

O processamento das amostras para análise foi realizado segundo o seguinte protocolo:

### **Retinas:**

1. *Obtenção das amostras:* após a enucleação dos bulbos oculares, as retinas foram obtidas como descrito e colocadas em PBS.
2. *Desagregação mecânica:* desagregar o tecido com uma lâmina de bisturi, em PBS.  
Recolher as células num tubo *ependorf* (1,5 ml) com PBS.  
Centrifugar a 1400 r.p.m. durante 5 minutos.

Girar os tubos e centrifugar a 1400 r.p.m. durante 2 minutos.

Rejeitar o sobrenadante.

3. *Digestão com colagenase*: adicionar 1,5 ml de colagenase (1,6 mg/ml em PBS) e manter 30 minutos a 37°C.

Diluir em PBS e filtrar (filtro de células de 30 µm).

Centrifugar a 1400 r.p.m. durante 5 minutos.

Girar os tubos e centrifugar a 1400 r.p.m. durante 2 minutos.

Rejeitar o sobrenadante e voltar a diluir em 150 µl de PBS.

Distribuir 50 µl de células em suspensão por tubo.

### **Sangue:**

1. *Obtenção das amostras*: depois de anestesiados, os animais foram decapitados e o sangue colhido para um tubo com heparina. As células mononucleares em circulação foram isoladas com Histopaque-1083 (Sigma-Aldrich).

2. *Obtenção das células mononucleares*: diluir o sangue 1:1 com PBS.

Adicionar 3 ml de Histopaque-1083.

Centrifugar a 800 r.p.m. durante 25 minutos.

Colher as células mononucleares da interface.

Depois de obtidas as células retinianas e sanguíneas para estudo, o processamento das amostras continuou, obedecendo ao seguinte protocolo:

1. *Incubação do anticorpo*: incubar 45 minutos a 4°C na diluição de trabalho específica.

2. *Lavagem*: Adicionar 1 ml de PBS.

Centrifugar a 1400 r.p.m. durante 5 minutos.

Girar os tubos e centrifugar a 1400 r.p.m. durante 2 minutos.

Rejeitar o sobrenadante.

3. *Incubação do fluorocromo*: adicionar 200 µl de estreptavidina conjugada com o fluorocromo e incubar 45 minutos a 4°C.

4. *Lavagem*: Adicionar 1 ml de PBS.  
Centrifugar a 1400 r.p.m. durante 5 minutos.  
Girar os tubos e centrifugar a 1400 r.p.m. durante 2 minutos.  
Rejeitar o sobrenadante.

5. *Análise num citómetro de fluxo* FACScanto (BD Pharmingen, EUA).

### 2.11. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CÉLULAS MATO

Para determinar se as células Mato da retina se movimentavam ao longo dos vasos sanguíneos, foi realizada uma sequência de imagens a intervalos de tempo definidos (*time-lapse imaging*), por meio de microscopia de varrimento laser confocal. O protocolo de preparação das retinas respeitou os seguintes procedimentos:

1. Injeção de 1 ml de tinta da China com 5% de gelatina para microscopia (Sigma-Aldrich), segundo a técnica de perfusão intravascular descrita.
2. Extração das retinas, segundo o protocolo descrito, usando PBS estéril.

Imediatamente após a extração das retinas, estas foram transferidas para o meio de cultura, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com soro fetal de bovino a 10% (Sigma-Aldrich), penicilina e estreptomicina e 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich). Todos os procedimentos foram executados em condições de assépsia, com material esterilizado e em câmara de fluxo laminar.

As retinas cultivadas foram mantidas numa câmara com atmosfera húmida de CO<sub>2</sub>/ar (5% / 95%) a 37°C, durante 12 horas.

As imagens foram obtidas a intervalos de 15 minutos, durante 12 horas consecutivas, num microscópio confocal de varrimento laser Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH). A autofluorescência foi usada para detecção das células Mato. Os vasos sanguíneos injectados com tinta da China foram identificados no modo de transmissão.

A viabilidade das células retinianas foi avaliada no final, por meio da coloração com Trypan Blue (Sigma-Aldrich) a 10% em PBS, segundo o seguinte protocolo:

Lavar: 2 lavagens em PBS durante 5 minutos.

Colocar as retinas na solução de Trypan Blue durante 5 minutos.

Lavar: 2 lavagens em PBS durante 5 minutos.

Fixar em NBF a 10%, como descrito.

Montar em lâmina, como descrito.

## 2.12. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO SCAVENGER

Para estudar a função *scavenger* das células Mato da retina, injectaram-se, separadamente, na veia da cauda, as seguintes substâncias:

1. 1 ml de peroxidase de rábano (HRP) Tipo II (Sigma-Aldrich), na concentração de 15 mg/ml de soro fisiológico, o triplo da concentração desta substância traçadora, normalmente usada em estudos de integridade da BHR (Vinores, 1995).
2. 1 ml de lipoproteína acetilada de baixa densidade (ac-LDL), de plasma humano, conjugada com DiL (Dil-ac-LDL, Molecular Probes Europe BV), na concentração de 200 µg/ml em soro fisiológico.

Duas horas após a injeção de Dil-ac-LDL e 6 horas após a injeção de HRP, os murganhos foram eutanasiados e as retinas foram extraídas e fixadas, segundo os protocolos descritos.

Nas retinas dos murganhos injectados com HRP, a presença desta proteína foi detectada pela revelação com DAB, reacção que produz o aparecimento de grânulos de coloração acastanhada na presença de HRP. As retinas foram montadas em lâminas e observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F. Retinas de murganhos não injectados serviram de controlo negativo.

O complexo Dil-ac-LDL emite uma fluorescência de 571 nm, para valores de absorção de 554 nm. A fluorescência vermelha emitida pela Dil indicou a localização do complexo Dil-ac-LDL nas retinas dos murganhos injectados. De igual forma, retinas de murganhos não injectados serviram de controlo negativo. As retinas foram submetidas ao protocolo de fixação descrito para as técnicas imunohistoquímicas de retinas *in toto* e os núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution*. Depois de montadas, as retinas foram observadas num microscópio óptico com sistema de epifluorescência Nikon Eclipse E-800 (Nikon Corp.), usando os filtros G-2A (EX 510-560 nm, DM 575 nm, BA 590 nm) e UV (EX 330-380 nm, DM 400 nm, BA 420 nm) e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F.

### 2.13. MICROANÁLISE POR ENERGIA DISPERSIVA POR RADIAÇÃO-X

O conteúdo em ferro foi analisado por meio de microanálise por energia dispersiva por radiação-X (EDX) sobre cortes ultrafinos de retina (70 nm), para microscopia electrónica de transmissão, não contrastados. Os cortes de tecido, montados nas grelhas, foram cobertos com uma película de carbono, previamente à realização da análise.

Em 9 amostras, foram analisadas as seguintes estruturas: lisossoma da célula Mato, citoplasma da célula Mato, espaço perivascular e citoplasma da célula de Müller.

A microanálise por EDX foi realizada num microscópio electrónico de transmissão JEOL 2011, equipado com um espectrómetro de energia dispersiva por radiação-X, com uma voltagem de aceleração de 200kV. Os resultados foram analisados através do programa Microanálise INCA (Oxford).

#### **Análise estatística**

Os valores obtidos foram submetidos a um *teste t de Student* para amostras independentes (Graph Pad Prisma 4). O nível de significância foi definido para valores de  $P < 0,001$ . Os resultados foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão.

## 2.14. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO E ACUMULAÇÃO DE FERRITINA

Para este estudo, foi injectada, na veia da cauda, ferritina de baço de cavalo (Sigma-Aldrich), na concentração de 40 mg/ml, em soro fisiológico. A ferritina foi detectada pelo seu conteúdo em ferro, por meio da reacção de Azul da Prússia que, na presença de ferro, dá origem ao aparecimento de grânulos de cor azul turquesa (Bancroft & Gamble, 2002). Retinas de murganhos não injectados serviram de controlo negativo.

O protocolo de execução desta técnica obedeceu aos seguintes passos:

1. *Injecção:* injectar 1 ml de ferritina de baço de cavalo, na veia da cauda.
  
2. *Extracção da retina:* 6 horas após a injecção, eutanásia dos murganhos, seguida de extracção e fixação das retinas, segundo os protocolos descritos.
  
3. *Preparação da solução de Azul da Prússia:*  
1% de ferrocianido de potássio + 1% de ácido clorídrico em H<sub>2</sub>O destilada
  
4. *Reacção de Azul da Prússia:*  
Lavar: 2 lavagens de 15 minutos em PBI.  
Adicionar a solução de Azul da Prússia.  
Esperar 30 minutos.  
Lavar: 2 lavagens de 15 minutos em PBI.
  
5. *Montagem das lâminas:* montar em lâminas, como descrito.
  
6. *Observação:* as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800 e fotografadas com uma câmara fotográfica digital Nikon DXM 1200F.



### 2.15. MODELO DE RETINOPATIA INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE IODATO DE SÓDIO

A perda de visão, como consequência de lesões degenerativas da retina, é característica comum a um grande número de retinopatias, ocorrendo a morte dos fotorreceptores, principalmente, por um processo de apoptose (Chader, 2002).

O iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ) é frequentemente utilizado na indução de retinopatia, com degenerescência dos fotorreceptores, em várias espécies animais, incluindo o murganho. Esta substância possui uma toxicidade específica para as células do epitélio pigmentar da retina, contudo, em doses mais elevadas, provoca lesões degenerativas nos fotorreceptores (Kiuchi, Yoshizawa, Shikata, Moriguchi & Tsubura, 2002; Enzmann *et al.*, 2006). A injeção de iodato de sódio induz o aparecimento de lesões degenerativas características nas células do epitélio pigmentar da retina, seguidas do aparecimento de lesões nos fotorreceptores, directamente dependentes da dose e do tempo decorrido após a injeção.

Os murganhos, distribuídos em 3 grupos de 4 animais cada, foram injectados intraperitonealmente com 100 mg/Kg de iodato de sódio (Sigma-Aldrich) diluídos em soro fisiológico e foram eutanasiados 24, 48 e 72 horas após a injeção, respectivamente. Um quarto grupo de 4 animais não injectados foi usado como controlo negativo.

As retinas foram obtidas e processadas como descrito para estudo por meio das técnicas imunohistoquímicas para microscopia óptica e para microscopia laser confocal.

# RESULTADOS



## RESULTADOS

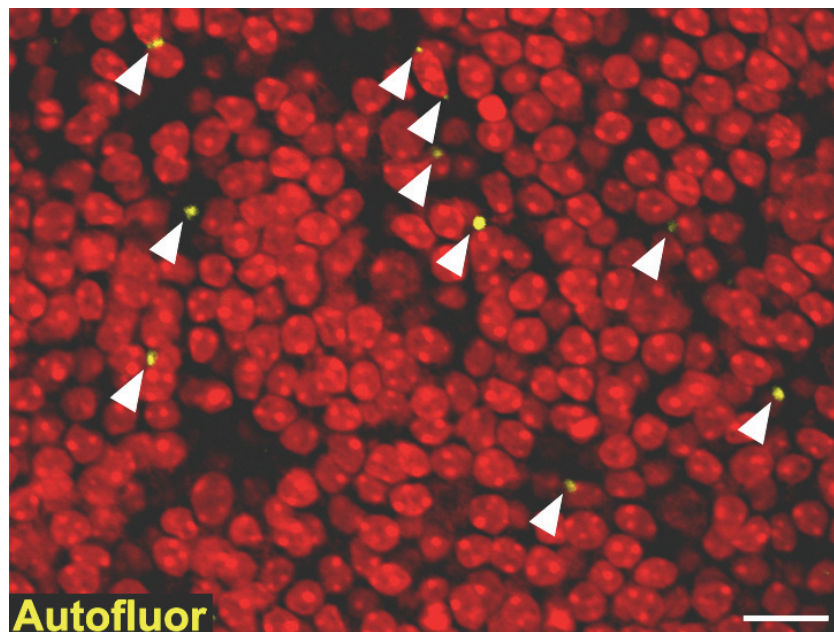
O estudo de retinas humanas e de murganho, sem doença aparente, revelou a presença de um tipo de macrófagos perivasculares autofluorescentes com características morfológicas, topográficas e funcionais semelhantes às descritas para as células Mato cerebrais. O objectivo deste trabalho consistiu em caracterizar alguns dos aspectos morfofuncionais mais relevantes das células Mato da retina, em condições fisiológicas, bem como a determinação do seu possível envolvimento em situação de retinopatia.

### 1. AUTOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS MATO DA RETINA

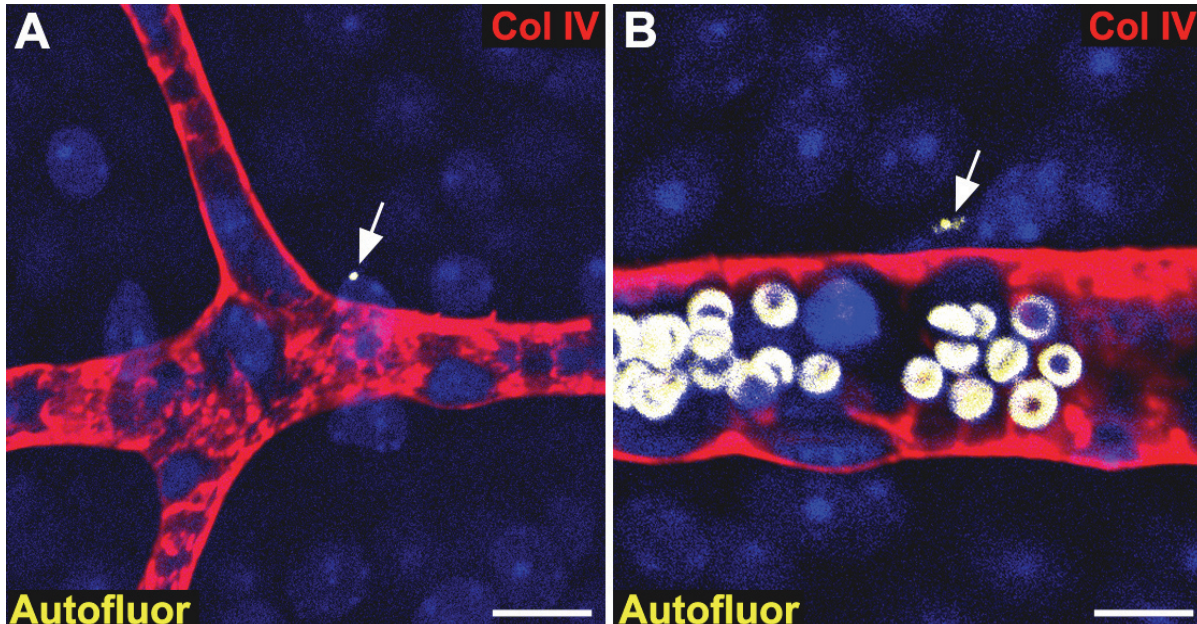
No decurso da observação de retinas, por meio de microscopia de varrimento laser confocal, foi evidenciada a presença de autofluorescência nestas estruturas, em murganhos com idades compreendidas entre 1 e 6 meses. Quando submetidas a uma energia de excitação de 488 nm, era emitida uma fluorescência amarelo-alaranjada. Esta autofluorescência foi observada, de forma constante, em inclusões citoplasmáticas perinucleares, de aspecto granular, em células presentes nos estratos retinianos mais internos (Figura 20).

A análise das inclusões citoplasmáticas autofluorescentes, em retinas de murganho *in toto*, por meio da realização de varrimentos de  $\lambda$ , num microscópio de varrimento laser confocal, para cada um dos comprimentos de onda de excitação (405, 458, 476, 488, 514 e 561 nm), permitiu caracterizar a fluorescência destas células, verificando-se que a intensidade máxima de emissão de fluorescência ocorria para valores de 530 a 630 nm, quando submetidas a uma energia de excitação de 488 nm. Este valores foram tomados, desde então, como referência para detecção da autofluorescência das inclusões citoplasmáticas das células perivasculares em estudo.

A necessidade de compreender a distribuição espacial das células autofluorescentes, determinou, numa primeira fase, o recurso às técnicas imunohistoquímicas para estudo de retinas *in toto*, de murganhos saudáveis, por meio de microscopia de varrimento laser confocal. A observação de retinas *in toto*, por meio desta técnica, providenciava a possibilidade de obter uma perspectiva geral da distribuição espacial tridimensional das células autofluorescentes ao longo de toda a extensão da retina. Para além disso, a associação da marcação imunohistoquímica da membrana basal dos vasos sanguíneos com



**Figura 20.** Células autofluorescentes na retina de murganho. As cabeças de seta assinalam grânulos autofluorescentes junto aos núcleos de algumas células. MVLC. Autofluor, autofluorescência; núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* (vermelho). Barra: 25 µm.



**Figura 21.** Células autofluorescentes perivasculares na retina de murganho. As setas assinalam grânulos autofluorescentes junto ao núcleo das células. A marcação imunohistoquímica com anti-colagénio IV (Col IV), marcando a membrana basal da parede vascular, mostrou que as células autofluorescentes se localizavam externamente à membrana basal, frequentemente a nível das ramificações dos vasos sanguíneos. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 20 µm (A) e 12 µm (B).

um marcador específico permitia também a determinação da localização destas células autofluorescentes relativamente à árvore vascular retiniana, cujo padrão de distribuição se relaciona de forma muito particular com os diferentes estratos retinianos. Por conseguinte, deste modo, seria possível determinar, de forma clara, a que níveis da retina se podiam encontrar as células autofluorescentes em estudo. Como referido no capítulo dos Materiais e Métodos, todos os procedimentos foram realizados em câmara escura, precisamente para obviar a extinção da fluorescência emitida por estas células.

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-colagénio IV, um marcador da membrana basal dos vasos sanguíneos (Hashimzume & Ushiki, 2002), confirmou que as células autofluorescentes em estudo se localizavam exclusivamente nas camadas mais internas da retina. Mais, revelou que estas células se encontravam sempre apostas a vasos sanguíneos, particularmente aos de maior calibre. Efectivamente, em condições fisiológicas, estas células autofluorescentes foram observadas, dispondo-se de forma descontínua, junto a arteríolas e vénulas de 2ª ordem, a arteríolas pré-capilares e a vénulas pós-capilares. Curiosamente, em condições fisiológicas, não se observou a presença destas células a nível dos plexos vasculares mais externos.

De um modo geral, estas células autofluorescentes estavam presentes nas áreas de ramificação vascular, sendo frequentemente observadas na origem de algumas arteríolas pré-capilares, especialmente naquelas que se mantinham nas camadas retinianas mais internas. Relativamente às estruturas venosas, observou-se que as células autofluorescentes se dispunham de forma descontínua ao longo de toda a parede das vénulas de 2ª ordem e das vénulas pós-capilares, encontrando-se igualmente com muita frequência nas áreas de confluência destes vasos sanguíneos (Figura 21).

A presença das células autofluorescentes em estudo, exclusivamente nos estratos mais internos da retina, é coincidente com a distribuição dos vasos sanguíneos retinianos de maior calibre, uma vez que estes apenas se encontram a nível destas camadas. Este resultado sugeriu, desde logo, uma provável inter-relação das células autofluorescentes com estes vasos sanguíneos retinianos, vasos onde, devido às características da árvore vascular, existe um fluxo sanguíneo preferencial.

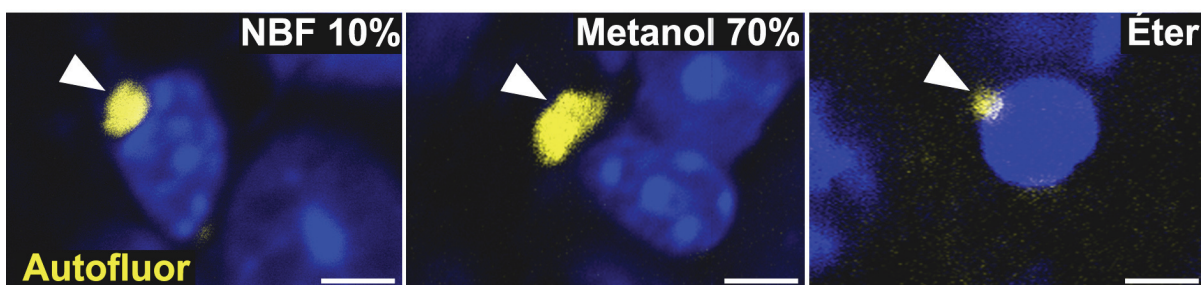
No sistema nervoso dos mamíferos existem células autofluorescentes localizadas no espaço perivascular (Virchow-Robin) da microvasculatura cerebral, as células Mato (Mato & Ookawara, 1981). Uma vez que se considera que a neuro-retina representa uma expansão

do encéfalo (Costa & Morato, 1984; Carlson, 1999), admitiu-se a hipótese de estas células autofluorescentes perivasculares retinianas observadas poderem pertencer a um tipo celular semelhante. Por este motivo, estas células começaram então a ser designadas por células Mato da retina.

A autofluorescência dos corpos de inclusão das células Mato cerebrais deve-se, sobretudo, ao seu conteúdo em lipoproteínas oxidadas (Mato *et al.*, 1986a e 1996). A coloração de retinas *in toto* com *oil red O* permitiu demonstrar a presença de lípidos nas células Mato retinianas, que depois de submetidas a esta técnica, revelaram a presença de células com inclusões citoplasmáticas de cor vermelha numa localização perivascular.

Para determinar se a autofluorescência das inclusões citoplasmáticas das células perivasculares retinianas, as células Mato da retina, se devia igualmente à presença de lipoproteínas contendo lípidos oxidados na sua constituição, procedeu-se ao estudo de retinas *in toto*, submetendo-as a um tratamento com *metanol* e *éter etílico*. Os lípidos simples, não conjugados, são arrastados pela acção destas substâncias. Contudo, os lípidos ligados a proteínas resistem à extracção por meio destes solventes orgânicos (Feeney, 1978; Bancroft & Gamble, 2002).

Tal como observado nas retinas fixadas com NBF a 10%, após o tratamento de retinas de murganho *in toto* com metanol a 70%, 2 horas à temperatura ambiente, ou com éter etílico, 20 minutos à temperatura ambiente, a autofluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato manteve-se (Figura 22).



**Figura 22.** Autofluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato. A autofluorescência (Autofluor) não desapareceu em retinas fixadas com NBF 10%, com metanol a 70% ou em retinas tratadas com éter etílico, indicando que as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato (cabeças de seta) são, provavelmente, constituídas por lipoproteínas com lípidos oxidados na sua composição. MVLC. Núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* (azul). Barras: 4  $\mu\text{m}$ , 4,5  $\mu\text{m}$  e 7  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Estes resultados, obtidos, para cada amostra, com os mesmos parâmetros de captação de imagem, sugeriram que, provavelmente, também as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato retinianas eram compostas por lipoproteínas contendo lípidos oxidados na sua constituição. Uma vez que os lípidos oxidados emitem fluorescência, seriam também essas lipoproteínas oxidadas, provavelmente, as responsáveis pela autofluorescência emitida pelas células Mato da retina.

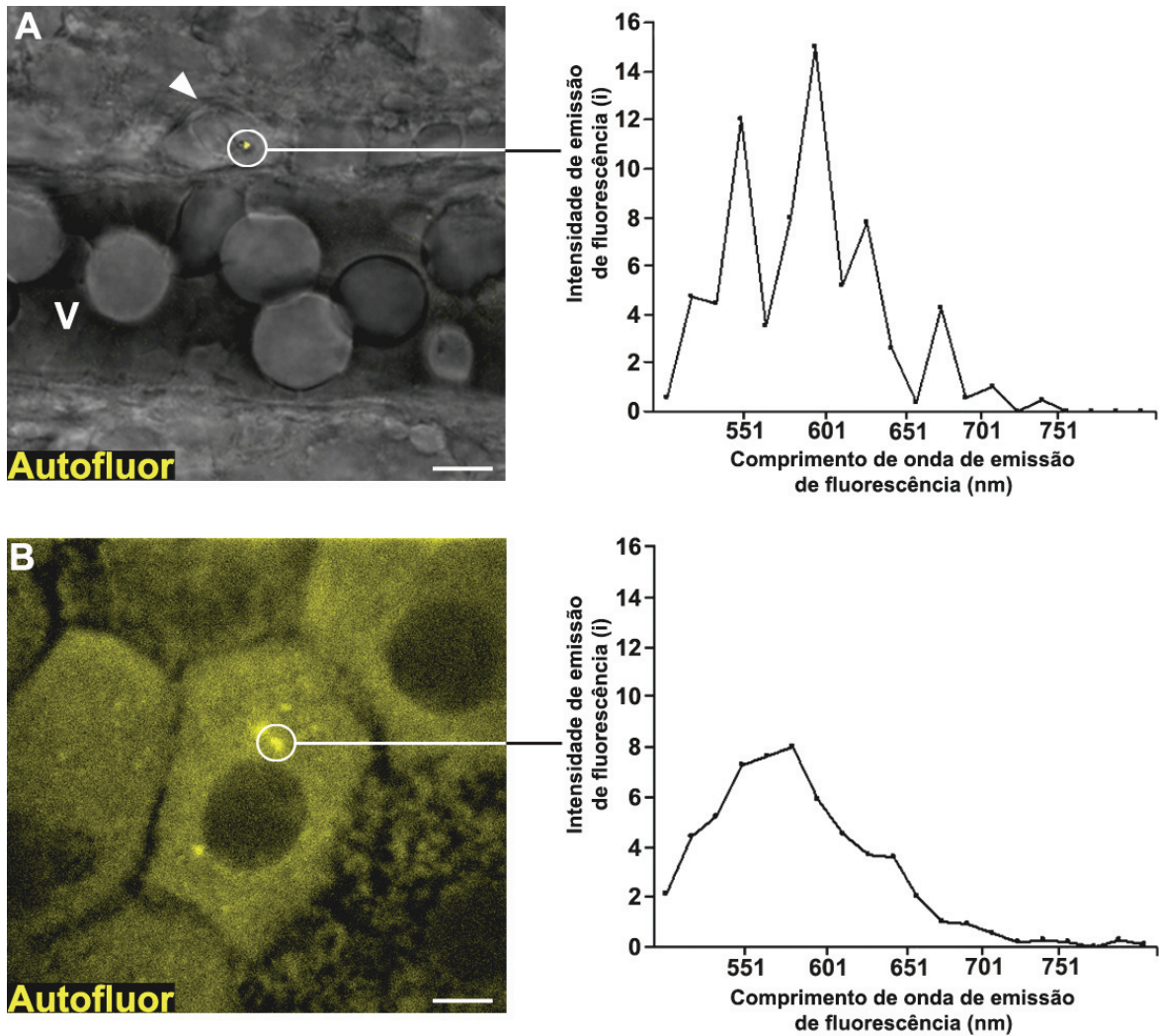
Recentemente, foi identificada, exclusivamente em retinas de murganhos velhos, uma população de microglíocitos perivasculares autofluorescentes devido ao seu conteúdo em lipofuscina (Xu *et al.*, 2008). Efectivamente, a acumulação intracelular de lipofuscina é um indicador de envelhecimento, uma vez que, com a idade, as células se tornam menos eficientes na degradação do material fagocitado (Sohal & Brunk, 1989) e a oxidação da lipofuscina produzida pela constante acção da luz solar é responsável pelo aparecimento da sua fluorescência característica (Kayatz *et al.*, 2001).

A fluorescência produzida pela lipofuscina é, no entanto, desvanecida pela acção dos solventes orgânicos (Feeney, 1978). Uma vez que a intensidade da autofluorescência das células Mato da retina se manteve após o tratamento com metanol a 70% e com éter etílico, os resultados obtidos mostraram ainda que a autofluorescência destas células retinianas não se devia à acumulação de lipofuscina, reforçando a hipótese de que, provavelmente, a autofluorescência das células Mato da retina resultava da presença de lipoproteínas oxidadas nos seus corpos de inclusão citoplasmáticos.

Uma vez que os lípidos oxidados e os grânulos de lipofuscina emitem fluorescência, por se tratar de substâncias com uma composição química diferente, a cada uma delas corresponde um *fingerprint* de intensidade de emissão de fluorescência específico. Para confirmar que a autofluorescência das células Mato da retina se devia à presença de lipoproteínas oxidadas e não de lipofuscina, a emissão de fluorescência das inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato retinianas e dos grânulos de lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina foram comparadas, após a respectiva determinação por meio da realização de varrimentos de  $\lambda$ , num microscópio de varrimento laser confocal, sobre 20 amostras.

A presença de lipofuscina em células da micróglia perivascular foi apenas descrita em animais velhos, com 18 meses de idade, e não em animais mais novos (Xu *et al.*, 2008). Os





**Figura 23.** MVLC. *Fingerprint* da intensidade de emissão de fluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato retinianas (A) e dos grânulos de lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina (B). Os *fingerprints* analisados são significativamente diferentes; a fluorescência emitida pelas inclusões citoplasmáticas das células Mato tem valores de intensidade mais elevados, sensivelmente o dobro, do observado para os grânulos de lipofuscina das células do epitélio pigmentar da retina; para além disso, a intensidade máxima de emissão de fluorescência da lipofuscina corresponde exactamente aos valores mais baixos da intensidade de emissão de fluorescência das células Mato. A intensidade da emissão de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias. Cabeça de seta, célula Mato; Autofluor, autofluorescência; V, vénula. Barras: 6  $\mu\text{m}$  (A) e 3  $\mu\text{m}$  (B).

murganhos utilizados neste trabalho experimental eram adultos com 6 meses de idade, demasiado novos, por conseguinte, para apresentarem os depósitos de lipofuscina referidos. Por esta razão, e de modo a poder comparar a emissão de fluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato retinianas com a da lipofuscina, recorreu-se à análise da lipofuscina presente nas células do epitélio pigmentar da retina.

O *fingerprint* obtido, correspondente à fluorescência emitida pelas inclusões citoplasmáticas das células Mato, era completamente diferente do *fingerprint* da fluorescência emitida pelos grânulos de lipofuscina (Figura 23). As inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato emitiram uma fluorescência amarelo-alaranjada, com uma intensidade máxima de 8-15 i, para valores de 530-630 nm, enquanto a lipofuscina emitiu uma fluorescência amarela menos intensa (5-8 i), com valores máximos no intervalo de 550-580 nm. Trata-se de uma diferença de valores que representa uma cor de fluorescência ligeiramente diferente com sensivelmente o dobro da intensidade de emissão de fluorescência das células Mato comparativamente aos grânulos de lipofuscina. Para além desta diferença de intensidade, também o perfil de emissão de fluorescência se revelou muito diferente, de tal forma que, os valores da máxima intensidade de emissão de fluorescência da lipofuscina corresponderam exactamente aos valores mais baixos da intensidade de emissão de fluorescência das inclusões citoplasmáticas das células Mato.

Estes resultados, no seu conjunto, confirmaram que a fluorescência emitida pelas células Mato retinianas não se devia à presença de lipofuscina e que, à semelhança das células Mato cerebrais, resultava da presença de lipoproteínas contendo lípidos oxidados na sua constituição.

### 2. LOCALIZAÇÃO E TOPOGRAFIA DAS CÉLULAS MATO DA RETINA

No sistema nervoso, as células Mato localizam-se no espaço perivascular (Virchow-Robin), delimitado pela membrana basal dos vasos sanguíneos e pela membrana glial formada pelos pés vasculares dos astrócitos (Mato & Ookawara, 1981). Na eventualidade de as células autofluorescentes em estudo constituírem um tipo celular equivalente a nível da retina, procedeu-se à caracterização da localização e topografia desta população celular que, por analogia com as células Mato cerebrais, se deveria encontrar igualmente a nível do espaço perivascular que, na retina, surge delimitado pela membrana basal dos vasos sanguíneos e pela membrana glial formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos.

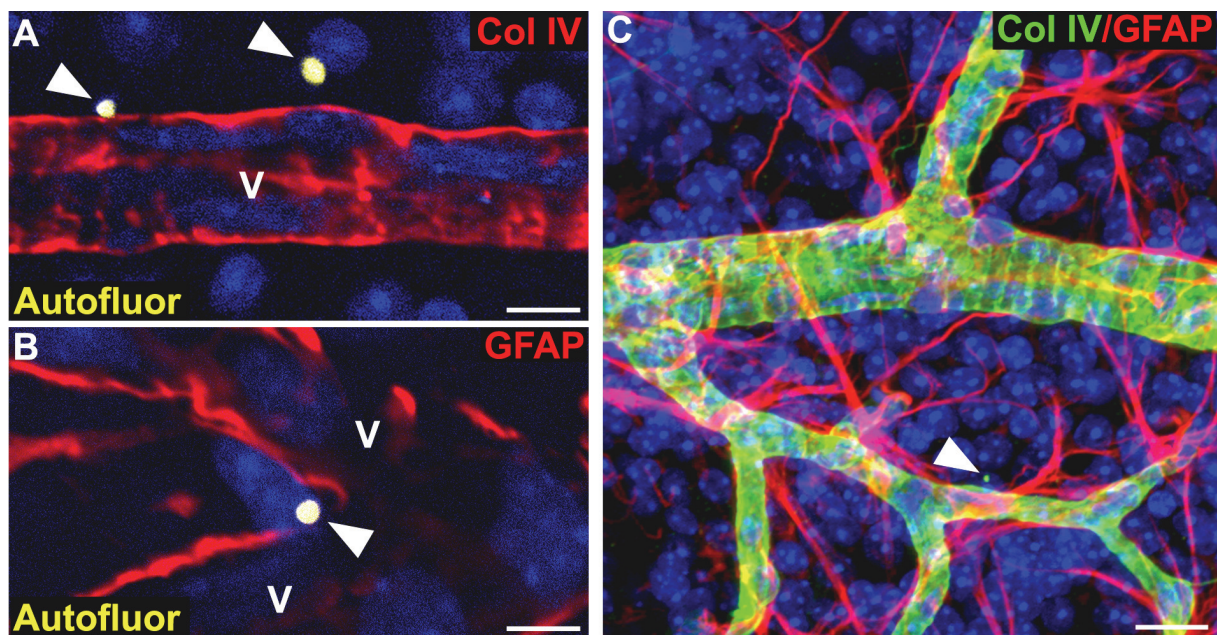
A marcação imunohistoquímica de retinas *in toto* com o anticorpo anti-colagénio IV, permitindo identificar especificamente a membrana basal dos vasos sanguíneos (Hashimzume & Ushiki, 2002), revelou que, como referido, as células Mato retinianas se encontravam nas camadas mais internas da retina, efectivamente, apostas à parede dos vasos sanguíneos, mas situando-se sempre externamente à membrana basal (Figura 24 A).

Este resultado, demonstrou que as células Mato da retina, embora mantivessem um contacto íntimo com a parede vascular, se situavam sempre externamente ao vaso sanguíneo, sugerindo, por conseguinte, a sua localização no espaço perivascular (Figura 24 A). Para além disso, este resultado excluiu ainda a possibilidade de estas células perivasculares autofluorescentes poderem ser classificadas como pericitos, uma vez que estes constituintes da parede vascular se encontram sempre completamente rodeados pela membrana basal (Hughes *et al.*, 2006).

A imunomarcação de retinas *in toto* com o anticorpo anti-GFAP (proteína glial fibrilar ácida, *glial fibrillary acidic protein*), um marcador dos filamentos intermediários presentes nas células da nevrógia (Eng, Ghirnikar & Lee, 2000), revelou que os pés vasculares destas células, ou seja, a membrana glial não separava as células Mato da parede vascular, uma vez que não se interpunha entre estas células autofluorescentes e a parede dos vasos sanguíneos (Figura 24 B). A membrana glial não é uma membrana contínua e, por esta razão, não providencia um revestimento contínuo à parede dos vasos sanguíneos. As células Mato foram encontradas em contacto directo com a membrana basal, precisamente nas áreas de descontinuidade da membrana glial e, por conseguinte, nas áreas da parede vascular onde o revestimento da membrana glial faltava (Figura 24 B e C).

As imagens de microscopia de varrimento laser confocal mostraram, porém, que a membrana glial revestia as células Mato na sua superfície abluminal, interpondo-se efectivamente entre estas e o parênquima retiniano (Figura 24 B).

No conjunto, estes resultados sugeriam que as células Mato retinianas se localizavam no espaço perivascular. A realização da imunomarcção dupla de retinas *in toto* com os anticorpos anti-colagénio IV e anti-GFAP, marcando em simultâneo a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, respectivamente, confirmou efectivamente a localização das células Mato da retina no espaço perivascular, ao longo da parede vascular dos vasos sanguíneos de maior calibre, à semelhança das células Mato cerebrais. As observações por meio de microscopia de varrimento laser confocal permitiram estabelecer a relação da superfície luminal das células Mato com a membrana basal dos vasos sanguíneos e da sua superfície abluminal com a membrana glial, formada pelos pés vasculares das células da nevrógia, astrócitos e células de Müller (Figura 24 C).



**Figura 24.** Localização e topografia das células Mato da retina. Retinas marcadas com os anticorpos anti-colagénio IV e anti-GFAP evidenciaram que as células Mato da retina se localizavam externamente à membrana basal dos vasos sanguíneos (A e C) e que os pés vasculares das células da nevrógia não as separavam da parede vascular (B e C). As células Mato surgiam exactamente em áreas da parede vascular em que faltava o revestimento da membrana glial (B e C), estando, desta forma, em contacto directo com a membrana basal. MVLC. Cabeças de seta, inclusões citoplasmáticas autofluorescentes; Autofluor, autofluorescência; V, vaso sanguíneo. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 8  $\mu$ m (A), 5  $\mu$ m (B) e 19  $\mu$ m (C).

O estabelecimento da localização perivascular das células Mato retinianas determinou a caracterização mais detalhada dos aspectos morfológicos e topográficos destas células por meio das técnicas de MET. Foi então iniciada uma segunda fase de estudo, com o objectivo de proceder à caracterização ultra-estrutural dos aspectos mais relevantes das células Mato da retina.

Para o efeito, foi processada uma retina de murganho de cada um dos grupos utilizados para as diferentes marcações imunohistoquímicas. Os fragmentos de tecido foram obtidos de três áreas da retina (central, intermédia e periférica) de forma a poder sistematizar as observações realizadas e, deste modo, poder relacioná-las com alguma área retiniana em particular. De cada bloco foram efectuados cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$ ) que se submeteram a uma coloração com azul de toluidina a 1%, com o propósito de seleccionar as áreas de retina a partir da qual se pudessem obter os cortes ultrafinos (60-80 nm) para montagem em grelhas de cobre de 200 *mesh*. O estudo por meio de MET confirmou a localização perivascular das células Mato da retina e permitiu conhecer mais detalhes da sua estrutura e topografia (Figura 25).

As células Mato foram encontradas em toda a extensão da retina, sempre contidas no espaço perivascular, situadas entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos (Figura 25), num espaço equivalente ao espaço perivascular (Virchow-Robin), onde se localizam as células Mato cerebrais (Mato & Ookawara, 1981).

As imagens de MET confirmaram que a membrana glial não se interpunha entre as células Mato e a parede vascular, ou seja, não estabelecia uma separação entre elas e os vasos sanguíneos. Efectivamente, as células Mato foram encontradas em contacto directo com a membrana basal dos vasos sanguíneos, nas áreas onde faltava o revestimento da membrana glial (Figura 25 A e B). As imagens de MET confirmaram ainda que as células Mato, contidas no espaço perivascular, eram efectivamente revestidas, na sua superfície abluminal, pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos (Figura 25 A e B).

No decurso da preparação dos tecidos para observação por meio de TEM, as amostras são submetidas a um processo de pós-fixação com tetróxido de ósmio. O tetróxido de ósmio liga-se aos lípidos e é responsável pela característica electrodensidade das lipoproteínas, resistentes ao efeito dos solventes orgânicos usados no protocolo de preparação das amostras (Bancroft & Gamble, 2002).

As células Mato da retina, à semelhança das células Mato cerebrais (Mato *et al.*, 1985 e 1998), quando observadas em MET, apresentavam no seu citoplasma corpos de inclusão electrodensos, devido ao seu conteúdo em lipoproteínas que, se oxidadas, são precisamente as responsáveis pela emissão da fluorescência característica destas células. As imagens de MET confirmaram também que os corpos de inclusão electrodensos eram lisossomas, à semelhança do descrito nas células Mato cerebrais, sendo que cada célula podia conter um número variável destas estruturas (Figura 25).

As células Mato, de forma alongada, de 15 a 17  $\mu\text{m}$  de comprimento, apresentavam longos prolongamentos citoplasmáticos que acompanhavam a parede dos vasos sanguíneos, um núcleo grande e oval, com uma distribuição periférica característica de heterocromatina, podendo observar-se no citoplasma da célula a presença de algumas mitocôndrias, ribossomas e retículo endoplasmático (Figura 25).

Porém, um dos aspectos, revelados pelas imagens de MET, que mais atenção despertou, dizia respeito à frequência com que as células Mato se dispunham ao longo da parede vascular. Efectivamente, a localização destas células no espaço perivascular não ocorria de forma aleatória. Pelo contrário, as células Mato surgiam, de forma sistemática, apostas a áreas da parede vascular em que esta apresentava uma redução significativa da sua espessura e que, para além disso, correspondiam sempre ao local de junção de duas células endoteliais, unidas entre si por zónulas de oclusão (Figura 25).

Em resumo, o conjunto destas observações revelou que as células Mato, efectivamente, surgiam situadas no espaço perivascular, colocadas entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial. No entanto a sua localização coincidia sempre com os seguintes aspectos estruturais da parede vascular: (1) áreas onde faltava o revestimento da membrana glial; (2) áreas de menor espessura da parede vascular; (3) presença de ligações zonulares interendoteliais. Para além disso, o facto de as células Mato da retina apresentarem no seu citoplasma lisossomas em número variável, contendo lipoproteínas no seu interior, sugeria ainda a existência de actividade fagocítica nestas células perivasculares de localização tão particular.

A Figura 26 mostra uma representação esquemática da localização e topografia das células Mato da retina, pondo em evidência algumas das suas particularidades mais relevantes.

**Figura 25.** MET e MEV. Localização e topografia das células Mato da retina. As imagens mostram as células Mato, de forma alongada, com inclusões citoplasmáticas perinucleares (cabeças de seta), situadas entre a membrana basal e a membrana glial, no espaço perivascular. Estas células apresentam longas expansões citoplasmáticas que acompanham a parede vascular. A sua localização é coincidente com áreas da parede vascular de menor espessura e onde as *zónulas de oclusão* ligam células endoteliais adjacentes. A, astrócito; CG, camada de células ganglionares; E, célula endotelial; EP, espaço perivascular; Er, eritrócito; M, célula muscular; MB, membrana basal; MG, membrana glial; Mt, célula Mato; Mu, célula de Müller; NE, camada nuclear externa; NI, camada nuclear interna; V, vaso; ZO, zónula de oclusão; seta, expansões citoplasmáticas da célula Mato; \*, célula perivascular. Barras: 1,2  $\mu\text{m}$  (A), 850 nm (B), 18  $\mu\text{m}$  (C) e 500 nm (D).



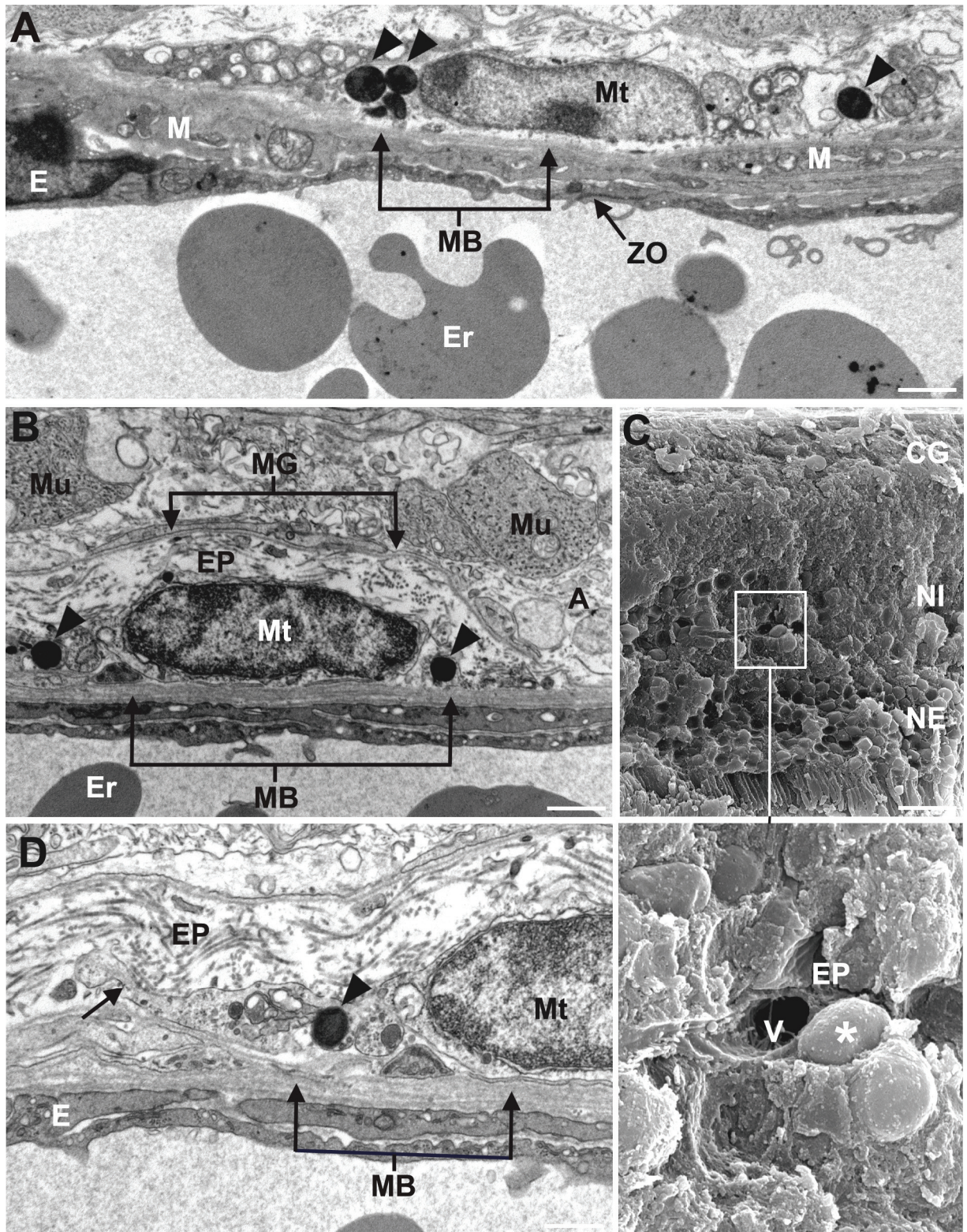
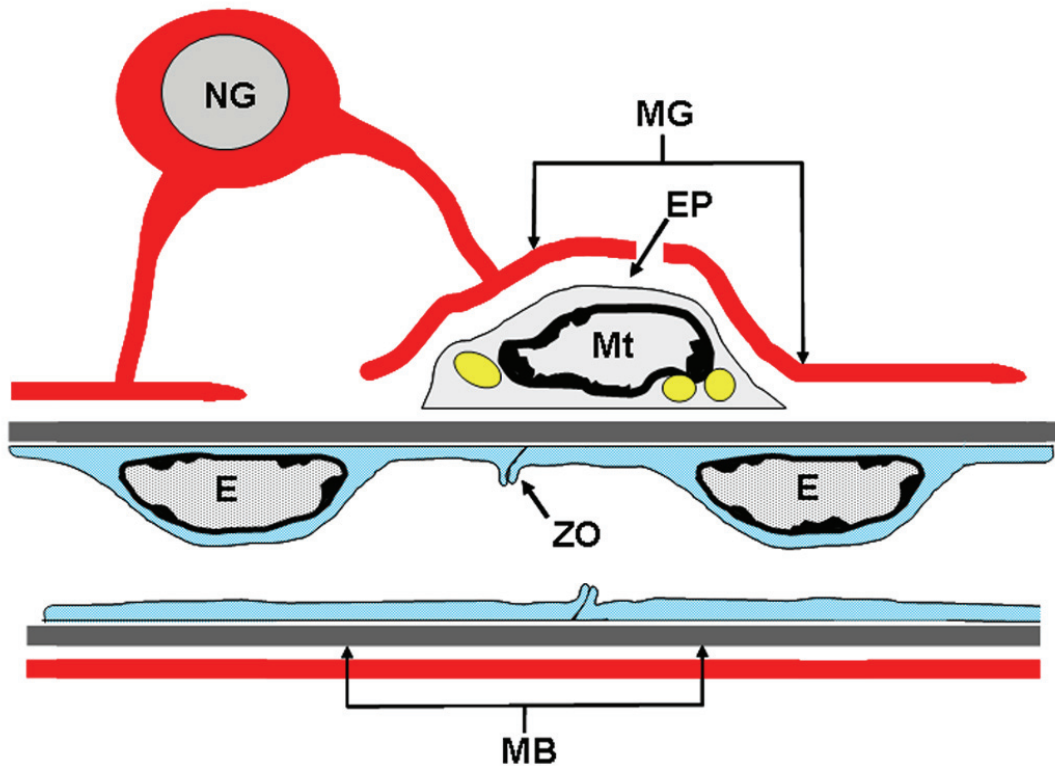


Figura 25. MET e MEV. Localização e topografia das células Mato da retina.





**Figura 26.** Representação esquemática da localização e topografia das células Mato na retina. As células Mato, com inclusões citoplasmáticas perinucleares fluorescentes, situam-se entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, no espaço perivascular, equivalente ao espaço perivascular cerebral (Virchow-Robin). A sua localização é coincidente com áreas da parede vascular de menor espessura e onde existem *zónulas de oclusão* unindo células endoteliais adjacentes. E, célula endotelial; EP, espaço perivascular; MB, membrana basal; MG, membrana glial; Mt, célula Mato; NG, célula da nevrógia; ZO, zónula de oclusão.

### 3. AS CÉLULAS MATO DA RETINA SÃO MACRÓFAGOS RESIDENTES DISTINTOS DAS CÉLULAS DA MICRÓGLIA

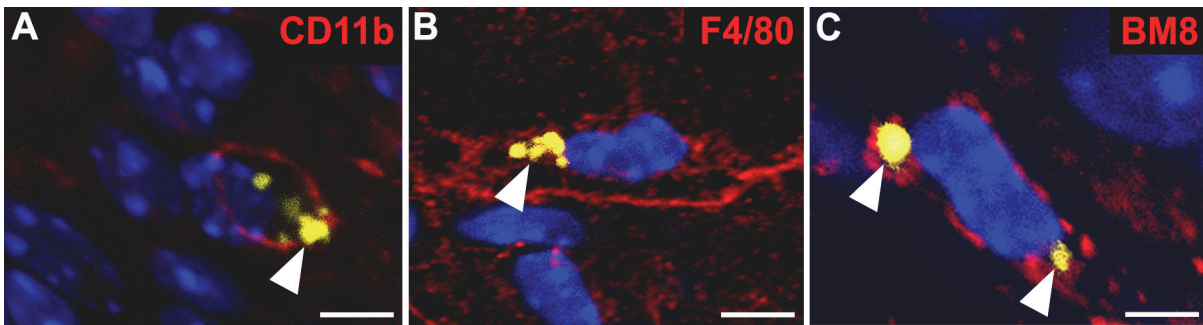
A presença constante das células Mato precisamente numa localização perivascular coincidente com (1) áreas mais “delgadas” da parede vascular, representando zonas do endotélio que eventualmente podiam oferecer menor resistência à passagem de elementos moleculares e celulares, (2) onde faltava o revestimento da membrana glial e, para além disso, coincidente também (3) com a presença de uniões zonulares interendoteliais, associada à possibilidade de estas células poderem exibir actividade fagocítica, em situação fisiológica, indicava, de alguma forma, uma determinada especificidade funcional relacionada com as particularidades estruturais do componente interno da BHR.

As células Mato cerebrais pertencem a uma população de macrófagos perivasculares residentes, distinta das células da micróglia, envolvidas efectivamente no funcionamento da barreira hemato-encefálica (Mato *et al.*, 1996 e 1997a). São células que se caracterizam por expressar, entre outros, os marcadores de macrófagos F4/80, clone CI:A3-I, CD11b e F4/80, clone BM8 (Mato *et al.*, 1996).

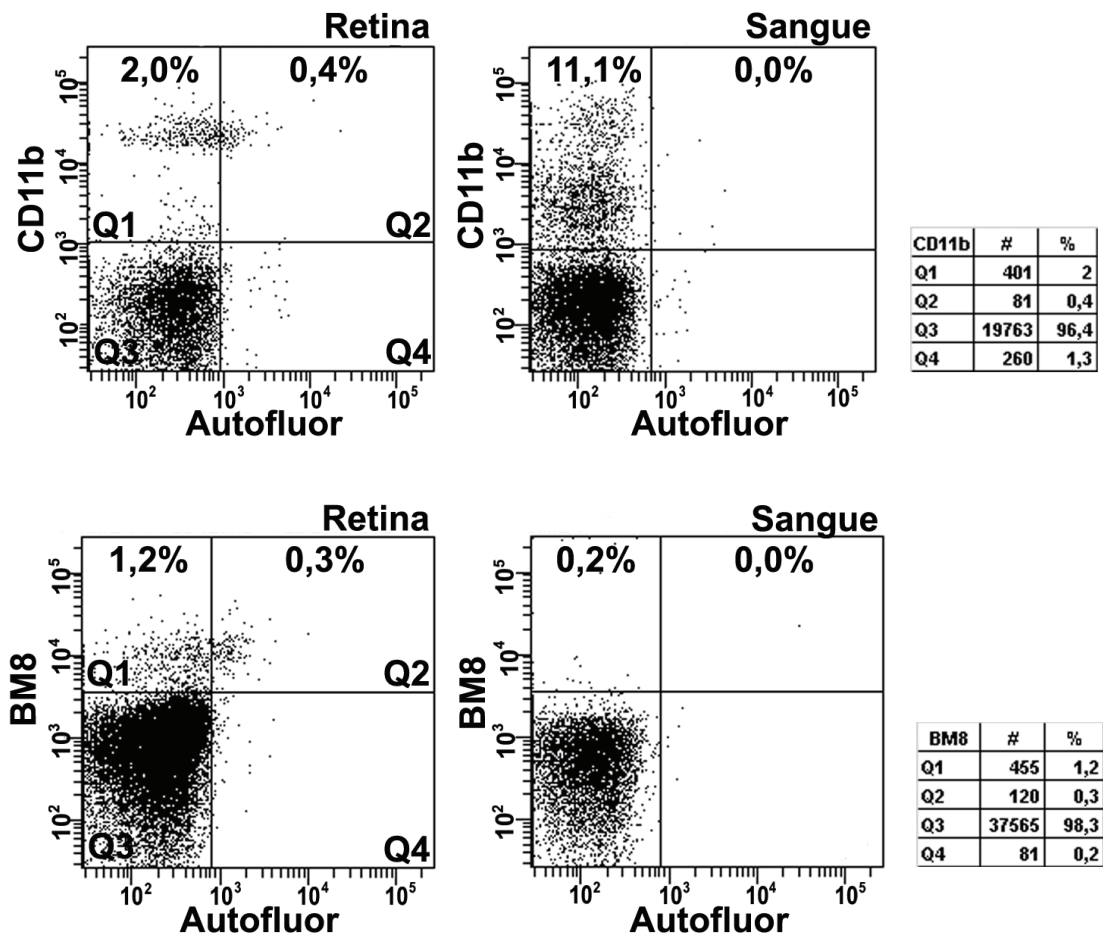
Para determinar se as células Mato da retina poderiam pertencer a uma população celular semelhante à das células Mato cerebrais, foi dado início à sua caracterização imunofenotípica. Para o efeito, foram analisadas retinas *in toto*, por meio das técnicas imunohistoquímicas, utilizando os mesmos marcadores macrofágicos referidos para a caracterização da população das células Mato cerebrais: F4/80, clone CI:A3-I, CD11b e F4/80, clone BM8.

A observação de retinas *in toto*, imunohistoquimicamente marcadas com os anticorpos anti-CD11b e F4/80, ambos marcadores de macrófagos de diversos tecidos, no murganho (Springer, Galfré, Secher & Milstein, 1979; Inoue, Plieth, Venkov, Xu & Nielson, 2005), revelaram a existência de um forte sinal positivo a nível da membrana citoplasmática das células Mato da retina, significando que estas células expressavam estes epitopos específicos dos macrófagos.

Este resultado permitiu classificar as células Mato da retina como um tipo de macrófagos perivasculares (Figura 27 A e B).



**Figura 27.** Fenótipo das células Mato da retina. Estas células são CD11b-positivas, F4/80-positivas e BM8-positivas, o que significa que as células Mato da retina pertencem a um tipo de macrófagos perivascularres distinto das células da micróglia perivascular. MVLC. As cabeças de seta assinalam as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 6  $\mu$ m (A), 8  $\mu$ m (B) e 5  $\mu$ m(C).



**Figura 28.** Citometria de fluxo. A análise por meio de citometria de fluxo permitiu identificar uma população de células retinianas CD11b-positivas autofluorescentes (0,4%) e uma população de células retinianas BM8-positivas autofluorescentes (0,3%). Nenhuma destas populações foi detectada no sangue. As tabelas à direita indicam o número de células (#) detectadas por retina em cada quadrante (Q) representado no gráfico e a respectiva percentagem relativamente ao total (%). A autofluorescência das células (Autofluor) foi detectada no canal FL2.

Na retina estão descritas células macrofágicas perivasculares, representadas pelas células da micróglia perivascular (Chen *et al.*, 2002). No entanto, em situação fisiológica, as células da micróglia não se encontram activadas, apresentando um aspecto ramificado característico e não contendo no seu citoplasma as inclusões citoplasmáticas observadas nas células Mato (Provis *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008).

O estudo de retinas *in toto* marcadas imunohistoquimicamente com o anticorpo anti-BM8 revelou claramente a existência de um forte sinal nas células Mato da retina, significando que estas células expressavam também este marcador (Figura 27 C), uma proteína de membrana periférica 125kD, específica de apenas alguns tipos de macrófagos residentes, mas que nunca se expressa nas células da micróglia (Kraal, Rep & Janse, 1987).

Este resultado permitiu concluir, portanto, que as células Mato da retina pertenciam a um subtipo de macrófagos perivasculares residentes diferente das células da micróglia.

As observações das retinas, por meio das diferentes técnicas de estudo realizadas, permitiam inferir que as células Mato representariam uma população celular perivascular não muito numerosa, apesar de estas células estarem presentes em toda a extensão das camadas mais internas da retina. Por conseguinte, procedeu-se, de seguida, à determinação do número aproximado de células Mato que, em situação fisiológica, se poderia encontrar em cada retina.

Com o objectivo de proceder à contagem do número de células Mato por retina, foram analisadas retinas *in toto*, por meio de microscopia de varrimento laser confocal, técnica que permite visualizar cada retina em toda a sua extensão. Num total de 20 retinas submetidas a análise, o número de células Mato encontradas foi em média de 80-120 por retina.

Estes valores são coincidentes com o número de células autofluorescentes CD11b e BM8-positivas detectadas por meio da técnica de citometria e fluxo (Figura 28).

Efectivamente, depois de conhecidos alguns dos marcadores de membrana específicos das células Mato retinianas, a citometria de fluxo representou uma das técnicas de estudo que permitiu continuar a caracterizar esta população de células autofluorescentes.

Foram analisados, por meio desta técnica, retinas e sangue periférico de 30 murganhos adultos com 6 meses de idade. A conjugação do sinal produzido pela autofluorescência emitida pelas inclusões citoplasmáticas das células Mato e pela fluorescência do fluorocromo FluoroLink™ Cy™5 conjugado aos marcadores CD11b e BM8, permitiu detectar a presença de populações celulares às quais estavam associados os marcadores em estudo.

A análise de retinas por meio de citometria de fluxo evidenciou a presença de uma população de células retinianas autofluorescentes CD11b, numa percentagem de aproximadamente 20% do total de células macrofágicas CD11b-positivas, correspondendo a um total de 81 células na análise da retina representada no gráfico da Figura 28.

Esta técnica permitiu igualmente identificar, na retina, uma população celular macrofágica autofluorescente BM8-positiva, distinta, portanto, das células da micróglia, e que correspondia a 25% do total de células retinianas BM8-positivas, correspondendo a um total de 120 células na análise da retina representada no gráfico da Figura 28.

Não foi possível encontrar qualquer uma destas populações autofluorescentes CD11b e BM8-positivas no sangue, confirmando, entre outros aspectos, que estas populações celulares representavam células macrofágicas residentes (Figura 28).

As células da micróglia são consideradas os *macrófagos residentes* da retina (Chen *et al.*, 2002). No entanto, o conjunto de resultados obtidos permitiu concluir que, para além das células da micróglia, existiam, na retina, outro tipo de macrófagos residentes, as células Mato da retina.

As células Mato retinianas constituíam uma população celular de um subtipo de macrófagos residentes perivasculares distinto, tendo em consideração, entre outros aspectos, a sua expressão antigénica, uma vez que expressavam o epitopo BM8, que nunca se expressa nas células da micróglia (Kraal, Rep & Janse, 1987).

#### 4. AS CÉLULAS MATO DA RETINA MOVIMENTAM-SE AO LONGO DOS VASOS SANGUÍNEOS

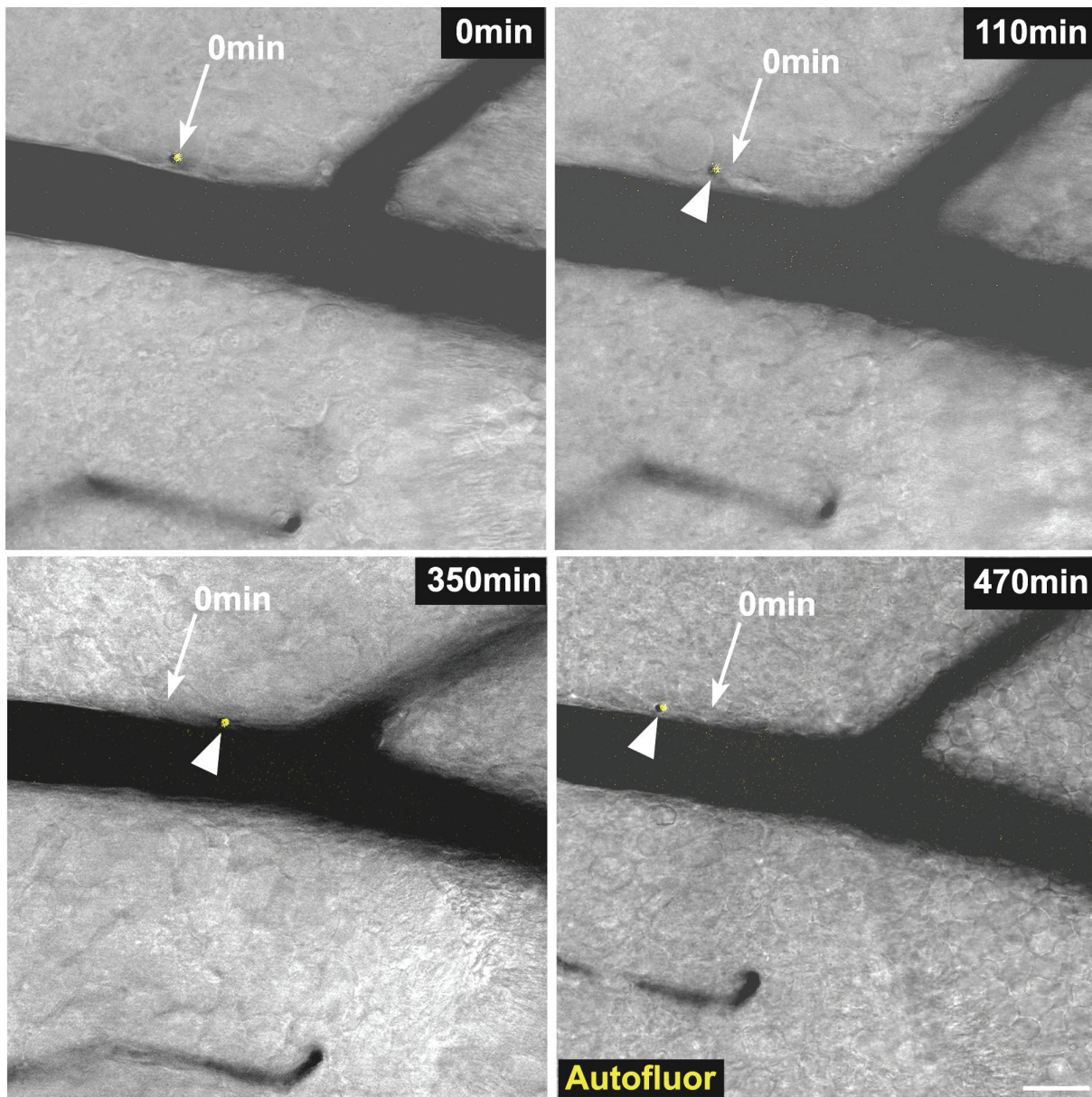
Existem, no sistema nervoso, células perivasculares com a capacidade de migrar ao longo dos vasos sanguíneos, quando activadas (Grossmann, Stence, Carr, Fuller, Waite & Dailey, 2002). Atendendo ao facto de as células Mato retinianas constituírem uma população de células macrofágicas com aparente actividade fagocítica, em condições fisiológicas, por oposição às células da micróglia, que nessas condições se mantêm num estado não activado, foi avaliado o seu comportamento cinético, no sentido de averiguar se as células Mato mantinham a sua localização perivascular, ou se, pelo contrário, migravam para outra área retiniana.

Para o efeito, foram submetidas a estudo retinas de murganho em cultura num meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com soro fetal de bovino a 10%, penicilina e estreptomicina e 2 mM de glutamina. As retinas em cultura foram mantidas numa câmara do microscópio com atmosfera húmida de CO<sub>2</sub>/ar (5% / 95%) a 37°C. Foram captadas imagens, a intervalos de tempo de 15 minutos, durante 12 horas, por meio de microscopia de varrimento laser confocal. Neste ensaio foram utilizadas retinas de dois murganhos. As células Mato foram identificadas pela autofluorescência característica dos seus corpos de inclusão quando excitadas com o laser de 488 nm. A repleção vascular com tinta da China com 5% de gelatina, previamente à enucleação dos bulbos oculares, permitiu identificar os vasos sanguíneos retinianos no modo de transmissão do microscópio.

A sequência de imagens captadas mostrou que, em condições fisiológicas, as células Mato da retina tinham a capacidade de se movimentar no espaço perivascular, ao longo da parede dos vasos sanguíneos, apresentando, no entanto, um movimento oscilatório. Especificamente, estas células movimentavam-se ao longo da superfície externa dos vasos sanguíneos, percorrendo uma distância de aproximadamente 30-35 µm, a uma velocidade média de 15 µm/h (Figura 29).

A particularidade de as células Mato se movimentarem no espaço perivascular, de forma oscilatória, percorrendo a área circundante das zonas mais frágeis da parede vascular com as quais se relacionavam, correspondia a um alargamento considerável da área da parede vascular sobre a qual estas células poderiam actuar, representando uma repercussão mais significativa da interacção destas células com a BHR.





**Figura 29.** Comportamento cinético das células Mato da retina. A sequência de imagens de retinas em cultura mostrou que as células Mato se movimentavam ao longo da superfície externa da parede vascular, num movimento oscilatório, “varrendo” a área envolvente das zonas mais “frágeis” da BHR com as quais se relacionavam. MVLC. A autofluorescência (cabeça de seta) foi usada para identificar as células Mato. Os vasos sanguíneos injectados com tinta da China com 5% de gelatina foram visualizados no modo de transmissão. Autofluor, autofluorescência. Barra: 18  $\mu$ m.

## **5. AS CÉLULAS MATO DA RETINA PROVIDENCIAM UM REVESTIMENTO ADICIONAL À PAREDE VASCULAR NAS ÁREAS DE MENOR DENSIDADE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA BASAL**

O estudo de retinas de murganho *in toto* por meio de microscopia de varrimento laser confocal revelou que, à semelhança do observado na membrana basal das vénulas cremastéricas de murganho, em situação fisiológica (Wang *et al.*, 2006), as vénulas da retina apresentavam áreas de menor densidade da membrana basal causadas por uma baixa expressão de colagénio IV.

As áreas de baixa expressão de colagénio IV, na membrana basal da parede das vénulas cremastéricas, estão associadas a uma baixa expressão de outras proteínas da membrana basal, conduzindo, no conjunto, ao aparecimento de redes de proteínas de malhas alargadas que definem “fendas”, na estrutura da membrana basal, por onde podem passar livremente substâncias em circulação na corrente sanguínea. Em resposta a estímulos inflamatórios, num efeito dependente da presença de neutrófilos, estas malhas alargam ainda mais, criando vias preferenciais de passagem trans-endotelial de leucócitos e de outras substâncias (Wang *et al.*, 2006).

A membrana basal da parede vascular das vénulas retinianas, marcadas imunohistoquimicamente com o anticorpo anti-colagénio IV, não apresentava uma intensidade de emissão de fluorescência uniforme. Na membrana basal destes vasos sanguíneos era visível a presença de áreas que apresentavam uma diminuição acentuada de sinal (intensidade de emissão de fluorescência) da periferia para o centro, correspondendo a áreas de menor expressão de colagénio IV (Figura 30 A).

Em microscopia de varrimento laser confocal, a captação de imagens pode ser efectuada por meio da realização de um perfil de intensidade de emissão de fluorescência. Neste modo de captação de imagem, a diferentes valores de intensidade de emissão de fluorescência de uma substância corresponde um tom ou uma cor, de uma escala previamente definida, em que a intensidade da emissão de fluorescência é expressa em unidades arbitrárias. Deste modo, são mais facilmente percebidas quaisquer alterações na intensidade de emissão de fluorescência da substância em estudo.

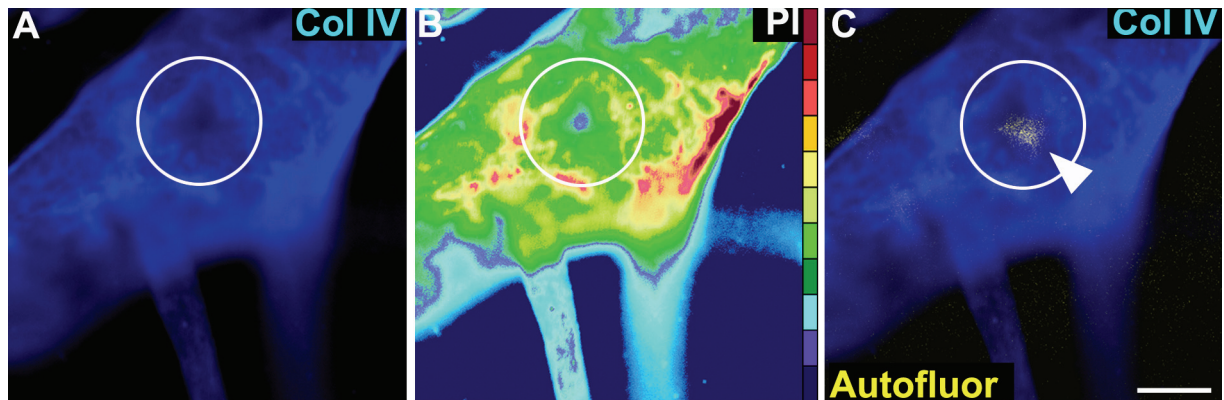


Para avaliar a diferença de intensidade de emissão de fluorescência nas retinas marcadas com o anticorpo anti-colagénio IV, procedeu-se à captação de imagens por meio da realização de um perfil de intensidade de emissão de fluorescência. Neste caso, atribuiu-se uma sequência de cores (azul, verde, amarelo, rosa e castanho) a um intervalo de valores de intensidade de emissão de fluorescência crescente, em que os valores mais baixos correspondiam ao azul e os mais elevados ao castanho.

O perfil de intensidade de emissão de fluorescência correspondente às áreas da parede vascular que apresentavam uma diminuição de sinal de emissão de fluorescência do fluorocromo ligado ao anticorpo anti-colagénio IV (Figura 30 A) confirmou que, na membrana basal da parede vascular, existiam áreas que apresentavam uma diminuição acentuada de intensidade de emissão de fluorescência (Figura 30 B). Na periferia dessas áreas, podiam observar-se zonas de coloração castanha, rosa e amarela, correspondendo a valores de intensidade de emissão de fluorescência mais elevados. À medida que se aproximava do centro, a cor mudava para tons de verde, cada vez mais escuro, acabando por se transformar num tom azul turquesa, indicando uma diminuição gradual da intensidade de emissão de fluorescência da periferia para o centro. Na região central, a cor mudava para tons de azul escuro, representando valores mínimos de intensidade de emissão de fluorescência nessa área da membrana basal (Figura 30 B).

As células Mato da retina foram observadas precisamente justapostas a essas áreas da membrana basal dos vasos sanguíneos que apresentavam baixa intensidade de emissão de fluorescência e, por conseguinte, baixa densidade de expressão de colagénio IV (Figura 30C).

Estes resultados, em conjunto com as observações anteriores, permitiram concluir que as células Mato da retina constituíam um subtipo de macrófagos residentes perivascularares que se movimentavam de forma oscilatória sobre zonas da parede vascular que apresentavam não só uma diminuição significativa da sua espessura e onde faltava o revestimento da membrana glial, mas onde, simultaneamente, podia existir uma menor densidade de proteínas constituintes da membrana basal.



**Figura 30.** Áreas de baixa expressão de proteínas da membrana basal. A imunomarcção com o anticorpo anti-colagénio IV (Col IV) revelou que as células Mato (cabeça de seta) se localizavam apostas a áreas da parede vascular com uma baixa expressão desta proteína (círculo). O perfil de intensidade de emissão de fluorescência correspondente (PI) confirmou a existência de áreas de baixa expressão de colagénio IV (roxo). A escala de cores de intensidade de emissão de fluorescência é apresentada como referência. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Cabeça de seta, inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Barra: 5,5  $\mu\text{m}$ .

Devido ao facto de estas áreas poderem representar zonas da BHR de maior “fragilidade” estrutural e, portanto, mais facilmente transponíveis por elementos moleculares ou celulares provenientes da corrente sanguínea, a presença das células Mato, justamente nessa localização, representaria um importante reforço estrutural da BHR, providenciando um revestimento adicional a estas zonas da parede vascular e, por conseguinte, aumentando a eficiência da BHR na sua capacidade de exclusão de substâncias ou moléculas de natureza diversa do parênquima retiniano, em condições fisiológicas.

### 6. AS CÉLULAS MATO DA RETINA EXPRESSAM RECEPTORES SCAVENGER DA CLASSE A EM SITUAÇÃO FISIOLÓGICA

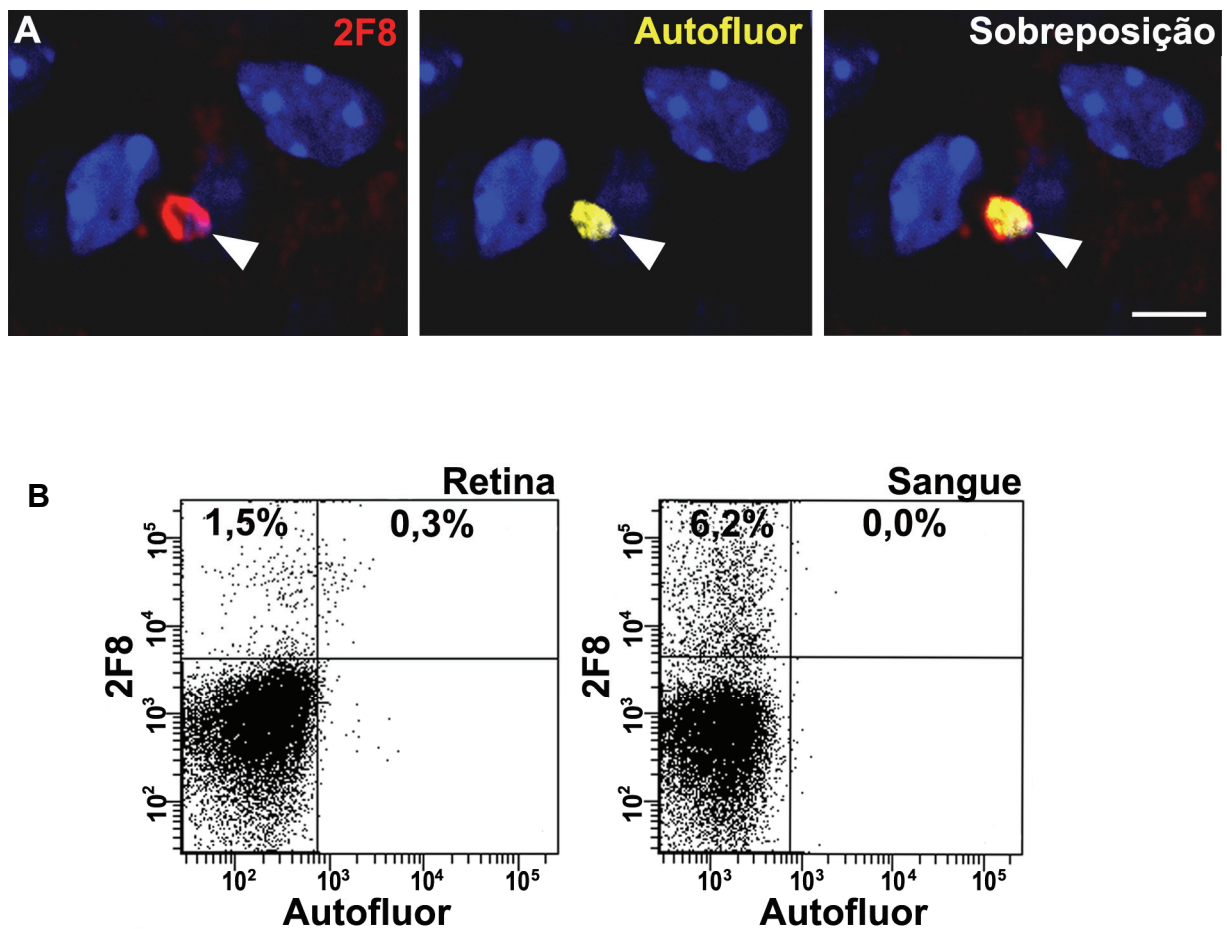
Em situação fisiológica, os receptores *scavenger* da classe A (RS-A) são expressos, na sua grande maioria, pelas células Mato cerebrais (Mato *et al.*, 1996; Husemann, Loike, Anankov, Febraio & Silverstein, 2002). Devido à sua notável capacidade para captar e acumular determinadas macromoléculas e detritos celulares, as células Mato são consideradas as células *scavenger* do sistema nervoso (Mato, Ookawara, Sano & Kurihara, 1982; Mato *et al.*, 1996 e 1997a; Williams *et al.*, 2001).

A presença de células Mato retinianas justamente em áreas mais “frágeis” da BHR e, portanto, mais facilmente transponíveis por substâncias em circulação na corrente sanguínea, não sugeria apenas um envolvimento destas células no reforço estrutural desta barreira. Na eventualidade de as células Mato retinianas expressarem também RS-A, podendo funcionar, por conseguinte, como células *scavenger* na retina, em situação fisiológica, estas células poderiam contribuir também para o funcionamento da BHR, especificamente na exclusão de determinadas substâncias do parênquima retiniano.

Para determinar se as células Mato da retina expressavam este tipo de receptores *scavenger*, procedeu-se à marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD204, clone 2F8, um marcador específico para RS-A (Fraser, Hughes & Gordon, 1993). Estes receptores *scavenger* funcionam como receptores de endocitose para proteínas e lipoproteínas, como receptores de adesão dos macrófagos a substratos ricos nos ligandos específicos e na ligação a bactérias patogénicas, estando também envolvidos na resposta imunitária inata (Fraser, Hughes & Gordon, 1993).

O estudo de retinas *in toto* imunohistoquimicamente marcadas com o anticorpo 2F8, revelou que as células Mato da retina expressavam RS-A. Estes receptores foram observados na periferia das inclusões citoplasmáticas autofluorescentes, indicando que se localizavam na membrana destes lisossomas (Figura 31 A). Este resultado sugeria, por conseguinte, que as células Mato tinham captado lipoproteínas por um processo de endocitose, mediado pelos RS-A.

O conhecimento de mais um marcador das células Mato da retina permitiu recorrer, uma vez mais, à citometria de fluxo, no sentido de complementar a caracterização desta população celular.



**Figura 31.** Receptores *scavenger*. A: a marcação imunohistoquímica com o anticorpo 2F8 revelou a presença de RS-A na periferia das inclusões citoplasmáticas autofluorescentes das células Mato da retina. B: a citometria de fluxo revelou a existência de uma população de células autofluorescentes 2F8-positiva na retina. Esta população de células não foi detectada no sangue. A autofluorescência das células (Autofluor) foi detectada no canal FL2. MVLC. As cabeças de seta assinalam as inclusões citoplasmáticas autofluorescentes. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 9  $\mu$ m.

A análise por meio de citometria de fluxo confirmou, efectivamente, a presença de uma população de células autofluorescentes 2F8-positiva na retina. A percentagem destas células correspondia a aproximadamente 20% de um total de células retinianas 2F8-positivas. Como esperado, no sangue não se encontrou esta população celular (Figura 31 B).

## RESULTADOS

---

Estes resultados foram coincidentes com os obtidos anteriormente, aquando da caracterização da população de células Mato por meio de citometria de fluxo. A percentagem de células autofluorescentes BM8-positivas detectadas (0,3 %) foi semelhante à das células autofluorescentes 2F8-positivas (0,3 %), provavelmente por se tratar da mesma população celular.

As células da micróglia não expressam RS-A em condições fisiológicas (Mato *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1998; Husemann *et al.*, 2002). Pelo contrário, as células da micróglia apenas expressam receptores *scavenger* quando activadas, na sequência de determinado estímulo lesivo (Gehrmann *et al.*, 1993; Husemann *et al.*; 2002, Lewis, Sethi, Carter, Charteris & Fisher, 2005).

Estes resultados mostraram que as células Mato retinianas constituíam um tipo de macrófagos residentes perivasculares com função *scavenger*, em condições fisiológicas, e que, portanto, também neste aspecto, constituíam uma população celular distinta das células da micróglia.

O facto de as células Mato constituírem as únicas células perivasculares com função *scavenger*, em condições fisiológicas, sugeria um papel de maior importância no funcionamento da BHR, e portanto, na manutenção da homeostasia da retina. Efectivamente, a particular localização das células Mato não só constituía um reforço estrutural, providenciando um revestimento adicional a áreas mais frágeis, e portanto, mais facilmente transponíveis da BHR, como também representava um reforço funcional desta barreira. A presença de células com função *scavenger* no espaço perivascular poderia significar uma nova possibilidade de excluir do parênquima retiniano qualquer substância lesiva que de alguma forma tivesse conseguido ultrapassar a BHR.

## 7. AS CÉLULAS MATO DA RETINA ACUMULAM MACROMOLÉCULAS EM CIRCULAÇÃO NA CORRENTE SANGUÍNEA SEM ROTURA DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA

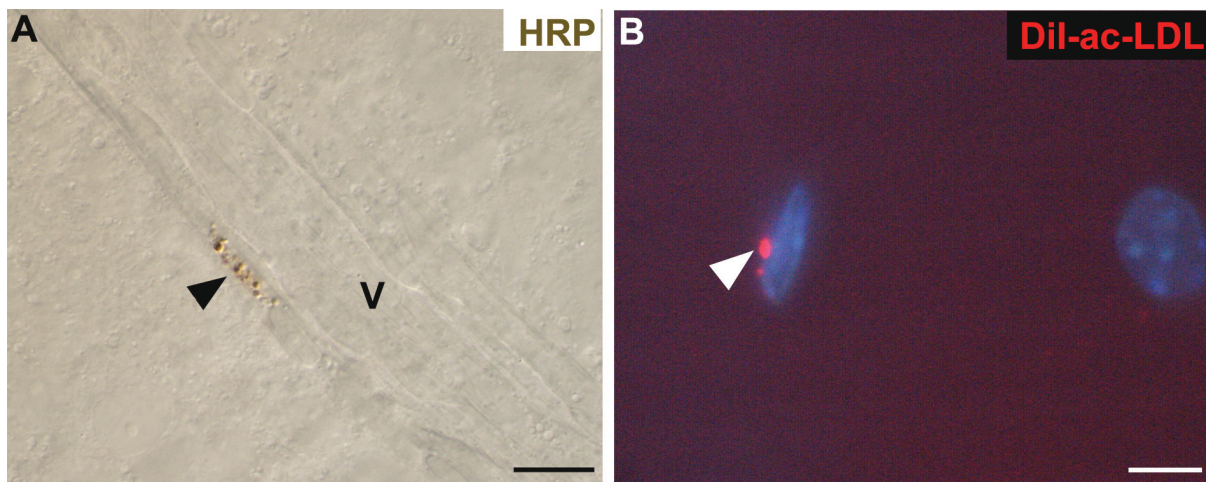
As células Mato cerebrais, as células *scavenger* do sistema nervoso, captam e acumulam proteínas e lípidos em condições fisiológicas e são as únicas onde se acumula a enzima HRP, quando administrada experimentalmente nos ventrículos cerebrais (Mato *et al.*, 1986a, 1996 e 1999).

Para avaliar a função *scavenger* das células Mato da retina e, por conseguinte, o seu envolvimento na exclusão de substâncias proteicas do parênquima retiniano que, em condições de integridade da BHR, eventualmente consigam atingir a retina, injectou-se, por via endovenosa, HRP em murganhos saudáveis.

A enzima HRP é uma enzima frequentemente usada em estudos de integridade da BHR e da barreira hemato-encefálica como substância traçadora. A passagem desta substância para o parênquima retiniano ou cerebral, respectivamente, ocorre apenas em áreas de rotura destas barreiras (Caldwell & McLaughlin, 1983; Viores, 1995; Bamforth, Lightman & Greenwood, 1997). Nos murganhos utilizados neste estudo, por serem saudáveis, e portanto, detentores de retinas em condições de integridade da BHR, não se esperava que ocorresse passagem desta substância traçadora para o parênquima retiniano.

Seis horas após a injeção de 15 mg/ml de HRP na veia da cauda, os animais foram eutanasiados e as retinas foram extraídas. Depois de aplanadas e fixadas, a detecção desta substância traçadora no parênquima retiniano foi efectuada através da revelação com DAB, reacção que produz o aparecimento de grânulos de coloração acastanhada na presença de HRP.

Como previsto, não se encontrou HRP no parênquima retiniano, mesmo tendo administrado uma dose três vezes superior à normalmente utilizada em estudos de integridade da BHR (Hikishima & Mato, 1990). Contudo, foram observadas umas células perivasculares, cuja distribuição e topografia eram compatíveis com as das células Mato da retina, que apresentavam múltiplas inclusões de HRP de coloração acastanhada no seu citoplasma (Figura 32 A).



**Figura 32.** As células Mato da retina acumulam proteínas. A: seis horas após a injeção endovenosa de HRP, a revelação com DAB não detectou a saída de HRP para o parênquima retiniano, indicando que não há rotura da BHR. Contudo, foi detectada a presença de grânulos acastanhados de HRP no citoplasma de células perivasculares com distribuição e topografia compatíveis com as das células Mato (cabeça de seta). B: duas horas após a injeção endovenosa de Dil-ac-LDL, observou-se a presença de grânulos fluorescentes vermelhos (cabeça de seta) no citoplasma de células perivasculares com distribuição e topografia compatíveis com as das células Mato. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). V, vaso sanguíneo. Barras: 9  $\mu\text{m}$  (A) e 7  $\mu\text{m}$  (B).

Para determinar se as células Mato da retina acumulavam lipoproteínas de baixa densidade modificadas em circulação, como ocorre nas células Mato cerebrais, munidas de RS-A, ao qual se ligam especificamente (Mato *et al.*, 1996), injectou-se Dil-ac-LDL por via endovenosa em murganhos saudáveis. O complexo Dil-ac-LDL liga-se especificamente aos RS-A dos macrófagos. A emissão de fluorescência característica da Dil de 571 nm para valores máximos de absorção de 554 nm, permite visualizar a localização deste complexo.

Duas horas após a injeção, a característica fluorescência vermelha do Dil foi observada em inclusões citoplasmáticas de aspecto granular de células perivasculares, cuja distribuição e topografia eram compatíveis com as das células Mato da retina (Figura 32 B).

Estes resultados sugeriam que, em retinas saudáveis, sem rotura da BHR, podia ocorrer a passagem de determinadas substâncias em circulação do sangue para a retina. Contudo, as células Mato revelaram a capacidade de captar e acumular essas macromoléculas em circulação, impedindo a sua passagem para a retina. A acumulação destas moléculas nas células Mato sugeria que a exocitose destas substâncias tinha sido mínima ou mesmo nula, razão pela qual não se encontrou HRP ou Dil-ac-LDL no parênquima retiniano.

A participação destas células perivasculares com função *scavenger*, em condições fisiológicas, na exclusão de substâncias proteicas em circulação do parênquima retiniano, impedindo a sua passagem para a retina, após terem conseguido passar através da BHR, permite considerar as células Mato como um elemento adicional de reforço estrutural e funcional desta barreira, desempenhando um papel da maior relevância na manutenção da homeostasia a nível retiniano.

O facto da rotura da BHR constituir uma característica de um grande número de retinopatias, conduzindo ao aparecimento de edema a nível retiniano, em grande parte responsável pela perda de visão, associado à íntima relação das células Mato com esta barreira, indicia igualmente um possível envolvimento destas células macrofágicas perivasculares na patogenia dessas afecções.



### 8. AS CÉLULAS MATO DA RETINA ACUMULAM FERRO

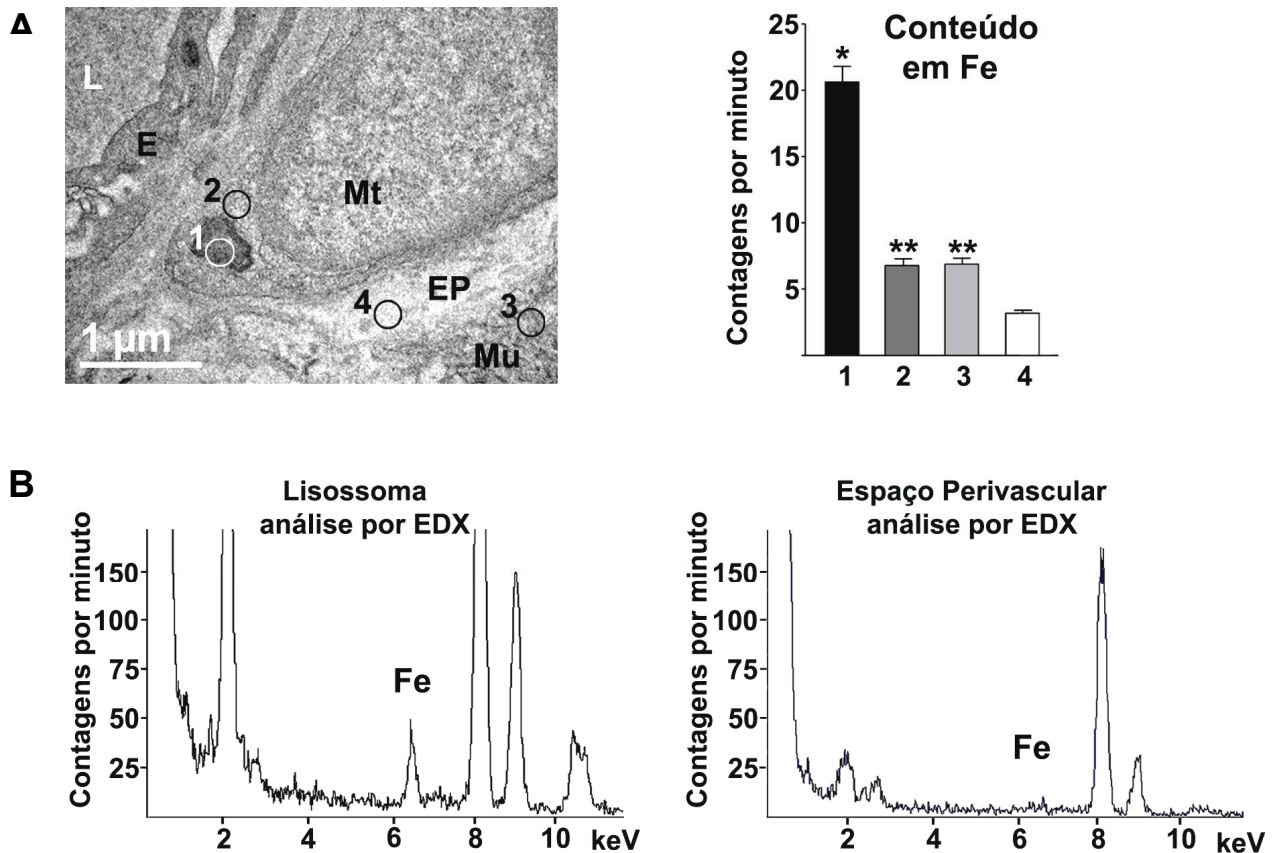
À semelhança de outros tecidos, a retina obtém ferro a partir da corrente sanguínea (Yefimova *et al.*, 2000). De uma forma geral, o aporte de ferro ocorre por um processo de endocitose, mediado por receptores da transferrina, a nível quer das células endoteliais retinianas quer das células do epitélio pigmentar da retina (Hunt, Dewey & Davis, 1989; Burdo, Antonetti, Wolper & Connor, 2003). Na retina, o ferro ligado à transferrina pode então ser endocitado ao longo das diferentes camadas retinianas (Yefimova *et al.*, 2000).

Nesse processo de endocitose, as moléculas de transferrina, moléculas transportadoras de ferro, unem-se ao seu receptor de membrana e são endocitadas por meio da formação de uma vesícula de endocitose. A vesícula endocítica funde-se com um lisossoma primário e a transferrina liberta o ferro por meio da acidificação do pH. O ferro é então transportado para o citosol, onde fica disponível para o metabolismo celular. O endossoma regressa novamente à membrana citoplasmática, onde a transferrina fica disponível para se ligar a novas moléculas de ferro (Kurz, Terman, Gustafsson & Brunk, 2008).

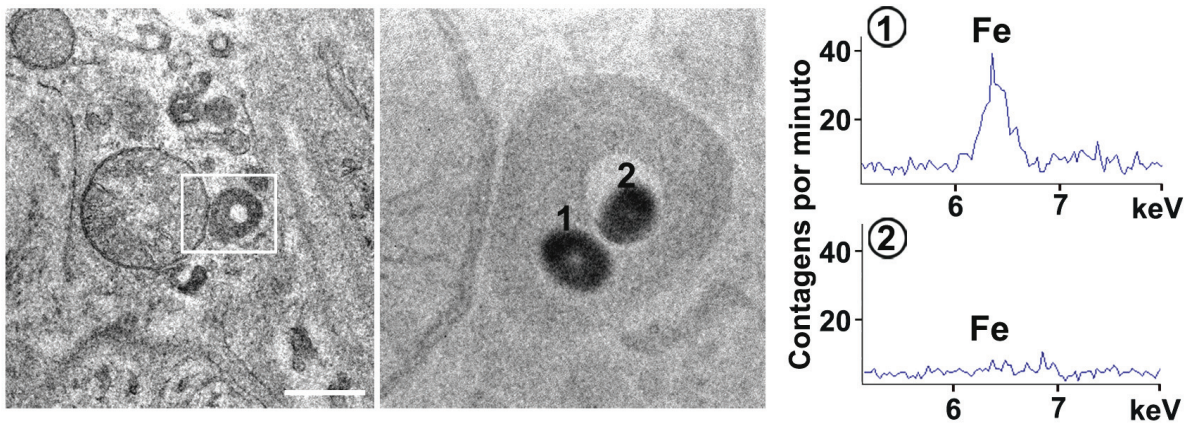
Os macrófagos actuam como grandes depósitos de ferro no organismo (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). No entanto, o papel dos macrófagos da retina no metabolismo do ferro não é conhecido. De forma a determinar se as células Mato da retina desempenhavam algum papel no metabolismo do ferro, o conteúdo deste elemento foi determinado por meio de microanálise por energia dispersiva por radiação-X (EDX), usando cortes ultrafinos de retina, não contrastados, para microscopia electrónica de transmissão.

A microanálise por EDX revelou que o conteúdo em ferro citosólico nas células Mato e nas células de Müller era semelhante. No entanto, os lisossomas das células Mato da retina acumulavam uma quantidade de ferro muito significativa, comparativamente à do ferro citosólico das células e aos níveis basais que se encontravam no espaço extracelular perivascular (Figura 33).

A microanálise por EDX revelou também a presença de vesículas de endocitose nas células Mato, onde o ferro se localizava à periferia, sugerindo que a transferrina, contendo o ferro, se encontrava ainda ligada ao seu receptor de membrana (Figura 34).



**Figura 33.** Conteúdo em ferro. A: a microanálise por EDX revelou que nos lisossomas das células Mato (1) se encontrava uma quantidade de ferro significativamente superior à dos citoplasmas das células Mato (2) e de Müller (3). Nestes, a quantidade de ferro era semelhante, mas ainda assim, significativamente maior do que a detectada no espaço extracelular perivascular (4). Os resultados foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão de 9 quantificações, nos quatro tipos de estruturas analisadas; \* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,0001$ . B: quantificação do conteúdo em ferro no lisossoma da célula Mato e no espaço perivascular por meio de microanálise por EDX. Apesar da quantidade de ferro acumulada nos lisossomas das células Mato, os níveis de ferro no espaço extracelular perivascular mantinham-se em valores basais. L, lúmen; E, célula endotelial; Mt, célula Mato; EP, espaço perivascular; Mu, célula de Müller.



**Figura 34.** Vesículas de endocitose nas células Mato da retina. A microanálise por EDX revelou que, nas vesículas de endocitose, o ferro se localizava na periferia das mesmas, sugerindo que a proteína transportadora do ferro, transferrina, se encontrava ainda ligada ao seu receptor de membrana. As imagens mostram a selecção das estruturas analisadas e os pontos de incidência do feixe de radiação da microanálise por EDX: 1, ponto de incidência da radiação, na periferia da vesícula de endocitose; 2, ponto de incidência da radiação, no centro da vesícula de endocitose. Barra: 570 nm.

Estes resultados sugeriam que as moléculas transportadoras de ferro, transferrina, tinham sido endocitadas pelas células Mato retinianas e ainda que, a nível dos lisossomas destas células, se tinha processado a degradação de compostos ricos em ferro.

Porém, o ferro endocitado foi observado acumulando-se em grandes quantidades nos lisossomas, não tendo sido transportado para o citoplasma da célula, como esperado. O mecanismo de endocitose de transferrina supracitado não permitia, portanto, explicar a inusitada acumulação de ferro observada nos lisossomas das células Mato.

Embora o transporte mediado pela transferrina seja considerado o principal mecanismo de aporte de ferro às células, recentemente, a ferritina, considerada tradicionalmente exclusivamente como uma proteína de armazenagem intracelular de ferro, foi proposta como uma nova proteína transportadora deste elemento (Fisher *et al.*, 2007).

A ferritina é um constituinte normal do plasma sanguíneo (Addison *et al.*, 1972) e pode incorporar mais de 4500 átomos de ferro, enquanto que a transferrina contém, no máximo, apenas 2 átomos deste elemento (Harrison & Arosio, 1996).

A ferritina pode ser transportada através das células endoteliais dos vasos sanguíneos (Fisher *et al.*, 2007), o que significa que esta proteína transportadora pode alcançar a retina, a partir da corrente sanguínea, disponibilizando grandes quantidades de ferro para o metabolismo celular.

De forma a determinar se as células Mato desempenhavam algum papel na passagem de ferritina plasmática para o parênquima retiniano, submetem-se retinas de murganho a diferentes técnicas de estudo.

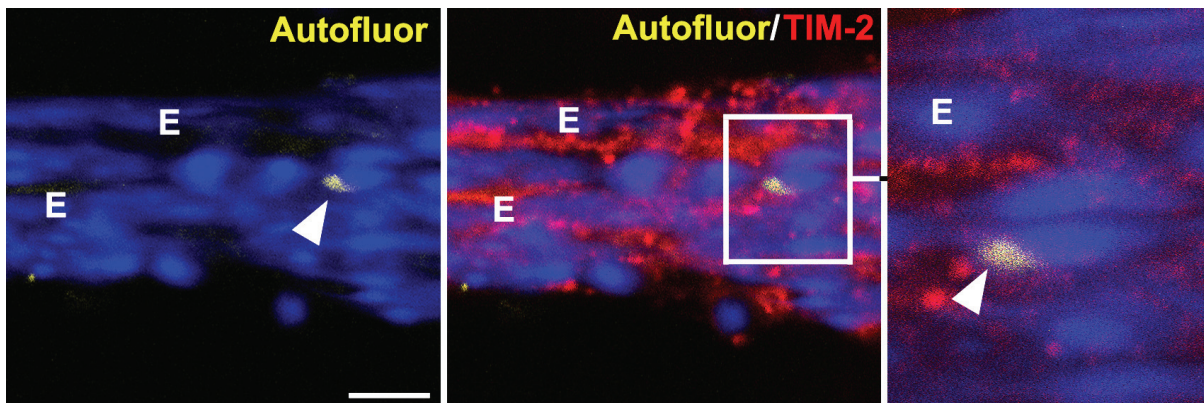
Para saber se as células Mato da retina expressavam receptores de ferritina, realizou-se a imunomarcção de retinas *in toto* com o anticorpo anti-TIM-2, um receptor de membrana pertencente à família das proteínas dos domínios imunoglobulínicos e mucínicos das células T, ao qual se une especificamente a ferritina-H (Chen *et al.*, 2005). As imagens de microscopia de varrimento laser confocal puseram em evidência que, efectivamente, as células endoteliais e as células Mato apresentavam estes receptores de ferritina na sua membrana celular (Figura 35).

Este resultado sugeria que a ferritina podia atravessar a parede vascular, sendo, posteriormente, captada pelas células Mato por um processo de endocitose mediado pelos receptores TIM-2.

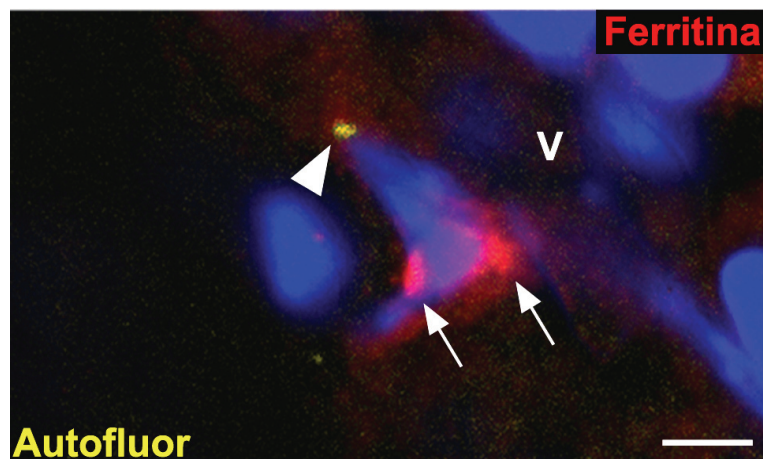
O estudo de retinas *in toto* imunohistoquimicamente marcadas com o anticorpo anti-ferritina permitiu a detecção de moléculas de ferritina nas células Mato da retina, revelando que estas células perivasculares continham grânulos de ferritina no seu citoplasma (Figura 36).

De forma a determinar se a ferritina detectada nos grânulos citoplasmáticos das células Mato podia ser proveniente da corrente sanguínea, injectou-se ferritina de baço de cavalo, por via endovenosa, em murganhos saudáveis. Seis horas após a injeção, a ferritina de baço de cavalo foi encontrada exclusivamente em células perivasculares com distribuição e topografia compatíveis com as das células Mato (Figura 37). O teste histoquímico utilizado, reacção de Azul da Prússia, não detectou ferro nas retinas de murganhos não injectados (Figura 37).

Este resultado confirmou que as células Mato da retina tinham a capacidade de captar e acumular moléculas de ferritina em circulação na corrente sanguínea.

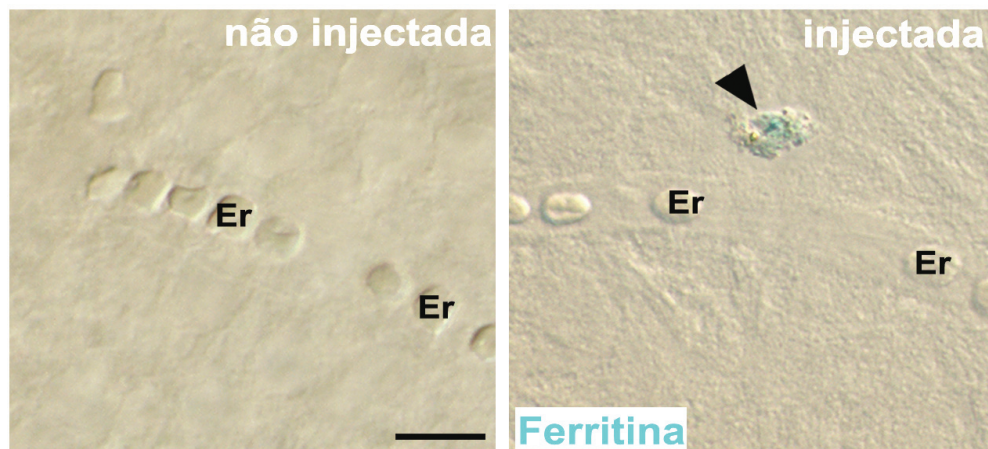


**Figura 35.** Endocitose de ferritina. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-TIM-2 mostrou a existência destes receptores de membrana específicos para a ferritina. E, eritrócito; Autofluor, autofluorescência; Cabeça de seta, inclusão citoplasmática autofluorescente da célula Mato. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 7  $\mu\text{m}$ .



**Figura 36.** As células Mato acumulam ferritina. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-ferritina mostrou a existência de ferritina (setas) nas células Mato. Autofluor, autofluorescência; Cabeça de seta, inclusão citoplasmática autofluorescente da célula Mato. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 5  $\mu\text{m}$ .





**Figura 37.** Endocitose de ferritina. A: seis horas após a injeção endovenosa de ferritina de baço de cavalo, o teste histoquímico usado para detectar ferro nas retinas (reação de Azul da Prússia) revelou a presença de grânulos azul turquesa no citoplasma de células perivasculares com uma distribuição e topografia compatível com as das células Mato (seta). Não foi detectado ferro nas retinas de murganhos não injectados. Er, eritrócito. Barra: 8  $\mu$ m.

O conjunto destes resultados revelou que as células Mato da retina tinham, efectivamente, a capacidade de captar ferritina plasmática por um processo de endocitose, provavelmente mediado pelos receptores TIM-2, e que a ferritina endocitada se acumulava nestas células, não podendo, por conseguinte, passar livremente para o parênquima retiniano.

Atendendo ao facto de a ferritina poder incorporar mais de 4500 átomos de ferro, a capacidade de acumulação de tão grandes quantidades de ferro permite antever um importante papel das células Mato no metabolismo do ferro, a nível retiniano, bem como nas afecções decorrentes da sua alteração.

### 9. AS CÉLULAS MATO DA RETINA MIGRAM PARA O LOCAL DAS LESÕES NUM MODELO DE RETINOPATIA EM MURGANHO INDUZIDA PELO IODATO DE SÓDIO

As células Mato cerebrais estão envolvidas nos processos de encefalopatia (Williams *et al.*, 2001). Após lesão cerebral induzida pelo frio, o plasma sanguíneo infiltrado no espaço perivascular é captado por estas células *scavenger* localizadas na fronteira entre o tecido com lesões e as regiões não afectadas (Fukuda & Mato, 1985). As células Mato providenciam a remoção de produtos e detritos celulares do espaço extracelular e as substâncias incorporadas são acumuladas nos corpos de inclusão (Mato *et al.*, 1996 e 2001). As células Mato são as primeiras células afectadas em situação de encefalopatia e estão envolvidas na activação e migração das células da micróglia para os locais das lesões (Mato *et al.*, 1998).

Com o objectivo de determinar o possível envolvimento das células Mato da retina em processos de retinopatia, recorreu-se ao estudo de um modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio.

Este modelo de retinopatia está bem caracterizado. A injeção intraperitoneal de iodato de sódio induz o aparecimento de lesões degenerativas nas células do epitélio pigmentar da retina e nas células fotorreceptoras, de um modo directamente dependente da dose e do tempo decorrido após a injeção (Kiuchi, Yoshizawa, Shikata, Moriguchi & Tsubura, 2002; Enzmann *et al.*, 2006). Estes animais desenvolvem alterações, a nível dos estratos retinianos mais externos, características de uma série de retinopatias, observando-se, entre outros aspectos, um aumento de expressão de GFAP nas células de Müller e a migração de células macrofágicas para o local das lesões, na tentativa de eliminar os detritos celulares formados.

Nos estadios iniciais dos processos de retinopatia as células de Müller exibem um aumento muito marcado da expressão de GFAP. Trata-se de uma resposta não específica à acção dos estímulos lesivos sobre o parênquima retiniano. Desta forma, o aumento de expressão de GFAP é considerado um indicador da activação das células de Müller e, portanto, um sinal precoce da gliose reactiva que acompanha os processos de retinopatia (Kiuchi *et al.*, 2002).

Neste ensaio, foram injectados intraperitonealmente, com 100 mg/Kg de iodato de sódio, 3 grupos de murganhos adultos, com 4 meses de idade. Os animais foram eutanasiados 24, 48 e 72 horas após a injeção. Um grupo de animais não injectados foi utilizado como controlo negativo.

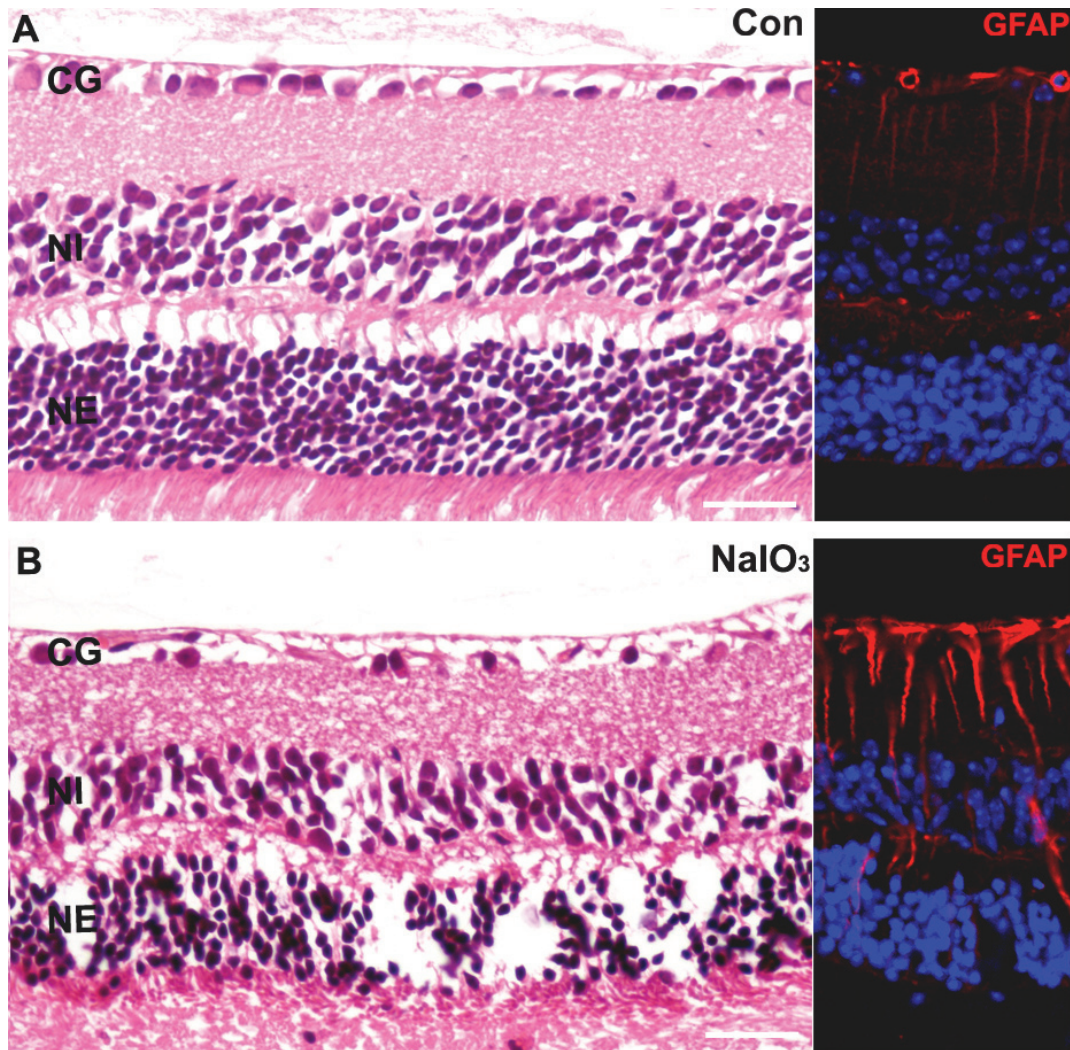
Para este estudo foram analisados, por meio de microscopia óptica e de microscopia de varrimento laser confocal, cortes de retinas incluídas em parafina, com 4 µm de espessura, dos olhos esquerdos e retinas *in toto* dos olhos direitos de cada um dos murganhos dos diferentes grupos experimentais.

A estrutura da retina e a expressão de GFAP começaram por ser avaliadas nas retinas do grupo controlo. Na Figura 38 A pode observar-se, em corte, o aspecto de uma retina normal, pertencente a um animal deste grupo. Nestas retinas, a arquitectura celular característica é evidente, exibindo uma normal disposição dos diferentes tipos celulares nos respectivos estratos retinianos. A imagem de microscopia de varrimento laser confocal, à direita do painel, ilustra o mesmo aspecto, mostrando, a vermelho, a discreta expressão de GFAP nos prolongamentos citoplasmáticos nas células de Müller, dispostos de forma a cruzar praticamente toda a neuro-retina, desde a membrana limitante interna até à membrana limitante externa.

No entanto, nas mesmas condições de captação de imagem, o aspecto das retinas dos murganhos injectados com iodato de sódio apresentaram alterações significativas. Nas retinas dos animais eutanasiados 24 horas após a injeção intraperitoneal de iodato de sódio, começava a ser evidente uma certa desorganização a nível dos núcleos dos fotorreceptores, associada a algumas áreas retinianas com diminuição do número de segmentos externos e internos dos fotorreceptores. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-GFAP revelava um aumento notável da expressão desta proteína a nível das células de Müller, indicando que o processo de retinopatia se tinha estabelecido. A camada de células do epitélio pigmentar da retina, mantinha um revestimento contínuo sobre a camada das células fotorreceptoras.

Nas retinas dos animais eutanasiados 48 horas após a injeção intraperitoneal de iodato de sódio, as alterações eram ainda mais evidentes e comprometiam quer os estratos mais externos da retina, quer os mais internos. A desorganização dos núcleos da camada nuclear externa era patente em quase toda a extensão da retina e a diminuição do número de





**Figura 38.** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). A: aspecto de uma retina normal. B: 48 horas após a injeção de iodato de sódio, a desorganização dos núcleos da camada nuclear externa e a diminuição do número de fotorreceptores é evidente. A marcação com o anticorpo anti-GFAP (vermelho) mostrou uma clara proliferação das células de Müller. Coloração histológica Hematoxilina-Eosina. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). CG, camada de células ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear externa. Barras: 30  $\mu\text{m}$ .

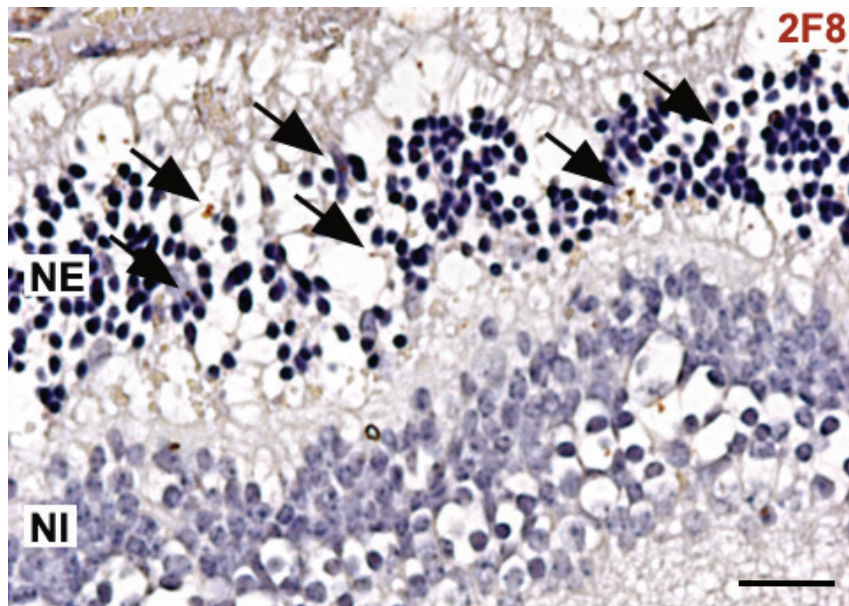
fotorreceptores era bastante mais acentuada, de tal forma que eram visíveis zonas da retina em que apenas se identificavam os estratos mais internos da neuro-retina. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-GFAP revelou igualmente uma sobre-expressão desta proteína nas células de Müller, para além de uma proliferação destas células, ocupando áreas onde antes se encontravam os fotorreceptores (Figura 38 B).

As células da micróglia constituem um tipo especial de macrófagos residentes do sistema nervoso e da retina. Normalmente encontram-se num estado não activado. Porém, quando activadas em resposta a um determinado estímulo lesivo, as células da micróglia desempenham um importante papel no restabelecimento da homeostasia, participando na resposta inflamatória, em processos degenerativos ou em outro tipo de lesões tecidulares (Xu *et al.*, 2007a); participam no processo de regeneração dos tecidos, fagocitando microrganismos invasores e detritos celulares e também na resposta imunitária que eventualmente se possa desencadear (Chan, Magnus & Gold, 2001; Chen *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002; Chew, Takanohashi & Bell, 2006). Como referido, as células Mato cerebrais são, no entanto, as primeiras células afectadas, em situação de encefalopatia, estando envolvidas na activação e posterior migração das células da micróglia para os locais das lesões (Mato *et al.*, 1998).

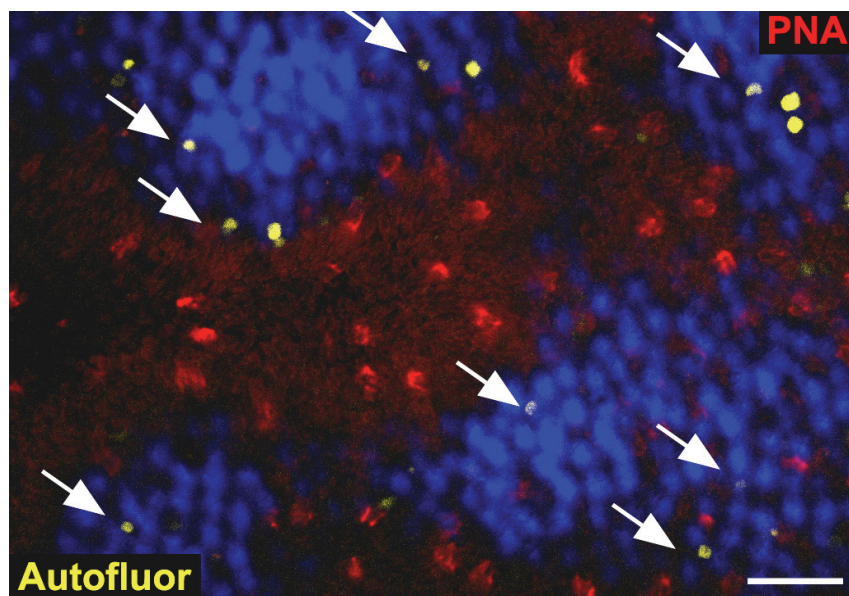
As células macrofágicas activadas expressam SR-A, receptores de membrana que funcionam, entre outros aspectos, como receptores de endocitose para diferentes macromoléculas, fagocitando células em apoptose, detritos celulares e bactérias patogénicas (Husemann *et al.*, 2002).

Para avaliar a presença de células macrofágicas no local das lesões e eventualmente de células Mato, foram submetidas a estudo, por meio de diferentes técnicas, retinas de murganhos de cada um dos grupos experimentais referidos.

Retinas imunohistoquimicamente marcadas com o anticorpo anti-2F8 revelaram a presença de células com receptores *scavenger* da classe A na zona das lesões, a nível da camada nuclear externa, numa fase inicial do processo de retinopatia, sugerindo a presença de células macrofágicas a nível das lesões degenerativas, na camada das células fotorreceptoras (Figura 39).



**Figura 39.** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Aspecto da retina com lesões degenerativas a nível dos fotorreceptores. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-2F8, revelada com DAB, evidenciou a presença de células com RS-A, marcados a castanho (setas), a nível da camada nuclear externa, 48 horas após a injeção de iodato de sódio. NE, camada nuclear externa; NI, camada nuclear interna. Barra: 15  $\mu\text{m}$ .



**Figura 40.** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Redução do número de fotorreceptores. A marcação dos cones com a lectina PNA (vermelho) evidencia extensas áreas com uma significativa redução do número de fotorreceptores e onde apenas se encontram os núcleos da camada nuclear interna (azul). Estas zonas são coincidentes com a presença de diversas células autofluorescentes (setas) localizadas preferencialmente nos bordos das zonas com lesões . MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 16  $\mu\text{m}$ .

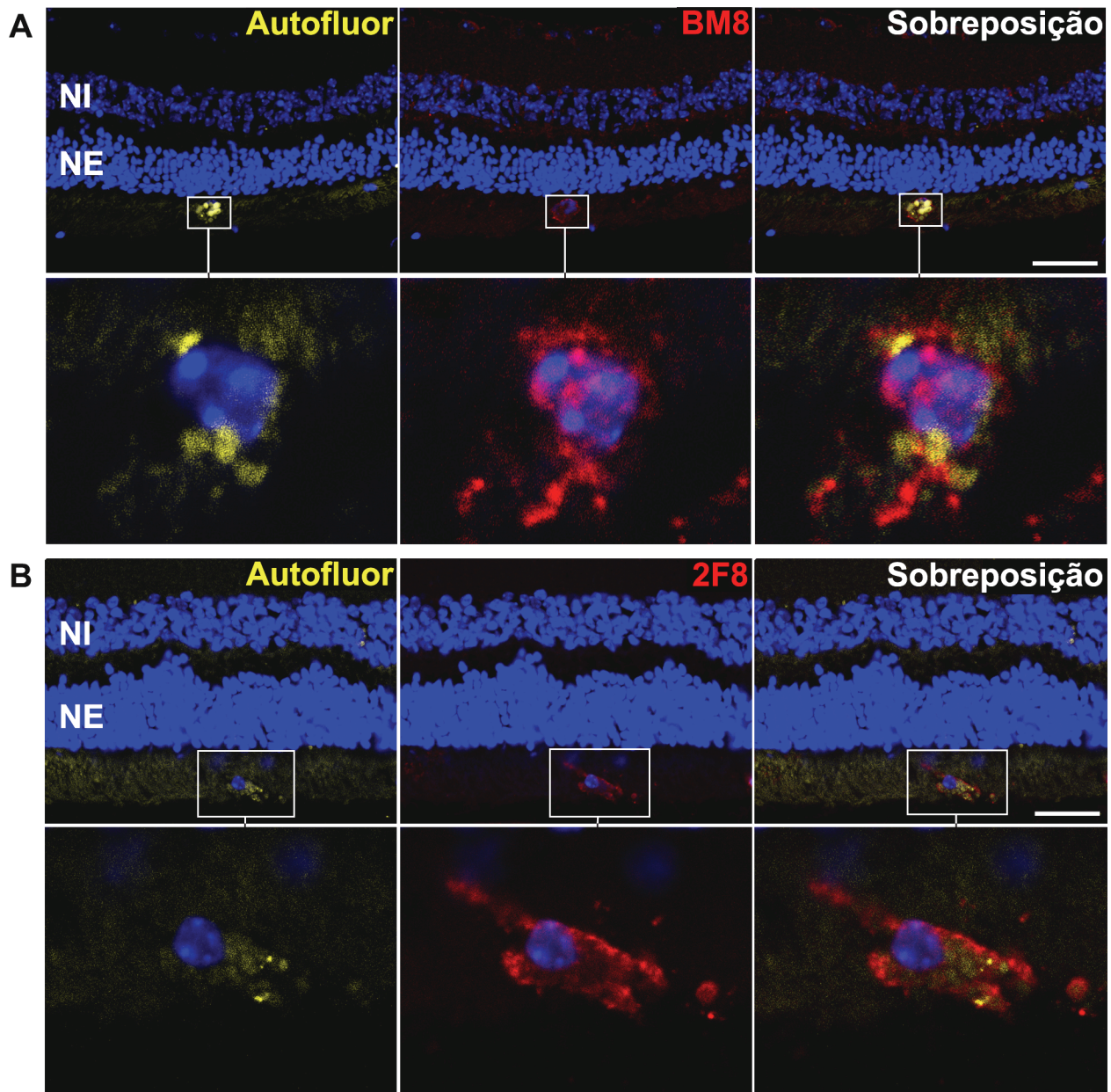
A lectina *Arachis hypogaea* (PNA) une-se especificamente à membrana celular dos cones, (Blanks & Johnson, 1984). A marcação histoquímica de retinas *in toto* com esta lectina pôs em evidência extensas áreas retinianas com uma redução significativa do número de fotorreceptores e onde, simultaneamente, se podia observar a presença de inúmeras células autofluorescentes (Figura 40). A imagem ilustra o aspecto da camada de cones e bastonetes, numa retina do grupo de animais eutanasiados 48 horas após a injeção intraperitoneal de iodato de sódio, onde é evidente a interposição de zonas normais, com a presença dos segmentos externos dos cones, marcados a vermelho com a lectina PNA, com extensas zonas em que deixaram de se observar fotorreceptores e onde apenas se encontram os núcleos da camada nuclear interna. Na fronteira entre estas zonas observa-se a presença de inúmeras células autofluorescentes, provavelmente células macrofágicas com material fagocitado, possivelmente correspondendo às células que expressavam SR-A ilustradas na figura anterior.

Com o objectivo de determinar se as células 2F8-positivas detectadas a nível das lesões poderiam ser células Mato, procedeu-se à marcação imunohistoquímica das retinas com os anticorpos BM8 e 2F8.

A marcação imunohistoquímica com estes anticorpos revelou, efectivamente, a presença de células autofluorescentes BM8 e 2F8-positivas nos locais das lesões, a nível da camada nuclear externa e da camada de cones e bastonetes (Figura 41). Estas células, por serem BM8-positivas não puderam ser classificadas como células da micróglia, pertencendo provavelmente ao subtipo das células Mato da retina. No entanto, em situação normal estas células apenas são observadas nas camadas mais internas da retina. Este resultado sugeriu, por conseguinte, que as células Mato tinham migrado da sua localização perivascular para o local das lesões.

No decurso do desenvolvimento das lesões degenerativas, a gliose sobrevinda em resposta às lesões celulares em curso, bem como a fagocitose dos detritos celulares pelos macrófagos e células da micróglia, assumem um papel fundamental. Na retina, como se sabe, existe uma população heterogénea de células macrofágicas com funções próprias nas diferentes fases dos processos de retinopatia (Ng & Streilein, 2001; Zhang *et al.*, 2005a e 2005b).





**Figura 41.** Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ). Migração das células Mato. 48 horas após a injeção de iodato de sódio, observa-se a presença de células autofluorescentes BM8 e 2F8-positivas (células Mato) na camada nuclear externa. Estas células nunca foram observadas nesta localização em retinas normais. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 25  $\mu\text{m}$  (A) e 33  $\mu\text{m}$  (B).

O conjunto dos resultados obtidos sugeriam que, à semelhança das células Mato cerebrais, que são as primeiras células afectadas em situação de encefalopatia, estando envolvidas na activação e migração das células da micróglia para os locais das lesões (Mato *et al.*, 1998), nas fases iniciais dos processos de retinopatia com degenerescência dos fotorreceptores, as células Mato retinianas, pertencentes a um subtipo de macrófagos residentes da retina distinto das células da micróglia, surgiam nos locais das lesões, migrando da sua localização perivascular, provavelmente para contribuir para a rápida remoção dos detritos celulares formados.

Estes resultados estão em concordância com vários estudos sobre activação e migração das células da micróglia, segundo os quais nas fases iniciais dos processos de retinopatia não se observam células da micróglia nos locais das lesões.

Nestes estudos foi usado o marcador de células de micróglia 5D4. O anticorpo anti-5D4 marca específica e exclusivamente as células da micróglia (Jander & Stoll, 1996).

Nas fases iniciais dos processos de retinopatia, não se observam células 5D4-positivas nos locais das lesões. Nessas fases, apenas é detectado a nível das lesões um subtipo de células macrofágicas residentes 5D4-negativas, portanto, células macrofágicas que não podem ser classificadas como células da micróglia, por não expressarem este marcador (Ng & Streilein, 2001; Zhang *et al.*, 2005a e 2005b).

Estas células macrofágicas residentes 5D4-negativas, provavelmente, correspondem às células Mato retinianas BM8-positivas detectadas a nível das lesões nas fases iniciais da degenerescência dos fotorreceptores, no modelo de retinopatia estudado neste trabalho.

### 10. AS CÉLULAS MATO ESTÃO PRESENTES EM RETINAS HUMANAS

As células Mato cerebrais foram descritas não só em animais, mas também em humanos (Mato *et al.*, 1981 e 1996; Williams *et al.*, 2001).

Para determinar se em retinas humanas se podiam também encontrar células Mato, foram realizados diversos estudos em retinas humanas *in toto* e em cortes de retinas incluídas em parafina.

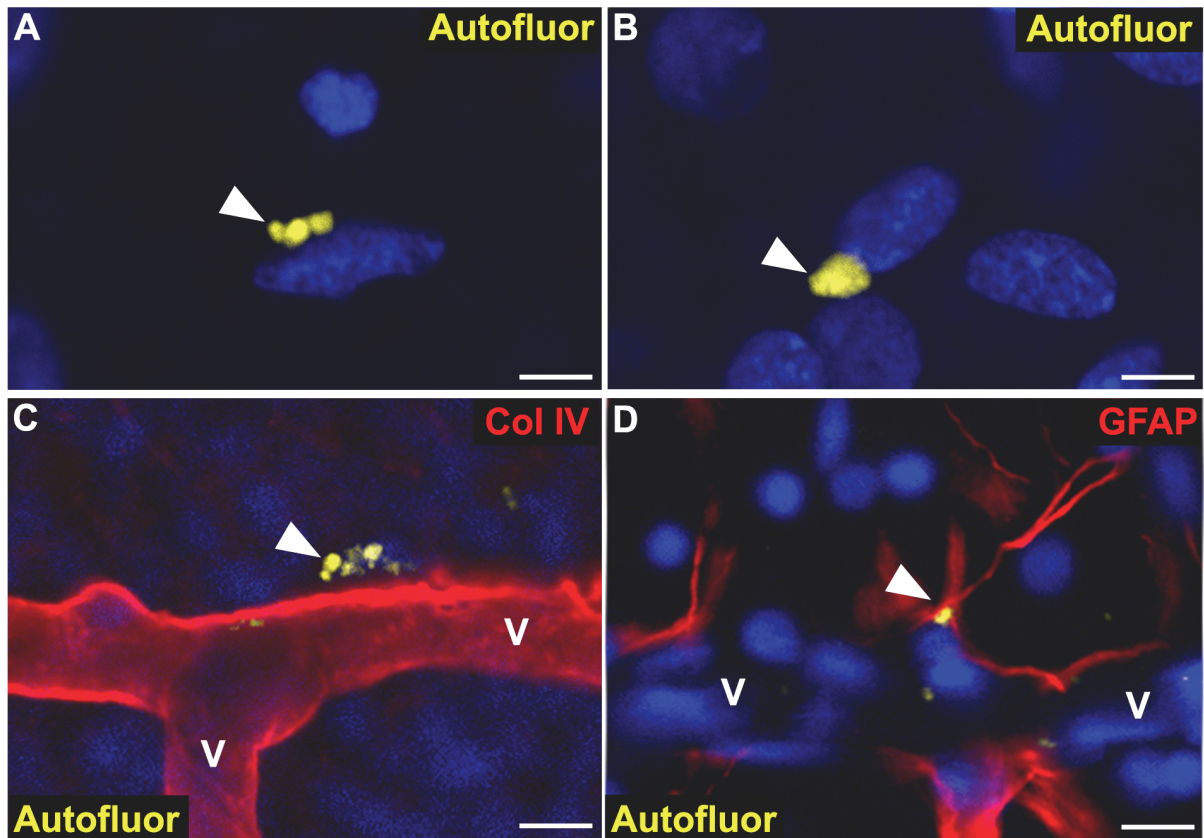
As observações por meio de microscopia de varrimento laser confocal revelaram que, à semelhança das retinas de murganho, também em retinas humanas se encontravam células perivasculares contendo as características inclusões granulares autofluorescentes, na proximidade do núcleo celular (Figura 42 A e B).

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-colagénio IV revelou que estas células autofluorescentes apresentavam uma localização idêntica à das células Mato da retina de murganho, situando-se externamente à membrana basal dos vasos sanguíneos.

Para além disso, a marcação imunohistoquímica das células da nevrógia com o anticorpo anti-GFAP revelou que estas células autofluorescentes perivasculares estavam igualmente localizadas em áreas da parede vascular em que faltava o revestimento da membrana glial e que, à semelhança das células Mato retinianas de murganho se encontravam revestidas por esta membrana na sua superfície abluminal (Figura 42 C e D).

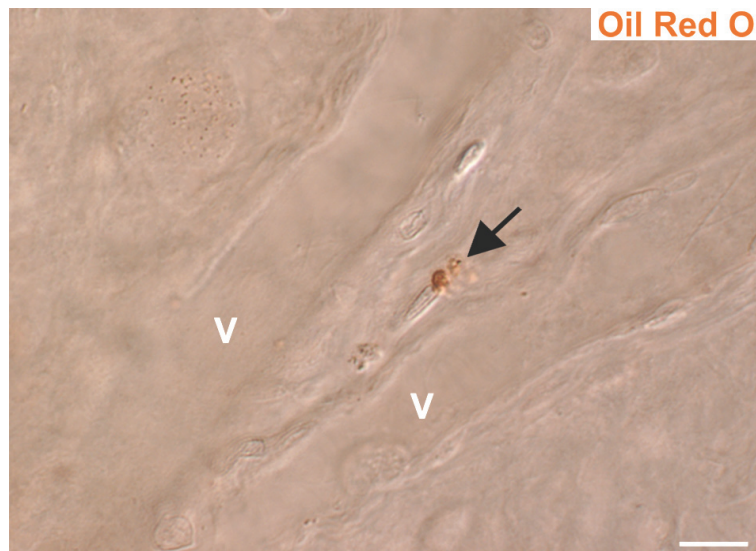
A coloração histológica com *Oil red O*, usada para determinar a presença de lípidos nas células, revelou a presença de grânulos avermelhados no citoplasma destas células perivasculares, sugerindo que, também nestas células a autofluorescência se devia à presença de lípidos oxidados nos seus corpos de inclusão (Figura 43).

Estas observações, no seu conjunto, sugeriam que nas retinas humanas também se podiam encontrar células Mato, células perivasculares autofluorescentes, com características morfológicas e topográficas idênticas às observadas nas células Mato de retina de murganho.

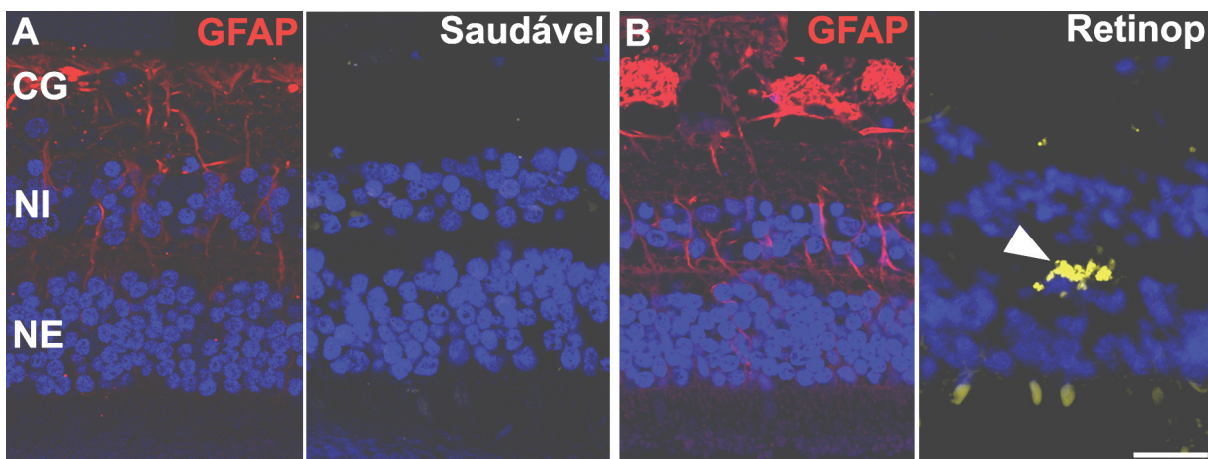


**Figura 42.** Células Mato em retinas humanas. A e B: as cabeças de seta assinalam grânulos autofluorescentes junto aos núcleos de células perivasculares. Retinas marcadas com os anticorpos anti-colagénio IV (C) e anti-GFAP (D) mostram que as células Mato da retina se localizam no espaço perivascular, entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e os pés vasculares das células da nevrógia que revestem a sua superfície abluminal. MVLC. Autofluor, autofluorescência. Núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* e com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barras: 7,5  $\mu\text{m}$  (A), 7  $\mu\text{m}$  (B), 15  $\mu\text{m}$  (C) e 15  $\mu\text{m}$  (D).





**Figura 43.** A coloração com *oil red O* permitiu confirmar a presença de lípidos nas inclusões citoplasmáticas de células perivasculares com localização e topografia compatíveis com as das células Mato (seta). V, vaso sanguíneo. Barra: 28  $\mu$ m.



**Figura 44.** Retina humana. A: aspecto de uma retina saudável. B: aspecto de uma retina com retinopatia; a presença de gliose reactiva indica o estabelecimento de um processo de retinopatia; nesta retina pode observar-se a presença de células autofluorescentes (cabeça de seta) no local das lesões, a nível da camada nuclear externa. CG, camada de células ganglionares; NI, camada nuclear interna; NE, camada nuclear externa; Retinop, retinopatia. MVLC. Núcleos marcados com *Hoechst Stain Solution* (azul). Barra: 24  $\mu$ m.

Num paciente de 83 anos, com gliose acentuada, sinal do processo de retinopatia em curso, foram encontradas, na camada nuclear externa, células com inúmeros grânulos autofluorescentes, sugerindo que, também neste caso, as células Mato retinianas poderiam ter migrado da sua localização perivascular para o local das lesões (Figura 44).



# **DISCUSSÃO**



## DISCUSSÃO

Nos anos oitenta, Mato e colaboradores descreveram, no sistema nervoso, as células Mato (Mato *et al.*, 1985). Estes macrófagos perivasculares, caracterizados pela presença de corpos de inclusão citoplasmáticos autofluorescentes e pela sua localização no espaço perivascular (Virchow-Robin), são considerados as células *scavenger* do sistema nervoso (Mato *et al.*, 1982, 1996 e 1997a; Williams *et al.*, 2001).

As células Mato providenciam a remoção de produtos e detritos celulares do espaço extracelular, sendo as substâncias incorporadas, acumuladas nos seus corpos de inclusão (Mato *et al.*, 1996 e 2001). Desempenham um papel fundamental na captação e acumulação de macromoléculas em circulação na corrente sanguínea, colaborando com a barreira hemato-encefálica na exclusão destas substâncias do parênquima cerebral (Mato *et al.*, 1986a, 1996 e 1999).

As células Mato são partícipes nos processos de encefalopatia. São, efectivamente, as primeiras células afectadas, nestas circunstâncias, e estão envolvidas na activação e migração das células da micróglia para os locais das lesões (Mato *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2001).

Na retina podem ser encontradas diferentes populações de células da linhagem dos macrófagos, onde se incluem as células da micróglia e as células perivasculares (Dick *et al.*, 1995; Provis *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005a).

A designação de células perivasculares diz respeito, no entanto, a uma população heterogénea de células, localizadas no espaço perivascular, que compreende diferentes tipos celulares, incluindo células dendríticas (Xu *et al.*, 2007b), células da micróglia e outros macrófagos perivasculares (Provis *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2001). Contudo, não foram descritas células Mato nesse conjunto de células perivasculares da retina.

Neste trabalho descreve-se pela primeira vez, a presença de uma população de células perivasculares autofluorescentes, em retinas humanas e de murganhos, que, pelas suas características morfológicas, topográficas e funcionais, e atendendo ao facto de a neuro-

retina ser considerada uma expansão do encéfalo projectada no interior da órbita (Costa & Morato, 1984; Carlson, 1999), podem ser classificadas como células Mato da retina.

Estas células perivasculares autofluorescentes foram estudadas em retinas de murganho, com idades compreendidas entre 1 a 6 meses, e apresentaram as seguintes características: (i) emitiam uma intensa fluorescência amarelo-alaranjada (530-630 nm), devido à presença de lípidos oxidados, constituintes de lipoproteínas, nos seus corpos de inclusão citoplasmáticos; (ii) observadas nas camadas mais internas da retina, apostas aos vasos de maior calibre, arteríolas, arteríolas pré-capilares, vénulas pós-capilares e vénulas, (iii) estas células estavam situadas no espaço perivascular, entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos; (iv) mais precisamente, estas células foram observadas distribuindo-se de forma descontínua, em áreas da parede vascular onde faltava o revestimento da membrana glial, (v) em contacto directo com a membrana basal; (vi) a sua localização coincidia ainda com áreas da parede vascular que apresentavam menor espessura e (vii) onde se encontravam zónulas de oclusão unindo células endoteliais adjacentes. (viii) Nas vénulas, as zonas em que se encontravam as células Mato coincidiam também com áreas da membrana basal em que se detectava menor expressão de colagénio IV.

Para além destas características, os resultados mostraram que estas células perivasculares autofluorescentes (ix) constituíam uma pequena população de macrófagos residentes, pois expressavam os marcadores CD11b e F4/80, (x) representando cerca de 20% do total de macrófagos da retina, (xi) distinguindo-se das células da micróglia por expressarem constitutivamente o epitopo BM8.

Mais, observou-se que (xii) as células Mato retinianas se movimentavam, em condições fisiológicas, ao longo da superfície externa da parede vascular, num movimento oscilatório, a uma velocidade média de 15  $\mu\text{m}/\text{h}$  e percorrendo uma distância de aproximadamente 30-35  $\mu\text{m}$ .

Estas células (xiii) expressavam constitutivamente receptores *scavenger* da classe A, constituindo, desta forma, as únicas células perivasculares com função *scavenger*, em condições fisiológicas, (xiv) captando e acumulando macromoléculas em circulação (HRP e ac-LDL), em situação de integridade da BHR.

As células Mato da retina apresentavam ainda a capacidade (xv) de acumular ferro e (xvi) de captar e acumular ferritina em circulação na corrente sanguínea.

Num modelo de retinopatia, com degenerescência dos fotorreceptores, observou-se que (xvii) as células Mato se deslocavam da sua localização perivascular para o local das lesões, a nível das camadas mais externas da retina.

Para além dos resultados obtidos no estudo de retinas de murganho, (xviii) foram também encontradas células Mato em retinas humanas, contendo lípidos nas suas inclusões citoplasmáticas; (xix) num paciente com retinopatia, foram observadas, na camada nuclear externa, células com inúmeros grânulos autofluorescentes, provavelmente, células Mato que migraram da sua localização perivascular para o local das lesões.

## **1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TOPOGRÁFICOS DAS CÉLULAS MATO DA RETINA**

As características morfológicas e topográficas das células perivasculars autofluorescentes estudadas estão em consonância com as descritas para as células Mato cerebrais e permitem, desde logo, excluir a possibilidade de estas células poderem ser consideradas pericitos ou células da micróglia perivascular.

Os pericitos são células constituintes da túnica média dos capilares e das vénulas pós-capilares, localizados de forma descontínua ao longo da parede vascular, completamente rodeados pela membrana basal (Sims, 1986). As células Mato retinianas são células perivasculars macrofágicas (F4/80 e CD11b-positivas) que, embora se distribuam de forma descontínua ao longo dos vasos sanguíneos, se encontram situadas no espaço perivascular, sempre localizadas externamente à membrana basal da parede vascular.

As células Mato constituem, efectivamente, uma população de macrófagos residentes perivasculars da retina. Porém, não podem ser classificadas como células da micróglia perivascular, uma vez que: (i) apresentam corpos de inclusão citoplasmáticos autofluorescentes, devido à presença de lípidos oxidados, em animais de todas as idades, inclusivamente em jovens, com apenas 1 mês de idade, que não se observam nas células da micróglia; (ii) expressam constitutivamente o epitopo BM8, que nunca se expressa nas



células da micróglia (Kraal *et al.*, 1987); (iii) são as únicas células perivasculares que expressam constitutivamente receptores *scavenger* da classe A (RS-A); as células da micróglia encontram-se, em condições fisiológicas, num estado não activado (Chen *et al.*, 2002) e apenas expressam este tipo de receptores quando activadas na sequência de estímulos lesivos (Mato *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1998; Husemann *et al.*, 2002).

Para além disso, os aspectos ultraestruturais das células Mato, permitem também distingui-las das células ramificadas da micróglia (Kohno, Inomata & Taniguchi, 1982; Anderson *et al.*, 1995). As células Mato retinianas, detentoras de uma configuração mais alongada, apresentam longas expansões citoplasmáticas que acompanham a parede vascular. O seu citoplasma contém inclusões citoplasmáticas electrodensas características (lisossomas), presentes em número variável e com diferentes dimensões, que não se observam nas células da micróglia.

Recentemente foi descrita, na retina, uma população de células da micróglia perivascular autofluorescentes devido ao seu conteúdo em lipofuscina. Contudo, estes microglíocitos perivasculares autofluorescentes foram observados apenas em retinas de murganho velhos, com 18 meses de idade (Xu *et al.*, 2008). A acumulação intracelular de lipofuscina é um indicador de envelhecimento (Sohal & Brunk, 1989). Os grânulos de lipofuscina destas células, tal como os que estão presentes nas células do epitélio pigmentar da retina, resultam, principalmente, da degradação de detritos celulares fagocitados. Com o envelhecimento, as células tornam-se menos eficientes na degradação do material fagocitado e aumentam os depósitos de lipofuscina. A oxidação produzida pela constante irradiação da luz solar é responsável pela sua fluorescência amarela (Kayatz *et al.*, 2001).

As células Mato pertencem a uma população macrofágica perivascular distinta da micróglia e a autofluorescência das células Mato, que se observa em animais de todas as idades e que, portanto, não está relacionada com o envelhecimento, deve-se à presença de lipoproteínas contendo lípidos oxidados na sua constituição e não à presença de lipofuscina, como observado nos diferentes estudos realizados.

A coloração com *Oil red O* revelou, efectivamente, a presença de lípidos nos corpos de inclusão citoplasmáticos das células Mato da retina. Contudo, o conteúdo autofluorescente dos corpos de inclusão manteve-se após o tratamento com solventes orgânicos. Dado que a fluorescência da lipofuscina seria desvanecida pela acção destes solventes e que os lípidos

simples seriam arrastados por estas substâncias, este resultado sugere que nos corpos de inclusão das células Mato da retina se encontram lipoproteínas oxidadas.

Para além disso, o *fingerprint* dos corpos de inclusão das células Mato revelou diferenças consideráveis quando comparado com o *fingerprint* da lipofuscina presente nas células do epitélio pigmentar da retina, confirmando que efectivamente as células Mato contêm lipoproteínas oxidadas nos seus corpos de inclusão e não lipofuscina.

As células Mato constituem um subtipo de macrófagos perivasculares residentes com a particularidade de serem as únicas células macrofágicas perivasculares que expressam constitutivamente RS-A, uma vez que as células da micróglia, por se não encontrarem activadas em condições fisiológicas, não expressam estes receptores *scavenger* (Mato *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1998; Husemann *et al.*, 2002).

A designação de receptor “*scavenger*” foi introduzido por Goldstein e colaboradores (1979) para descrever locais de ligação da membrana celular dos macrófagos com elevada afinidade para lipoproteínas de baixa densidade acetiladas (ac-LDL). Posteriormente ficou demonstrado que, para além dos macrófagos, outras células apresentavam receptores de membrana que, apesar de apresentarem algumas diferenças estruturais, se ligavam também especificamente a lipoproteínas modificadas. Foi então adoptado o termo receptor “*scavenger*” para definir um conjunto algo heterogéneo de mais de 20 receptores de membrana com afinidade para lipoproteínas, mas aos quais pode corresponder um grupo bastante mais vasto de ligandos. A família de receptores *scavenger* engloba, entre outros, os RS-A (CD204), os receptores *scavenger* da classe BI, os receptores CD36, os receptores para os produtos avançados de glicação e os receptores para proteínas “*LDL-like*” (Krieger & Stern, 2001).

Os receptores *scavenger* da classe BI são expressos, principalmente, em tecidos em que ocorre a síntese de elevadas quantidades de colesterol, como é o caso do fígado, ou em tecidos que exibem um elevado consumo desta substância, como é o caso da glândula adrenal ou dos ovários, por exemplo. No tecido nervoso, os receptores *scavenger* da classe BI são encontrados, principalmente, a nível dos astrócitos e das células musculares lisas da parede dos vasos sanguíneos (Husemann *et al.*, 2002).

Os receptores CD36 são expressos por uma grande variedade de células, tais como macrófagos, células endoteliais, adipócitos, entre outras. Na retina, são as células do epitélio pigmentar que exibem a mais elevada expressão de receptores CD36, estando, estes receptores, envolvidos na endocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, no processo de contínua reciclagem destas estruturas (Ryeom *et al.*, 1996).

Os RS-A têm como ligandos principais as ac-LDL, e outras LDL modificadas, a proteína fibrilar  $\beta$ -amilóide, produtos avançados de glicação, colagénio IV, células em apoptose e mielina, entre outros (Husemann *et al.*, 2002). O anticorpo anti-CD204, clone 2F8, liga-se especificamente aos SR-A, permitindo a sua identificação por meio de técnicas imunohistoquímicas (Fraser *et al.*, 1993).

Nos tecidos, de uma forma geral, os RS-A são expressos constitutivamente pelas células mononucleares fagocíticas, como ocorre, por exemplo, nos macrófagos, células dendríticas e células de Kupffer (Yamada, Doi, Hamakubo & Kodama, 1998). No sistema nervoso, em condições fisiológicas, os RS-A, identificados pela imunomarcagem com o anticorpo 2F8, observam-se, na sua grande maioria, nas células Mato perivasculares, embora também se tenha detectado alguma expressão destes receptores nas células endoteliais (Honda *et al.*, 1998; Prior, Wihl & Urmoneit, 2000; Husemann *et al.*, 2002).

Na retina, também as células Mato revelaram a expressão constitutiva de RS-A, através da imunomarcagem com o anticorpo 2F8.

Os RS-A funcionam como receptores de endocitose para diferentes macromoléculas, proteínas e lipoproteínas, como receptores de adesão dos macrófagos a substratos ricos nos ligandos específicos, na ligação a bactérias patogénicas e são receptores que estão também envolvidos na resposta imunitária inata (Fraser *et al.*, 1993)

As células detentoras destes receptores *scavenger* participam, por conseguinte, no metabolismo lipídico, captando e acumulando lípidos. São células envolvidas na manutenção da homeostasia dos tecidos, fagocitando moléculas diversas, células em apoptose, detritos celulares e bactérias patogénicas, para além de participarem na resposta imunitária inata. Devido à presença dos RS-A, estas células têm ainda a capacidade de adesão a matrizes que contenham ligandos específicos (Husemann *et al.*, 2002).

A expressão de RS-A nas células Mato retinianas, em condições fisiológicas, permite, portanto, explicar algumas das particularidades funcionais destas células.

As células Mato da retina, tal como as células Mato cerebrais (Mato *et al.*, 1998), participam no metabolismo lipídico, tendo a capacidade de captar e acumular lípidos, tal como revelou a coloração com *Oil red O*.

À semelhança das células Mato cerebrais, também as células Mato retinianas podem ser consideradas as células *scavenger* da retina, pois, por expressarem constitutivamente RS-A, são responsáveis pela manutenção da homeostasia na retina, promovendo a endocitose de macromoléculas diversas e, eventualmente, a fagocitose de células em apoptose, de detritos celulares e de bactérias patogénicas, impedindo a sua acção lesiva sobre o parênquima retiniano.

As lipoproteínas são moléculas susceptíveis de sofrer oxidação. As lipoproteínas oxidadas são neurotóxicas e, por conseguinte, devido à constante exposição da retina à luz solar, existe a necessidade da sua rápida remoção do parênquima retiniano, prevenindo a acção deste estímulo lesivo sobre as células da retina. Os RS-A são receptores específicos para as LDL modificadas e são responsáveis pela captação de LDL oxidadas. Impedindo a acção lesiva destas moléculas sobre as células neuronais e sobre os vasos sanguíneos, as células Mato podem participar não só na manutenção da integridade do tecido retiniano mas também na preservação das estruturas vasculares.

Para além destes aspectos, o facto de os produtos avançados de glicação, as LDL modificadas e as células em apoptose constituírem ligandos específicos dos RS-A, reflecte uma possível participação das células Mato retinianas em processos patológicos com eles relacionados, tais como na retinopatia diabética, na degenerescência macular relacionada com a idade ou em qualquer outra retinopatia degenerativa. A circunstância de serem células que expressam constitutivamente estes receptores *scavenger*, coloca-as na situação de, provavelmente, constituírem um dos tipos celulares que mais precocemente estão envolvidos nestes processos, numa tentativa de rápida remoção do estímulo lesivo e de reparação tecidual. Por esta razão, as células Mato retinianas assumem um interesse particular, no sentido de melhor se compreenderem os mecanismos fisiopatológicos de determinadas retinopatias e de poderem, elas próprias, ser consideradas um possível alvo terapêutico no tratamento destas afecções.

Para garantir a manutenção de um meio apropriado para o bom funcionamento neuronal, a retina está dependente de uma barreira de difusão selectiva, a BHR, que exclui determinados elementos celulares e moleculares do parênquima retiniano, prevenindo a acção de possíveis estímulos lesivos sobre as células retinianas (Vinores, 1995; Abbott, 2002).

A permeabilidade da BHR, e portanto, o transporte de substâncias entre o sangue e o parênquima retiniano, depende da integridade estrutural desta barreira, entre outros factores (Correia, 1984).

A BHR interna é estabelecida, fundamentalmente, pelas células endoteliais dos vasos retinianos, unidas entre si por zónulas de oclusão, e por elementos estruturais adicionais, pericitos, membrana basal e membrana glial, que estão igualmente envolvidos no seu funcionamento (Cunha-Vaz, 2004).

Os pericitos fazem parte integrante da parede vascular. Reforçam estruturalmente a BHR, distribuindo-se de forma descontínua ao longo da túnica média dos capilares e das vénulas pós-capilares, completamente rodeados pela membrana basal.

Do mesmo modo, a membrana glial, formada pelos pés vasculares das células de Müller e dos astrócitos, que envolvem a parede dos vasos, reforça a BHR, apesar de constituir uma membrana descontínua, e de existirem áreas da parede vascular onde este revestimento falta.

Para além das células endoteliais, a membrana basal constitui o segundo componente estrutural da BHR que reveste de forma contínua todos os vasos sanguíneos (Wang *et al.*, 2006).

A marcação imunohistoquímica de retinas de murganho *in toto*, com o anticorpo anti-colagénio IV, revelou a existência de áreas da membrana basal da parede vascular com uma menor expressão desta proteína, sugerindo a existência de “descontinuidades” na estrutura da própria membrana basal.

Estas áreas de baixa expressão de proteínas na membrana basal foram também observadas na parede de vénulas cremastéricas de murganho, em situação fisiológica (Wang *et al.*, 2006).

A baixa expressão de colagénio IV, nestes vasos, está associada a uma baixa expressão de laminina e de outras proteínas da membrana basal, podendo atingir valores de menos de 60% que a média de expressão no mesmo vaso sanguíneo. Esta diminuição de densidade de expressão conduz ao aparecimento de redes de proteínas de malhas alargadas, originando “fendas” na estrutura da membrana basal, por onde podem passar livremente determinados elementos moleculares. Na presença de neutrófilos, em resposta a estímulos inflamatórios, estas malhas alargam ainda mais, criando vias preferenciais de passagem transmembranária de leucócitos e outros elementos moleculares (Wang *et al.*, 2006).

Estas áreas de “descontinuidade” ou “fendas” da membrana basal coincidem ainda com as zonas da parede vascular descritas por Baluk *et al.* (1998). Estes autores observaram, a nível do endotélio das vénulas traqueais, a formação de fendas na parede vascular em resposta a estímulos inflamatórios. As fendas assim formadas servem para a livre passagem de plasma sanguíneo ou de elementos celulares através da parede vascular.

A existência de zonas na membrana basal com baixa expressão de proteínas, em situação fisiológica, constituindo redes de proteínas de malhas alargadas, prestar-se-ia a uma mais fácil troca de macromoléculas entre o sangue e o parênquima retiniano, transformando a BHR numa barreira frangível. Contudo, em situação de integridade da BHR, e apesar de pequenas quantidades de proteínas em circulação (HRP e ac-LDL) atravessarem a BHR, esta passagem de substâncias em circulação para o parênquima retiniano não ocorre.

Curiosamente, na retina, coincidindo com estas áreas de descontinuidade da membrana basal, relativamente à expressão de colagénio IV, observámos a presença constante de células Mato.

A presença das células Mato coincide ainda com as zonas da parede vascular em que esta estrutura apresenta uma diminuição apreciável de espessura, que corresponde também à presença de uniões zonulares entre células endoteliais adjacentes e onde, para além disso, falta o revestimento da membrana glial.

No conjunto, estas particularidades estruturais da parede vascular definem áreas mais “frágeis” da BHR. O facto de a localização das células Mato coincidir justamente com as áreas mais vulneráveis da BHR, permite considerar estas células perivasculares com função *scavenger* como um elemento chave na manutenção da integridade estrutural desta barreira. Estas células parecem providenciar um revestimento adicional à parede vascular, uma vez que reforçam estruturalmente a BHR nas suas áreas mais frágeis, “selando”, para além disso, as descontinuidades existentes na membrana basal. As células Mato da retina contribuem, deste modo, para impedir a livre passagem de determinadas substâncias em circulação na corrente sanguínea para o parênquima retiniano.

O facto de, em situação de lesão da BHR, as lesões iniciais se observarem a nível das vénulas (Baluk, Bolton, Hirata, Thurston & MacDonald, 1998; Xu *et al.*, 2003; Xu, Dawson, Crane & Liversidge, 2005) poderá ter relação, precisamente, com a existência destas zonas mais vulneráveis da membrana basal da parede vascular. As células Mato, devido à sua localização e topografia, deverão constituir um elemento celular precocemente envolvido nas situações de alteração da permeabilidade da BHR e, por conseguinte, mais atenção deve ser dada ao possível papel destas células nestas circunstâncias que constituem uma das causas mais frequentes do desenvolvimento de lesões graves a nível da retina.

Contrariamente ao observado nos vasos da coroideia, que recebem inervação simpática e parassimpática, os vasos sanguíneos da retina não possuem inervação. Contudo, têm a capacidade de manter o fluxo sanguíneo constante, sob uma pressão de perfusão variável, adaptando-se a diferentes necessidades metabólicas, por meio de um mecanismo de auto-regulação. O tónus arterial é principalmente regulado por factores locais, factores físicos (variações da pressão de perfusão) e factores metabólicos (variações da pressão de oxigénio/dióxido de carbono e de pH). Estes estímulos determinam a libertação de substâncias vasodilatadoras ou vasoconstritoras pelas células endoteliais que, actuando sobre as células musculares e pericitos, contraindo-os ou relaxando-os, alteram o tónus e a permeabilidade vascular (Brown & Jampol, 1996; Delaey & Van De Voorde, 2000; Funk, 1997).

Existe alguma controvérsia relativamente à existência de esfíncteres musculares nas arteríolas retinianas que possam alterar o fluxo sanguíneo da retina. Kuwabara & Cogan (1960) descreveram, pela primeira vez, a existência de *anéis arteriolares* nos locais de ramificação das arteríolas retinianas, estruturas que estes autores consideraram poder estar envolvidas na regulação da circulação sanguínea. Na retina do murganho existem anéis

arteriolares, ao nível da origem das arteríolas pré-capilares que se destacam em ângulo recto das arteríolas de 2ª ordem (Ramos, 2008). Estas células, sob a acção de substâncias vasoactivas, contraindo-se ou relaxando-se, provocam a diminuição ou o aumento do lúmen vascular. O grau de contracção destas estruturas musculares, ao determinar variações no diâmetro dos vasos, tem, conseqüentemente, influência no volume de sangue que passa para a rede capilar. A vaso-actividade observada nos segmentos proximais das arteríolas pré-capilares, que se destacam em ângulos de 90°, pode explicar o papel dos anéis arteriolares na regulação do fluxo sanguíneo: perante um estímulo vasoconstritor, ocorre apenas na região proximal do vaso, onde se encontra o anel arteriolar, uma redução marcada do diâmetro do lúmen vascular. Esta determina um aumento da resistência vascular à passagem do sangue e a conseqüente diminuição do fluxo sanguíneo para a rede capilar a jusante (Yu, Cringle, Su & Yu, 2005).

A particular disposição tridimensional da árvore vascular retiniana em três plexos vasculares distintos, com os vasos de maior calibre presentes apenas nas camadas mais internas da retina, associada às particularidades morfofuncionais das arteríolas pré-capilares que se destacam em ângulo recto, determina a existência de um fluxo de sangue preferencial nos vasos presentes nos estratos mais internos da retina.

As células Mato surgem dispostas, exactamente, ao longo da parede dos vasos sanguíneos de maior calibre que se distribuem a esse nível e, por conseguinte, naqueles em que se verifica um fluxo de sangue preferencial.

Um outro aspecto das células Mato que, de alguma forma, amplifica a sua acção como células com função *scavenger* e de reforço estrutural da BHR, prende-se com a capacidade que estas células têm de se movimentar de forma alternada constante, ao longo da parede vascular.

As células da micróglia paravascular cerebral (Grossman *et al.*, 2002), assim como as células da micróglia perivascular retiniana (Xu *et al.*, 2008) têm também a capacidade de se movimentar ao longo dos vasos, mas apenas quando activadas. Contudo, o facto das células Mato se poderem movimentar continuamente, ao longo da parede vascular, mesmo em situação fisiológica, determina que estas células, para além de poderem “varrer” uma maior área do espaço perivascular, rapidamente e de modo preferencial, mais rapidamente se possam aproximar de um determinado local, quando necessário.



As células Mato cerebrais são células de origem mielóide, continuamente substituídas por monócitos circulantes, com uma elevada taxa de renovação; aproximadamente 30% destas células são substituídas durante um período de 3 meses, contrariamente às células da micróglia que apresentam uma taxa de renovação extremamente baixa, em que menos de 1% destas células é substituída durante um período de tempo igual (Hickey, Vass & Lassmann, 1992; Williams *et al.*, 2001). Apesar de algumas células Mato acabarem por morrer na sua localização perivascular, a grande maioria abandona o sistema nervoso central (Williams *et al.*, 2001).

Estudos em murganhos submetidos a transplantes de medula, revelaram que os monócitos provenientes da medula óssea dadora substituíam completamente todas as células da micróglia e todos os outros macrófagos retinianos, num período de aproximadamente seis meses (Xu *et al.*, 2007a). Porém, na ausência de estímulos inflamatórios, a retina pode permanecer sem receber células de origem mielóide em circulação por um período de tempo superior a um ano, sugerindo uma taxa de renovação das células da micróglia retiniana bastante lenta (Albini *et al.*, 2005), contrariamente às células macrofágicas perivascularares com uma taxa de renovação mais rápida (Gregerson & Yang, 2003).

Provavelmente as células Mato retinianas, à semelhança das células Mato cerebrais, têm também uma elevada taxa de renovação, circunstância que contribuiria seguramente para uma mais célere remoção das substância lesivas incorporadas por estas células com função *scavenger*.

O facto de as células Mato se fixarem na sua localização perivascular característica, pode ser explicado, em parte, por estas células expressarem constitutivamente RS-A. Estes receptores contêm um domínio colagenoso que constitui uma região de união específica ao colagénio IV (Gowen, Borg, Ghaffar & Mayer, 2001). A adesão das células Mato ao colagénio IV, por meio da sua ligação específica a esta proteína da matriz extracelular, poderá constituir o mecanismo capaz de impedir a sua saída do espaço perivascular.

Em situação de encefalopatia, as células Mato podem abandonar o sistema nervoso, deslocando-se ao longo do espaço perivascular, do espaço subaracnoideu, com o líquido céfalo-raquidiano, acabando por ser detectadas nos linfonodos regionais, ou, pelo contrário, se estas células incorporaram grandes quantidades de ligandos, podem permanecer na sua localização perivascular por longos períodos de tempo (Mato *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2001). Esta acumulação de células Mato e a sua interacção com o sistema imunitário

explicam a “vasocentricidade” das lesões observadas em algumas encefalopatias, como ocorre em situações de esclerose múltipla ou na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (Williams *et al.*, 2001).

Eventualmente, também as células Mato de retina podem apresentar um comportamento semelhante e a sua presença nos locais das lesões ser determinante para o desencadear da reacção inflamatória local e da resposta imunitária que se estabelece.

## **2. ASPECTOS FUNCIONAIS DAS CÉLULAS MATO DA RETINA**

### **2.1. FUNÇÃO SCAVENGER E CONTRIBUIÇÃO PARA A MANUTENÇÃO DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA**

Para além dos aspectos referidos, as particularidades da localização e topografia das células Mato sugerem, desde logo, que estas células constituem um elemento chave nas interacções entre o sangue e o parênquima retiniano.

Quando se injectou Dil-ac-LDL por via endovenosa, em murganhos saudáveis, observou-se que as células Mato da retina acumulavam esta substância. Duas horas após a injeção, a característica fluorescência vermelha do Dil foi observada em inclusões citoplasmáticas de aspecto granular nas células Mato da retina.

O colesterol é um dos principais reguladores da organização lipídica das membranas celulares e os mamíferos desenvolveram um conjunto de mecanismos para garantir o controlo dos níveis de colesterol, que devem manter-se constantes (Goldstein & Brown, 2001).

O colesterol pode ser sintetizado no retículo endoplasmático (Maxfield & Wunster, 2002), mas, normalmente, é captado pelas células por um processo de endocitose, ligando-se a receptores da membrana citoplasmática. No endossoma, a LDL, contendo mais de 1500 moléculas de colesterol, organizadas em torno de uma grande molécula proteica, separa-se

do seu receptor e forma-se colesterol livre, utilizado pelas células na síntese das membranas celulares (Goldstein & Brown, 2001).

As lipoproteínas em circulação parecem ser a principal fonte de colesterol da retina. Nas células do epitélio pigmentar da retina ocorre a endocitose de LDL, proveniente da circulação coroideia. As células do epitélio pigmentar, posteriormente, exportam a LDL, disponibilizando-a às células retinianas (Hayes, Lindsey, Stephan & Brecker, 1989).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que, em retinas saudáveis, sem rotura da BHR, as células Mato, munidas de RS-A, captam e acumulam ac-LDL. Como estes receptores *scavenger* também se ligam especificamente às LDL, este resultado sugere que, na retina, para além das células do epitélio pigmentar, também as células Mato poderão estar envolvidas na captação e acumulação de LDL em circulação.

O facto de as células Mato terem a capacidade de acumular LDL confere a estas células um possível envolvimento na homeostasia do colesterol a nível da retina e um papel central na patogenia de afecções decorrentes da acumulação desta substância, como é o caso da degenerescência macular relacionada com a idade.

A retina está constantemente exposta à acção oxidativa da luz solar, à qual as lipoproteínas, e os lípidos em geral, são particularmente sensíveis. Estas substâncias quando oxidadas têm um efeito neurotóxico (Bassett *et al.*, 1999). A acção oxidativa produzida pela constante irradiação da luz solar, torna indispensável uma rápida remoção dos lípidos oxidados, de forma a prevenir lesões neuronais. A afinidade dos RS-A para lipoproteínas oxidadas, associado ao facto de, em situação fisiológica, estes receptores se expressarem nas células Mato, sugere também o envolvimento deste tipo particular de macrófagos residentes perivasculares na remoção destas substâncias do parênquima retiniano.

Efectivamente, a retina requer um controlo estrito do meio extracelular para garantir um funcionamento neuronal normal (Vinores, 1995). A BHR, constituída pelo endotélio vascular, componente interno, e pelo epitélio pigmentar da retina, componente externo (Holash & Stewart, 1993), regula o meio extracelular da retina através da exclusão de macromoléculas em circulação (Dermietzel & Krause, 1991). No entanto, os resultados apresentados

mostraram que pequenas quantidades de proteínas em circulação (HRP ou ac-LDL) conseguem passar através do endotélio vascular, numa situação de integridade da BHR.

Esta situação também ocorre na barreira hemato-encefálica, onde a população de células Mato capta e acumula proteínas, impedindo a sua passagem para o parênquima cerebral e, desta forma, qualquer interferência com o normal funcionamento neuronal (Mato *et al.*, 1993 e 1996).

As células Mato da retina apresentam igualmente a capacidade de acumular macromoléculas em circulação, sem rotura da BHR. A ausência de HRP no parênquima retiniano, seis horas após a injeção endovenosa desta enzima, numa dose três vezes superior à normalmente utilizada em estudos de integridade da barreira, ou de ac-LDL, duas horas após a sua injeção endovenosa, e a acumulação destas substâncias exclusivamente nas células Mato, indicia o importante papel destas células com função *scavenger* no funcionamento da BHR.

A acumulação de HRP e de ac-LDL, apenas nas células Mato, sugere que a exocitose destas substâncias foi mínima ou mesmo nula, razão pela qual não se encontrou nenhuma delas no parênquima retiniano. As células Mato constituem, possivelmente, um importante elemento estrutural que concorre com a BHR na exclusão destas macromoléculas do parênquima retiniano.

As células Mato da retina, na sua localização perivascular estratégica, providenciado um revestimento adicional a áreas mais facilmente transponíveis da BHR, e sendo as únicas que em situação fisiológica actuam como células com função *scavenger*, captando e acumulando substâncias em circulação, que provavelmente foram capazes de atravessar a parede vascular, através das áreas mais vulneráveis referidas, devem ser consideradas como um componente fundamental de reforço estrutural da BHR, particularmente envolvidas na exclusão de determinadas substâncias do parênquima retiniano.

### 2.2. ENVOLVIMENTO NA HOMEOSTASIA DO FERRO NA RETINA

De uma forma geral, a necessidade das células em ferro prende-se com a participação deste elemento na constituição de várias enzimas, envolvidas de forma ubíqua no metabolismo celular (Zakin, 1989; Hentze & Kühn, 1996).

A retina, especificamente, necessita de ferro devido à sua presença na constituição da enzima guanilato ciclase, enzima fundamental para a síntese de cGMP, segundo mensageiro na cascata de fototransdução (Yau & Baylor, 1989). Mas, para além disso, a retina é particularmente dependente do ferro devido à contínua necessidade de síntese de membranas, para suprir a contínua renovação dos segmentos externos dos fotorreceptores que requer este elemento como co-factor essencial (Hahn *et al.*, 2004a).

Um outro aspecto do metabolismo do ferro na retina que merece atenção, prende-se com o facto de a acumulação de ferro estar associada a diversas afecções retinianas de cariz degenerativo, incluindo a degenerescência macular relacionada com a idade, a principal afecção retiniana degenerativa responsável pela perda irreversível da função visual no homem (Hahn *et al.*, 2004a). Um excesso de ferro, sob a forma de  $\text{Fe}^{2+}$ , resulta na formação de radicais livres, pela reacção de Fenton, com a consequente morte celular por apoptose (Nathan & Xie, 1994).

À semelhança de outros tecidos, a retina obtém ferro a partir do sistema circulatório (Yefimova *et al.*, 2000). De uma forma geral, sabe-se que o aporte de ferro ocorre por um processo de endocitose, mediado por receptores da transferrina, a nível quer das células do epitélio pigmentar da retina quer das células endoteliais retinianas (Hunt *et al.*, 1989; Burdo *et al.*, 2003), embora possa também ocorrer a reciclagem do ferro a partir da degradação dos segmentos externos dos fotorreceptores fagocitados (Hahn *et al.*, 2004b).

A transferrina endocitada liberta o ferro, pela acidificação do pH do endossoma, e o ferro, sob a forma de  $\text{Fe}^{2+}$ , sai do endossoma por meio de um transportador de membrana. O endossoma regressa então à membrana plasmática, onde a transferrina fica disponível para se ligar a novas moléculas de ferro (Kurz *et al.*, 2008).

O íão  $\text{Fe}^{2+}$  pode acumular-se na célula, sob a forma de ferritina citosólica ou de ferritina mitocondrial ou então sair da célula (Hahn *et al.*, 2004a).

O ferro é transportado para fora da célula por um processo mediado pela proteína ferroportina (Hahn *et al.*, 2004a). Depois de oxidado pelas enzimas ceruloplasmina e hefaestina, transformando-se em íão  $\text{Fe}^{3+}$ , o ferro pode, novamente, ser transportado pela transferrina (Hahn *et al.*, 2004a).

Na retina, o ferro ligado à transferrina pode ser endocitado, ao longo das diferentes camadas retinianas (Yefimova *et al.*, 2000).

As células regulam a homeostasia do ferro, em parte, através da regulação dos mecanismos de transporte e de acumulação deste elemento, em função das suas necessidades metabólicas (Hahn *et al.*, 2004a).

Embora o transporte mediado pela transferrina seja considerado o principal mecanismo para o aporte de ferro às células, recentemente, a ferritina, considerada tradicionalmente como uma proteína de armazenagem intracelular de ferro, foi proposta como uma nova proteína de transporte de ferro (Fisher *et al.*, 2007).

A ferritina é um constituinte normal do plasma sanguíneo (Addison *et al.*, 1972) e pode incorporar mais de 4500 átomos de ferro, enquanto a transferrina apenas pode conter 2 átomos deste elemento (Harrison & Arosio, 1996).

A ferritina pode ser transportada através das células endoteliais dos vasos retinianos (Fisher *et al.*, 2007), o que sugere que a ferritina poderá existir na retina, como proteína transportadora de ferro, disponibilizando livremente grandes quantidades deste elemento para o metabolismo celular.

Os resultados apresentados mostraram que nas células Mato da retina existem receptores de ferritina TIM-2 e que a ferritina, em circulação na corrente sanguínea, pode ser captada por estas células, provavelmente, por meio de um processo de endocitose, mediado por estes receptores.

A existência deste novo mecanismo de aporte de ferro à retina, assume a maior importância no metabolismo retiniano do ferro, dada a grande quantidade de átomos de ferro que uma só molécula de ferritina pode transportar.

A acumulação da ferritina de baço de cavalo, exclusivamente nas células Mato retinianas, mostrou que, a nível do componente interno da BHR, apesar de poder ocorrer a passagem de grandes quantidades de ferro para a retina, por meio de um processo de endocitose de ferritina, o ferro não passa livremente para o parênquima retiniano. As células Mato têm a capacidade de captar e acumular grandes quantidades de ferro ligado à ferritina, permitindo manter os níveis de ferro na retina dentro dos limites necessários para o metabolismo celular.

A captação e acumulação de ferritina nas células Mato, impedindo a livre passagem de grandes quantidades de ferro para a retina, representa um possível papel das células Mato retinianas na homeostasia do ferro, evitando o aumento dos níveis deste elemento na retina e as consequências nefastas da sua acumulação, como ocorre na degenerescência macular relacionada com a idade.

Em murganhos com deficiente recrutamento de macrófagos, observa-se a formação de depósitos de ferro no espaço sub-retiniano, acompanhada de neovascularização, pelo que se considera que a acumulação de ferro, associada a uma diminuição da remoção deste elemento pelos macrófagos, poderá estar na origem do aparecimento das lesões que levam ao aparecimento da degenerescência macular relacionada com a idade (Hahn *et al.*, 2004b).

Dado que a ferritina pode atravessar a BHR, em condições normais (Fisher *et al.*, 2007), transportando grandes quantidades de ferro, o envolvimento das células Mato no metabolismo deste elemento e, em consequência, nas afecções associadas a alterações da sua homeostasia, obrigam a mais estudos para que se possam compreender melhor os complexos mecanismos de regulação dos níveis de ferro na retina.

Menos atenção se tem dado aos mecanismos através dos quais o ferro abandona a retina. Pensa-se que existem duas vias principais de saída deste elemento: ou através das células do epitélio pigmentar da retina, lançando o ferro na circulação coroideia, ou através das células de Müller, lançando o ferro na cavidade vítrea do bulbo ocular (Hahn *et al.*, 2004a). Mais estudos devem ser realizados para esclarecer este aspecto. Contudo, parece ser

possível que, também nos mecanismos de remoção de ferro em excesso na retina, ocorra a participação das células Mato, atendendo à função *scavenger* característica destas células.

### 2.3. PARTICIPAÇÃO NOS PROCESSOS DE RETINOPATIA

Em condições fisiológicas, as células Mato e as células da micróglia apenas se observam nas camadas mais internas da retina. Não se encontram células Mato nem células da micróglia nas camadas nuclear externa e de cones e bastonetes. No entanto, os resultados apresentados mostraram que, em situação de retinopatia, com degenerescência dos fotorreceptores, as células Mato migraram da sua localização perivascular para o local das lesões, numa fase precoce do processo degenerativo.

A contínua reciclagem de segmentos externos dos fotorreceptores é fundamental no processo de regeneração dos cones e bastonetes. As células do epitélio pigmentar da retina, por meio do seus receptores *scavenger* CD36, assumem a responsabilidade da remoção diária dos segmentos externos dos fotorreceptores (Ryeom *et al.*, 1996).

A degenerescência dos fotorreceptores obriga a uma mais rápida remoção da grande quantidade de detritos celulares, ultrapassando a capacidade das células do epitélio pigmentar da retina. Por esta razão, no decurso do desenvolvimento das lesões degenerativas, a fagocitose dos detritos celulares, por células macrofágicas, assume um papel fundamental (Kiuchi *et al.*, 2002). Estas células macrofágicas migram das camadas mais internas da retina e não provêm da circulação coroideia (Ng & Streilein, 2001).

As células do epitélio pigmentar da retina, carregadas com os detritos celulares dos fotorreceptores fagocitados, produzem citocinas responsáveis pela migração das células macrofágicas para o local das lesões (Zhang *et al.*, 2005a). Vários grupos de investigadores têm observado a migração de células da micróglia para o espaço sub-retiniano, no decurso de processos de retinopatia de diferentes etiologias (Ng & Streilein, 2001; Chen *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005a e 2005b).



Recentemente identificado, o anticorpo 5D4 reage especificamente com o proteoglicano de sulfato de queratano. O 5D4 constitui um marcador específico das células da micróglia que, para além disso, não marca as células monocíticas de origem sanguínea, pelo que a marcação imunohistoquímica com este marcador permite diferenciar estes dois tipos celulares (Jander & Stoll, 1996).

Na degenerescência dos fotorreceptores, induzida pela acção da luz, as células da micróglia são activadas e migram das camadas internas da retina para a camada nuclear externa e para o espaço sub-retiniano. Contudo, nas fases iniciais do processo de retinopatia, apenas células macrofágicas 5D4-negativas se observam nas camadas externas da retina (Ng & Streilein, 2001; Zhang *et al.*, 2005).

As células da micróglia retiniana são 5D4-positivas, pelo que as primeiras células a migrar para os locais das lesões, são células macrofágicas com um fenótipo diferente, que não podem ser classificadas como células da micróglia. Os microgliócitos aparecem nos locais das lesões apenas em fases mais tardias do processo degenerativo dos fotorreceptores (Ng & Streilein, 2001; Zhang *et al.*, 2005)

De igual forma, Zhang *et al.* (2005) observaram a migração precoce de células macrofágicas 5D4-negativas, para o local das lesões, após isquémia da retina.

As células Mato cerebrais participam nos processos de encefalopatia, providenciando a remoção de produtos e detritos celulares do espaço extracelular. São as primeiras células a ser afectadas nestas circunstâncias, estando envolvidas na activação e migração das células da micróglia para os locais das lesões (Mato *et al.*, 1996, 1998 e 2001).

No modelo de retinopatia em murganho, induzida pela acção do iodato de sódio, utilizado neste trabalho, observaram-se também células Mato (BM8-positivas) na camada nuclear externa, numa fase inicial da degeneração dos fotorreceptores, sugerindo que as células Mato constituem um tipo celular que migra da sua localização perivascular para o local das lesões no início dos processos de retinopatia.

As células 5D4-negativas, a que se referem as observações de Zhang *et al.* (2005) e de Ng & Streilein (2001), correspondem, provavelmente, a células Mato que, uma vez no local das lesões, tal como ocorre com as células Mato cerebrais, podem influenciar a activação e migração das células da micróglia para os locais das lesões, através da produção e libertação de citocinas (Mato *et al.*, 1998).

A circunstância de serem as células Mato um dos primeiros, se não o primeiro, tipo celular que, nas fases iniciais do desenvolvimento das lesões, migra para os locais afectados da retina, confere a estas células um papel fundamental nos processos degenerativos e na resposta inflamatória que se inicia.

Provavelmente, as particularidades morfológicas e topográficas das células Mato, designadamente, a presença de expansões citoplasmáticas, adaptadas ao seu constante movimento ao longo da parede vascular, e a sua íntima relação com as células de Müller, podem ajudar a compreender a sua migração para o local das lesões nas fases iniciais dos processos degenerativos.

As células de Müller, cujo citoplasma atravessa toda a retina, estendendo-se desde a câmara vítrea do bulbo ocular até à membrana limitante externa, estão em contacto directo com as células Mato, revestindo-as, na sua superfície abluminal, com os seus pés vasculares.

No início do desenvolvimento das lesões degenerativas, a gliose reactiva destas células da nevrógia, constitui um evento determinante na resposta aos estímulos lesivos sobre a retina (Kiuchi *et al.*, 2002) e a relação privilegiada entre estes dois tipos celulares poderá determinar a rápida migração das células Mato para o local das lesões, antes de qualquer outro tipo celular. Para além disso, as células de Müller, cujo citoplasma atravessa toda a espessura da retina, podem providenciar também um guia para o trajecto de acesso mais directo, de forma a que as células Mato mais rapidamente atinjam o local das lesões.

As células Mato, munidas de RS-A, constituem, seguramente, um auxiliar fundamental na remoção dos detritos celulares produzidos nas fases iniciais da resposta inflamatória. E, à semelhança do descrito para as células Mato cerebrais (Mato *et al.*, 1996, 1998 e 2001), as células Mato retinianas poderão, do mesmo modo, estar envolvidas na posterior activação e recrutamento de células da micróglia, por meio da libertação de citocinas.

Na degenerescência macular relacionada com a idade, observa-se a chegada de macrófagos, provenientes da circulação coroideia, ao espaço sub-retiniano (Ambati *et al.*, 2003). Os resultados apresentados, relativamente ao envolvimento das células Mato nos processos de retinopatia, no modelo experimental utilizado, com degenerescência das células do epitélio pigmentar da retina, seguidas do aparecimento de lesões nos fotorreceptores, sugerem que, também nas fases iniciais da degenerescência macular relacionada com a idade, as células Mato podem estar envolvidas, na tentativa de eliminação dos detritos celulares acumulados e de regeneração das lesões, migrando da sua localização perivascular para as áreas afectadas, nas camadas mais externas da retina.

Neste sentido, é importante ter em consideração o papel das células Mato em qualquer processo degenerativo retiniano, por constituírem uma população celular que nas fases iniciais migra para o local das lesões, por, provavelmente, estarem envolvidas no processo de activação das restantes células que participam na resposta inflamatória e, sobretudo, por poderem constituir um alvo terapêutico numa fase relativamente precoce do desenvolvimento das lesões.

A nível ocular, onde as particularidades anatómicas e a transparência dos tecidos têm de ser mantidos, no sentido de providenciar a perfeita focagem das imagens na retina, a integridade das estruturas obriga à minimização dos estímulos lesivos que possam determinar o desenvolvimento de lesões que afectem a função visual.

O imuno-privilégio da retina, à semelhança de outros tecidos com necessidades fisiológicas específicas e sem capacidade de regeneração, decorre da necessidade de protecção contra os agentes patogénicos (Streilein, 2003). A resposta imunitária pode causar danos nos tecidos e o imuno-privilégio é encarado como uma adaptação evolutiva que permite uma protecção local que não interfere com a função visual e que, simultaneamente, previne a perda de células sem capacidade de regeneração, mantendo a estrutura e a transparência da retina para que esta estrutura possa receber os estímulos luminosos nas melhores condições (Streilein, 2003).

Até há algum tempo, pensava-se que o imuno-privilégio na retina era mantido, fundamentalmente, por um conjunto de factores nos quais se incluía a presença da barreira hemato-retiniana (providenciando um certo grau de isolamento, limitando a passagem

de linfócitos T não activados), a ausência de drenagem linfática e a incapacidade de produção de resposta imunitária a nível local. No entanto, esta perspectiva foi contrariada pela observação da existência de resposta imunitária a nível retiniano (Chen *et al.*, 2002).

A resposta imunitária está dependente da intervenção de células apresentadoras de antigénio (MHC-II positivas) para a activação de linfócitos T. A apresentação antigénica na retina teria, por conseguinte, de ocorrer por um dos seguintes processos: ou resultar da saída dos antigénios do parênquima retiniano ou resultar da apresentação destes antigénios, a nível do sistema imunitário periférico ou a nível da própria retina, pelas células apresentadoras de antigénio (Gregerson & Yang, 2003).

A apresentação antigénica é, efectivamente, uma das funções dos macrófagos, considerada como a interface entre a resposta imunitária inata e adaptativa (Roitt *et al.*, 2001).

As células Mato cerebrais expressam constitutivamente MHC-II (Mato *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2001). Têm, portanto, a capacidade de processar e apresentar determinados peptídeos antigénicos a linfócitos T, activando-os e, desta forma, desempenhando um papel fundamental no desencadeamento e na manutenção da resposta imunitária face a determinado antigénio.

Apesar de durante muito tempo se considerar a retina como um tecido destituído de células com expressão de MHC-II, vários autores têm vindo a descrever a presença de células macrófágicas que expressam constitutivamente este epitopo, associado à apresentação antigénica e promoção da resposta imunitária (Dick *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2007b). Contudo, a expressão de MHC-II está confinada a um pequeno número de células, tais como células dendríticas e alguns tipos de macrófagos perivasculares. As células da micróglia não apresentam expressão constitutiva de MHC-II (Zhang, Wu, Ishimoto, Pararajasegaram & Rao, 1997; Streilein, 2003)

Em estudos de transplante de medula, observou-se a presença de células dadoras, MHC-II positivas, numa localização perivascular, associadas aos vasos retinianos (Zhang *et al.*, 1997), sugerindo que na retina existem células imunocompetentes, derivadas da medula óssea, envolvidas na resposta imunitária, que actuam como células apresentadoras de antigénio a linfócitos T.

A uveoretinite auto-imune experimental (UAE) é uma inflamação intra-ocular induzida pelo antígeno solúvel retiniano (antígeno-S). É uma afecção mediada por linfócitos T, frequentemente utilizada em modelos de retinopatia em murganhos. A UAE tem início na neuro-retina, especificamente ao redor dos vasos retinianos (Zhang *et al.*, 1997), indiciando que nesse local se dá a passagem de linfócitos T ativados e o encontro com o antígeno específico.

Os linfócitos T ativados conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica e, através da produção de interferon- $\gamma$ , activar a expressão de MHC-II nas células da micróglia, ampliando, deste modo, a resposta imunitária (Hickey, 1991).

Os linfócitos T ativados conseguem atravessar a BHR, provavelmente nas zonas de baixa expressão de proteínas da membrana basal das vénulas, à semelhança do que se observa nas vénulas cremastéricas de murganho (Wang *et al.*, 2006).

As células Mato cerebrais são células apresentadoras de antígeno. A sua localização permite-lhes incorporar antígenos, abandonar o sistema nervoso e levá-los para os linfonodos regionais. Estas células, apesar de constituírem uma pequena população celular, são, por esta razão, importantes células imuno-reguladoras, que estabelecem a ligação entre o sistema nervoso central e o sistema imunitário periférico (Williams *et al.*, 2001).

A similitude das características morfofuncionais, de localização e topografia entre estas células e as células Mato da retina, sugere que também as células Mato retinianas devem expressar constitutivamente o epitopo de MHC-II e, em consequência, funcionar como células apresentadoras de antígeno, com um possível envolvimento no início e na manutenção da resposta imunitária a nível da retina.

A população de células macrofágicas perivasculares retinianas descritas, que apresentam uma elevada expressão de MHC-II, recrutadas a partir de monócitos em circulação, e que funcionam como células apresentadoras de antígeno (Gregerson & Yang, 2003; Gregerson, Sam & McPherson, 2004), corresponde, provavelmente, a células Mato, e, neste sentido, as células Mato devem ser consideradas, eventualmente, uma população celular imunocompetente, envolvidas na defesa contra organismos patogénicos, na imuno-regulação e na reparação tecidular.

Para muitas retinopatias com degenerescência dos fotorreceptores, causadoras, portanto, de perda de visão, não existe ainda um tratamento eficaz. A possibilidade de recorrer aos transplantes de retina ou a implantes de próteses visuais afigura-se como uma das soluções que permitiriam recuperar a função visual. Contudo, a sua rejeição tem sido um obstáculo impeditivo do êxito deste tipo de solução (Ng & Streillein, 2001).

Em estudos de transplantes de retina, refere-se que a rejeição dos enxertos resulta principalmente da presença de células macrofágicas retinianas MHC-II positivas, que se deslocam para o espaço sub-retiniano, onde é colocado o enxerto, e que seriam as responsáveis pela resposta imunitária que se estabelece (Ng & Streillein, 2001). Uma vez que as células da micróglia não activadas não expressam MHC-II, é possível que as células em causa sejam células Mato. A caracterização do possível envolvimento das células Mato na resposta imunitária torna-se, por esta razão, premente e a compreensão da sua possível participação nestes processos de rejeição de enxertos de retina poderá trazer algumas soluções relativamente a esta abordagem cirúrgica no tratamento das retinopatias com degenerescência dos fotorreceptores.

Apesar de todos os aspectos por caracterizar, as células Mato retinianas surgem como uma nova população de células retinianas com características da maior relevância em diversos aspectos da manutenção da homeostasia, a nível retiniano. O seu envolvimento nos processos de retinopatia indicia um importante papel na resposta local inflamatória e imunitária, na tentativa de eliminação dos estímulos lesivos e na regeneração tecidual. A importâncias destas células tem um significado especial, se considerarmos o facto de também se encontrarem células Mato na retina humana.

Dadas as particularidades da retina, e pelo facto das células Mato participarem nas fases iniciais dos processos de retinopatia, estas constituem um possível alvo terapêutico a considerar como solução, desde as fases mais precoces do aparecimento das lesões. Inclusivamente, a possível migração destas células para o espaço sub-retiniano, causando a rejeição dos enxertos de retina, poderá de alguma forma ser contornada, depois de melhor caracterizada a participação destas células na resposta imunitária.



# **CONCLUSÕES**





**CONCLUSÕES**

1. As retinas humanas e de murganho apresentam células Mato, em situação fisiológica, com características similares às descritas para as células Mato cerebrais.
2. As células Mato retinianas estão presentes ao longo de toda a vida e não apenas durante o envelhecimento.
3. As células Mato retinianas emitem fluorescência devido ao conteúdo em lípidos oxidados dos seus corpos de inclusão.
4. As células Mato retinianas localizam-se no espaço perivascular, entre a membrana basal dos vasos sanguíneos e a membrana glial, distribuindo-se ao longo dos vasos de maior calibre presentes nos estratos retinianos mais internos.
5. As células Mato da retina constituem uma sub-população de macrófagos perivasculares, distinta das células da micróglia, uma vez que expressam constitutivamente o epitopo BM8 e receptores *scavenger* da classe A, representando cerca de 20% do total de macrófagos residentes da retina.
6. As células Mato da retina estão em contacto directo com a membrana basal, em áreas da parede vascular onde falta o revestimento da membrana glial, coincidindo com zonas de menor espessura da parede dos vasos sanguíneos e com a presença de junções zonulares entre células endoteliais adjacentes.
7. As células Mato da retina surgem apostas a áreas da membrana basal com baixa expressão de colagénio IV, providenciando um revestimento adicional a estas áreas de “descontinuidade” da membrana basal dos vasos sanguíneos.
8. As células Mato retinianas funcionam como células *scavenger*, em situação fisiológica, captando e acumulando HRP, ac-LDL e ferritina em circulação na corrente sanguínea, auxiliando a BHR na exclusão destas substâncias do parênquima retiniano.

## CONCLUSÕES

---

9. Em situação fisiológica, as células Mato da retina movimentam-se, ao longo da parede vascular, num movimento oscilatório, contribuindo para o funcionamento da BHR.
10. As células Mato da retina captam e acumulam ferritina plasmática por um processo de endocitose mediado pelos receptores TIM-2. A endocitose de ferritina plasmática pelas células Mato retinianas constitui um novo mecanismo de armazenagem de ferro na retina.
11. As grandes quantidades de ferro acumuladas nas células Mato, sob a forma de ferritina, sugere um papel fundamental destas células na homeostasia do ferro, a nível da retina, e nas afecções retinianas decorrentes da sua alteração.
12. As células Mato retinianas migram da sua localização perivascular para o local das lesões, nas fases iniciais da degenerescência dos fotorreceptores, num modelo de retinopatia em murganho induzida pela injeção de iodato de sódio. Em situação de retinopatia, com degenerescência dos fotorreceptores, também as células Mato da retina humana são observadas no local das lesões.
13. A presença de células Mato na retina, detentoras das características morfofuncionais referidas, abre uma nova perspectiva para a melhor compreensão de determinados mecanismos fisiopatológicos retinianos, imputando-se a estas células um importante papel na manutenção da homeostasia retiniana e nos processos de retinopatia.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O início da caracterização dos aspectos morfológicos e funcionais das células Mato da retina abriu um leque de questões que merecem um estudo posterior detalhado, no sentido de melhor compreender o envolvimento destas células na manutenção da homeostasia da retina e nos processos de retinopatia.

Designadamente, o estudo de retinas por meio das técnicas imunohistoquímicas, com recurso a uma bateria mais alargada de anticorpos, providenciará a possibilidade de efectuar uma caracterização morfofuncional mais completa desta população celular retiniana.

A existência de áreas da membrana basal com baixa expressão de colagénio IV sugere a possibilidade de também ocorrerem variações na expressão das restantes proteínas constituintes da membrana basal. O estudo dos aspectos relativos à constituição da membrana basal, bem como à sua possível variação, nos diferentes tipos de vasos sanguíneos retinianos, em diferentes condições, representa um desafio aliciante, por forma a melhor compreender os mecanismos envolvidos na passagem de elementos celulares e moleculares em circulação para o parênquima retiniano, bem como o papel das células Mato nas interacções entre o sangue e o parênquima retiniano.

Sendo a função *scavenger*, em situação fisiológica, uma das particularidades mais notáveis destas células, todos os aspectos referentes à remoção das substâncias potencialmente neurotóxicas do parênquima retiniano necessitam de uma análise detalhada. Especificamente, o conhecimento das vias de saída das células Mato do parênquima retiniano torna-se determinante para o completo entendimento deste mecanismo.

O estudo da participação das células Mato nos processos de retinopatia constitui um tema de grande importância. Os resultados deste trabalho permitem antever um papel central das células Mato retinianas na patogenia destas afecções, embora todos os aspectos relacionados com os mecanismos de quimiotactismo destas células para os locais das lesões, o seu possível envolvimento na activação e migração das células da micróglia, bem como em toda a evolução das lesões, tenham ainda ficado por determinar.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

A necessidade de caracterizar o papel das células Mato no metabolismo lipídico e do ferro e as implicações clínicas que advêm da sua alteração, representam igualmente áreas de estudo a desenvolver, no sentido de se poderem ver esclarecidos vários aspectos fisiológicos fundamentais e as consequências da sua alteração, a nível retiniano.

A função das células Mato como células apresentadoras de antigénio e o seu envolvimento na resposta imunitária constituem igualmente aspectos a estudar. O conhecimento da participação destas células na resposta imunitária poderá ser um auxiliar importante para a compreensão da patogenia das afecções retinianas e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas a estabelecer.

Apesar de todos os aspectos por caracterizar, o estabelecimento da presença de células Mato na retina pode representar uma nova perspectiva na interpretação de um conjunto de aspectos funcionais deste tecido, assim como na compreensão de muitos outros aspectos observados em situação de retinopatia, podendo representar uma importante contribuição para a resolução de alguns problemas de diminuição ou perda da função visual.

# **BIBLIOGRAFIA**





## BIBLIOGRAFIA

- Abbott, N.J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200, 629-638.
- Acarin, L., Vela, J.M., González, B. & Castellano, B. (1994). Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 42, 1033-1041.
- Addison, G.M., Beamish, M.R., Hales, C.N., Hodgkins, M., Jacobs, A. & Llewellyn, P. (1972). An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology*, 25, 326-329.
- Aiello, L.P., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., Ferris, F.L. 3<sup>rd</sup> & Klein, R. (1998). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 21, 143-156.
- Albini, T.A., Wang, R.C., Reiser, B., Zamir, E., Wu, G.S. & Rao, N.A. (2005). Microglial stability and repopulation in the retina. *The British Journal of Ophthalmology*, 89, 901-903.
- Alm, A. & Bill, A. (1973). Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Experimental Eye Research*, 15, 15-29.
- Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B.C., Kruziel, W.A., Rollins, B.J. & Ambati, B.K. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nature Medicine*, 9, 1390-1397.
- Anderson, D., Mullins, R., Hageman, G. & Johnson, L.V. (2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *The American Journal of Ophthalmology*, 134, 411-431.
- Anderson, W.R., Martella, A., Drake, Z.M., Hu, S., Peterson, P.K. & Chao, C.C. (1995). Correlative transmission and scanning electron microscopy study of microglia activated by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro. *Pathology Research and Practice*, 191, 1016-1022.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Bronson, S.K., Freeman, W.M., Gardner, T.W., Jefferson, L.S., Kester, M., Kimball, S.R., Krady, J.K., LaNoue, K.F., Norbury, C.C., Quinn, P.G., Sandrasegarane, L. & Simpson, I.A. (2006). Perspectives in diabetes. Diabetic retinopathy. Seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*, 55, 2401-2411.
- Azevedo, C. (2006). *Biologia Celular e Molecular*. Lisboa: Lidel, Edições Técnicas, Lda.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Baluk, P., Bolton, P., Hirata, A., Thurston, G. & McDonald, M. (1998). Endothelial gaps and adherent leukocytes in allergen-induced early and late phase plasma leakage in rat airways. *The American Journal of Pathology*, 152, 1463-1476.
- Bamforth, S.D., Lightman, S.L. & Greenwood, J. (1997). Ultrastructural analysis of interleukin-1 beta-induced leukocyte recruitment to the rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 25-35.
- Bancroft, J.D. & Gamble, M. (2002). *Theory and practice of histological techniques*. (5th ed.). Churchill Livingstone, pp. 201-230.
- Bányász, I., Bokodi, G., Vannay, A., Szebeni, B., Treszl, A., Vászárhelyi, B., Tulassay, T. & Szabo, A. (2006). Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2 in retinopathy of prematurity. *Current Eye Research*, 31, 685-690.
- Barber, A.J. (2003). A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27, 283-290.
- Barnett, K.C., Crispin, S.M., Lavach, J.D. & Matthews A.G. (1995). *Color atlas and text of equine ophthalmology*. London: Mosby-Wolfe.
- Bassett, C.N., Neely, M.D., Sidell, K.R., Markesbery, W.R., Swift, L.L. & Montine, T.J. (1999). Cerebrospinal fluid lipoproteins are more vulnerable to oxidation in Alzheimer's disease and are neurotoxic when oxidized ex vivo. *Lipids*, 34, 1273-1280.
- Blanks, J.C. & Johnson, L.V. (1984). Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25, 546-557.
- Bristow, E.A., Griffiths, P.G., Andrews, R.M., Johnson, M.A. & Turnbull, D.M. (2002). The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Archives of Ophthalmology*, 120, 791-796.
- Brown, S. & Jampol, L. (1996). New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Archives of Ophthalmology*, 114 (2), 199-204.
- Brownlee, M. (2004). The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Burdo, J.R., Antonetti, D.A., Wolper, E.B. & Connor, J.R. (2003). Mechanisms and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system. *Neuroscience*, 121, 883-90.
- Buttery, R.G., Hinrichsen, C.F.L., Weller, W.L. & Haight, J.R. (1991). How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vision Research*, 31, 169-187.
- Caldwell, I. R.B. & McLaughlin, B.J. (1983). Permeability of retinal pigment epithelial cell junctions in the dystrophic rat retina. *Experimental Eye Research*, 36, 415-427.

- Carlson, B. M. (1999). *Human embryology and developmental biology*. (2nd ed.) Missouri: Mosby, Inc.
- Chader, G.D. (2002). Animal models in research on retinal degeneration: past progress and future hope. *Vision Research*, 42, 393-399.
- Chan, A., Magnus, T. & Gold, R. (2001). Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia*, 33, 87-95.
- Chase, J. (1982). The evolution of retinal vascularization in mammals. *Ophthalmology*, 89, 1518-1525.
- Chen, L., Yang, P. & Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10, 27-39.
- Chen, T., Li, L., Chung, D., Allen, C.D.C., Torti, S.V., Cyster, L.G., Chen, C., Brodsky, F.M., Niemi, E.C., Nakamura, M.C., Seaman, W.E. & Daws, M.R. (2005). TIM-2 is expressed on B cells and liver and Kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 202, 955-965.
- Cheung, N., Klein, R., Wang, J.J., Cotch, M.F., Islam, A.F., Klein, B.E., Cushman, M. Wong, T.Y. (2008). Traditional and novel cardiovascular risk factor for retinal vein occlusion: the multiethnic study of atherosclerosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 4297-4302.
- Chew, L.J., Takanohashi, A. & Bell, M. (2006). Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 12, 105-112.
- Clemons, T.E., Milton, R.C., Klein R., Seddon, J.M. & Ferris, F.L. (2005). Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology*, 112, 533-539.
- Connolly, S.E., Hores, T.A., Smith, L.E. & D'Amore, P.A. (1988). Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvascular Research*, 36, 275-290.
- Cooke, R.W.I., Drury, J.A., Mountford, R. & Clark, D. (2004). Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 1712-1715.
- Correia, M. (1984). *Vascularização da retina no cão. Análise em microscopia electrónica de varredura*. Prova complementar de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Nova de Lisboa.
- Costa, A.C. & Morato, J. X. (1984). *Desenvolvimento embrionário dos vertebrados*. Lisboa: Editorial Verbo.

- Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., Salomon, R.G. & Hollyfield, J.G. (2002). Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 99, 14682-14687.
- Csak, K., Szabo, V., Szabo, A. & Vannay, A. (2006). Pathogenesis and genetic basis for retinopathy of prematurity. *Frontiers in Bioscience*, 11, 908-920.
- Cunha-Vaz, J.G, Faria de Abreu, J.R. & Campos, A.J. (1975). Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *British Journal of Ophthalmology*, 59, 649-656.
- Cunha-Vaz, J.G. (1976). The blood-retinal barriers. *Documenta Ophthalmologica*, 41, 287-327.
- Cunha-Vaz, J.G. (2004). The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Experimental Eye Research*, 78, 715-721.
- Delaey, C. & Van De Voorde, J. (2000). Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Research*, 32 (6), 249-256.
- Daugherty, A., Whitman, S.C., Block, A.E. & Rateri, D.L. (2000). Polymorphism of class A scavenger receptors in C57Bl/6 mice. *Journal of Lipid Research*, 41, 1568-1577.
- De Groot, C.J.A., Huppes, W., Sminia, T., Kraal, G. & Dijkstra, CD. (1992). Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia*, 6, 301-309.
- De Schaepdrijver, L., Simoens, P., Lauwers, H. & De Geest, J.P. (1989). Retinal vascular patterns in domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 47, 34-42.
- Dermietzel R, Krause D. (1991). Molecular anatomy of the brain-blood barrier as defined by immunocytochemistry. *International Review of Cytology*, 127, 57-109.
- Dick, AD., Ford, A.L., Forrester, J.V. & Sedgwick, J.D. (1995). Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45<sup>low</sup>CD11b/c<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> parenchymal microglia. *British Journal of Ophthalmology*, 79, 834-840.
- Dunai, G., Vásárhelyi, B., Szabo, M., Hajdú, J., Mészáros, G., Tulassay, T. & Treszl, A. (2008). Publish genetic variants in retinopathy of prematurity: random forest analysis suggests a negligible contribution to risk and severity. *Current Eye Research*, 33, 501-505.
- Eng L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25, 1439-1451.

- Enzmann, V., Row, B.W., Yamauchi, Y., Kheirandish, L., Gozal, D., Kaplan, H.J. & McCall, M.A. (2006). Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigmented epithelium degeneration. *Experimental Eye Research*, 82, 441-448.
- Erickson, K.K., Sundstrom, J.M. & Antonetti, D.A. (2007). Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis*, 10, 103-117.
- Esperança-Pina, J.A. (1998). *Anatomia humana da relação – Parte I*. Lisboa: Lidel, Edições Técnicas, Lda.
- Esperança-Pina, J.A. & Pais, D. (1997). As técnicas de obtenção de moldes vasculares por injeção-corrosão para os estudos macro e microvasculares dos diversos órgãos e tecidos. I Parte: Aspectos gerais na preparação de moldes vasculares. *Anais Portugueses de Medicina*, 3-4, vol II, 121-126.
- Esperança-Pina, J.A. & Pais, D. (1998). As técnicas de obtenção de moldes vasculares por injeção-corrosão para os estudos macro e microvasculares dos diversos órgãos e tecidos. III Parte: Técnica de moldes microvasculares para microscopia electrónica de varrimento. *Anais Portugueses de Medicina*, 2-3, vol III, 33-40.
- Esperança-Pina, J.A. (2000). *Anatomia humana da relação – Parte II*. Lisboa: Lidel, Edições Técnicas, Lda.
- Esperança-Pina, J.A. (2007). *Anatomia humana do coração e vasos*. Lisboa: Lidel, Edições Técnicas, Lda.
- Feeney, L. (1978). Lipofuscine and melanine of human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17, 583-600.
- Fisher, J., Devraj, K., Ingram, J., Slage-Webb, B., Madhankumar, A.B., Liu, X., Klinger, M., Simpson, I.A., Connor, J.R. (2007). Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 293, C641-C649.
- Flynn, J.T. & Chan-Ling, T. (2006). Retinopathy of prematurity: two distinct mechanisms that underlie zone 1 and zone 2 disease. *American Journal of Ophthalmology*, 142, 46-59.
- Fraser, I., Hughes, D. & Gordon, S. (1993). Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature*, 364, 343-346.
- Fukuda, S. & Mato, M. (1985). Studies on ultrastructural changes in perivascular cells (F.G.P.) of small cerebral vessels at the initial stage after cold injury – chronological observations on F.G.P. within 24 hours. *No To Shinkei*, 37, 349-57 [Abstract].
- Funk, R.H.W. (1997). Blood supply of the retina. *Ophthalmic Research*, 29, 320-325.

- Gandra, M., Anandula, V., Authiappan, V., Sundaramurthy, S., Raman, R., Bhattacharya, S. & Govindasamy, K. (2008). Retinitis pigmentosa: mutation analysis of RHO, PRPF3, RP1, and IMPDH1 genes in patients from India. *Molecular Vision*, 14, 1105-1113.
- Gardner, T.W., Antonetti, D.A., Barber, A.J., LaNoue, K.F., Levison, S.W. & The Penn State Reina Research Group. (2002). Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey of Ophthalmology*, 47, Suppl 2, S253-S262.
- Gehrmann, J., Mies, G., Bonnekoh, P., Banati, R., Iijima, T., Kreutzberg, G.W. & Hossmann, K.A. (1993). Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathology*, 3, 11-7.
- Gehrs, K.M., Anderson, D.H., Johnson, L.V. & Hageman G.S. (2006). Age-related macular degeneration – emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of Medicine*, 38, 450-471.
- Germer, A., Biederman, B., Wolburg, H., Schuck, J., Grosche, J., Kuhrt, H., Reichelt, W., Schousboe, A., Paasche, G., Mack, A.F. & Reichenbach, A. (1998). Distribution of mitochondria within Muller cells - I. Correlation with retinal vascularization in different mammalian species. *Journal of Neurocytology*, 27, 329-345.
- Goldstein, J.L.; Ho, Y.K. Basu, S.K. & Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 76, 333-337.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (2001). Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science*, 292, 1310-1312.
- Gonçalves, C. & Bairos, V. (2006). *Histologia - texto e imagens*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Gowen, B.B., Borg, T.K., Ghaffar, A. & Mayer, E.P. (2001). The collagenous domain of class A scavenger receptors is involved in macrophage adhesion to collagens. *Journal of Leukocyte Biology*, 66, 575-582.
- Gregerson, D.S. & Yang, J. (2003). CD45-positive cells of the retina and their responsiveness to in vivo and in vitro treatment with IFN- $\gamma$  or anti-CD40. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3083-3093.
- Gregerson, D.S., Sam, T.N. & McPherson, W. (2004). The antigen-presenting activity of fresh, adult parenchymal microglia and perivascular cells from retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 172, 6587-6597.
- Grossmann, H., Stence, N., Carr, J., Fuller, L., Waite, M. & Dailey, M.E. (2002). Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia*, 37, 229-240.

- Haddad, A., Ramírez, A.I., Laicine, E.M., Salazar, J.J., Triviño, A. & Ramírez, J.M. (2001). Immunohistochemistry in association with scanning electron microscopy for morphological characterization and location of astrocytes of the rabbit retina. *Journal of Neuroscience Methods*, 106, 131-137.
- Hahn, P., Milam, A.H. & Dunaief, J.L. (2003). Macular affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Archives of Ophthalmology*, 121, 1099-1105.
- Hahn, P., Dentchev, T., Qian, Y., Rouault, T., Harris, Z.L. & Dunaif, J.L. (2004a). Immunolocalization and regulation of iron handling proteins ferritin and ferroportin in the retina. *Molecular Vision*, 10, 598-607.
- Hahn, P., Qian, Y., Dentchev, T., Chen, L., Beard, J., Harris, Z.L. & Dunaif, J. (2004b). Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 101, 13850-13855.
- Hao, C., Richardson, A. & Fedoroff, S. (1991). Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 9, 1-14.
- Harrison, P.M. & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275, 161-203.
- Hashimzume, H. & Ushiki, T. (2002). Three-dimensional cytoarchitecture of angiogenic blood vessels in a gelatine sheet implanted in the rat skeletal. *Archives of Histology and Cytology*, 65, 347-357.
- Hayes, K.C., Lindsey, S., Stephan, Z.F. & Brecker, D. (1989). Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30, 225-232.
- Hentze, M.W. & Kühn, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 8175-8182.
- Herman, I.M. & D'Amore, P.A. (1985). Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *Journal of Cell Biology*, 101, 43-52.
- Hickey, W.F. (1991). T-cell entry and antigen presentation in the central nervous system. In Arder, R.D., Felten, D.A. & Cohen, .K. (Eds.), *Psychoneuroimmunology*.(pp. 149-175). New York: Academic Press. .
- Hickey, W.F., Vass, K. & Lassmann, H. (1992). Bone marrow derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 5, 246-256.



- Hikishima, H. & Mato, M. (1990). Studies of age-related changes in intracerebral small vessels of rat – do all cerebral blood vessels get aging concurrently? *No To Shinkei*, 42, 929-944 [Abstract].
- Holash, J.A. & Stewart, P.A. (1993). The relationship of astrocyte-like cells to the vessels that contribute to the blood-ocular barriers. *Brain Research*, 629, 218-224.
- Hollander, H., Makarov, F., Dreher, Z., van Driel, D. Chan-Ling, T.L. & Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 313, 587-603.
- Honda, M., Akiyama, H., Yamada, Y., Kondo, H., Kawabe, Y., Takeya, M., Takahashi, K., Suzuki, H., Doi, T., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, M., Gough, P.J., Greaves, D.R., Gordon, S., Kodama, T. & Matsushita, M. (1998). Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia of ischemia and Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245, 734-740.
- Hughes, S., Yang, H. & Chan-Ling, T. (2000). Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1217-1228.
- Hughes, S., Gardiner, T., Hu, P., Baxter, L., Rosinova, E. & Chang-Ling, T. (2006). Altered pericytes-endothelial relations in the rat retina during aging: Implications for vessel stability. *Neurobiology of Aging*, 27, 1838-1847.
- Hunt, R.C., Dewey, A., Davis, A.A. (1989). Transferrin receptors on the surface of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 92, 655-666.
- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febraio, M. & Silverstein, C. (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40, 195-205.
- Hutchins, K.D., Dickson, D.W., Rashbaum, W.K. & Lyman, W.D. (1990). Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Developmental Brain Research*, 55: 95-102.
- Inoue, T., Plieth, D., Venkov, C.D., Xu, C. & Nielson, E.G. (2005). Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. *Kidney International*, 67, 2488-2493.
- Ito, M. & Yoshioka, M. (1999). Regression of the hyaloid vessels and papillary membrane of the mouse. *Anatomy & Embryology*, 200, 403-411.
- Jander, S. & Stoll, G. (1996). Strain-specific expression of microglial keratin sulphate proteoglycans in the normal rat central nervous system: inverse correlation with constitutive expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Glia*, 18, 255-260.

- Jeon, C., Strettoi, E. & Masland, R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of Neuroscience*, 18, 8936-8946.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). *Basic Histology*. (11th ed.) New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Karna, P., Muttineni, J., Angell, L. & Karmaus, W. (2005). Retinopathy of prematurity and risk factors: a prospective cohort study. *BMC Pediatrics*, 5, 18.
- Kayatz, P., Thumann, G., Luther, T.T., Jordan, J.E., Bartz-Schmidt, K.U., Esser, P.J. & Schraermeyer, U. (2001). Oxidation causes melanin fluorescence. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 241-246.
- Killingsworth, M., Sarks, J. & Sarks, S. (1990). Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye*, 4, 613-621.
- Kiuchi, K., Yoshizawa, K., Shikata, N., Moriguchi, K. & Tsubura, A. (2002). Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Current Eye Research*, 25, 373-379.
- Kohno, T., Inomata, H. & Taniguchi, Y. (1982). Identification of microglia cell of the rat retina by light and electron microscopy. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 26, 53-68.
- Knott, R.M & Forrester, J. V. (2003). Pathogenesis of diabetic eye disease. In Pickup, J. & Williams, G. (Eds.), *Textbook of diabetes*. (pp 1-48). Oxford: Blackwell.
- Knutson, M. & Wessling-Resnick, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 61-88.
- Kraal, G., Rep, M. & Janse M. (1987). Macrophages in T and B cell compartments and other tissue macrophages recognized by monoclonal antibody MOMA-2. An immunohistochemical study. *Scandinavian Journal of Immunology*, 26, 653-661.
- Krieger, M. & Stern, D.M. (2001). Series introduction: multiligand receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 645-647.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U.T. (2008). Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129, 389-406.
- Lassmann, H., Zimprich, F., Vass, K. & Hickey, W.F. (1991). Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *Journal of Neuroscience Research*, 28, 236-243.
- Laties, A.M., Rapoport, S.I. & McGlenn, A. (1979). Hypertensive breakdown of cerebral but not retinal blood vessels in rhesus monkey. *Archives of Ophthalmology*, 97, 1511-1514.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Lawson, L.J., Perry, V.H. & Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48, 405-415.
- Lewis, G.P., Sethi, C.S., Carter, K.M., Charteris, D.G. & Fisher, S.K. (2005). Microglia cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Molecular Vision*, 11, 491-500.
- Lieth, E., Gardner, T.W., Barber, A.J. & Antonetti, D.A. (2000). Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 28, 1-2.
- Margolis, R., Singh, R.P. & Kaiser, P.K. (2006). Branch retinal vein occlusion: clinical findings, natural history, and management. *Comprehensive Ophthalmology Update*, 7, 265-276.
- Mato, M. & Ookawara, S. (1981). Influences of age and vasopressin on the uptake capacity of fluorescent granular perithelial cells (FGP) of small cerebral vessels of the rat. *The American Journal of Anatomy*, 162:45-53.
- Mato, M., Ookawara, S., Aikawava, E. & Kawasaki, K. (1981). Studies on fluorescent granular perithelium (F.G.P) of rat cerebral cortex – especially referring to morphological changes in aging. *Anatomischer. Anzeiger*, 149, 486-501 [Abstract].
- Mato, M., Ookawara, S., Sano, M. & Kurihara, K. (1982). Studies on cerebral scavenger cells (fluorescent granular perithelial cells) - especially uptake and digestion of incorporated fat. *No To Shinkei*, 34, 989-997 [Abstract].
- Mato, M. & Mato, T.K. (1983). Distribution and number of fluorescent granular perithelial cells in coronal sections of rat cerebrum. *Experientia*, 39, 1374-1376 [Abstract].
- Mato, M., Ookawara, S., Mato, T.K. & Namiki, T. (1985). An attempt to differentiate further between microglia and fluorescent granular perithelial (FGP) cells by their capacity to incorporate exogenous protein. *The American Journal of Anatomy*, 172, 125-140.
- Mato, M., Aikawa, E., Mato, T.K. & Kurihara, K. (1986a). Tridimensional observations of fluorescent granular perithelial (FGP) cells in rat cerebral blood vessels. *The Anatomical Record*, 215, 413-419.
- Mato, M., Ookawara, S. & Saito-Taki, T. (1986b). Serological determinants of fluorescent granular perithelial cells along small cerebral blood vessels in rodent. *Acta Neuropathologica*, 72, 117-23 [Abstract].
- Mato, M., Ookawara, S., Sakamoto, A., Aikawa, E., Ogawa, T., Mitsuhashi, U., Masuzawa, T., Suzuki, H., Honda, M., Yazaki, Y., Watanabe, E., Luoma, J., Yla-Herttuala, S., Fraser, I., Gordon, S. & Kodama, T. (1996). Involvement of a specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier scavenger function in brain cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 3269-3274.

- Mato, M., Ookawara, S. & Sakamoto, A. (1997a). Growth retardation of Mato's Fluorescent granular perithelial (FGP) cells in scavenger receptor knockout (SRKO) mice. *The Anatomical Record*. 247, 307-316.
- Mato, M., Sakamoto, A. & Ookawara, S. (1997b). Study on Mato cells (Mato's FGO cells) under various conditions. *Nippon Rinsho*, 55, 1845-1852 [Abstract].
- Mato, M., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, K.T. & Suzuki, K. (1998). Ultrastructural and immunohistochemical changes of fluorescent granular perithelial cells and interaction of FGP cells to microglia after lipopolysaccharide administration. *The Anatomical Record*, 251, 330-338.
- Mato, M., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mashiko, T., Sakamoto, A., Mato, K.T., Maeda, N. & Kodama, T. (1999). Regional difference of lipid distribution in brain of apolipoprotein E deficient mice. *The Anatomical Record*. 256, 165-176.
- Mato, M., Takeuchi, K., Ookawara, S., Yamanaka, S., Mashiko, T. & Ogura, K. (2001). Inclusions in novel perivascular macrophages (Mato's fluorescent granular perithelial cells) and neurons in the cerebral cortex of Hex A- and Hex-B-deficient mice. *Acta Neuropathologica*, 103, 119-130.
- Maxfield, F.R. & Wustner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *The Journal of Clinical Investigation*, 110, 891-898.
- Mizutani, M., Gerhardinger, C. & Lorenzi, M. (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, 47, 445-449.
- Nakajima, K. & Kohsaka, S. (2004). Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, 4, 65-84.
- Nathan, C. & Xie, Q.W. (1994). Nitric oxid synthases: roles, tolls and controls. *Cell*, 78, 915-918.
- Ng, T.F. & Streilein, J.W. (2001). Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 3301-3310.
- Neidhardt, j., Glaus, E., Lorenz, B., Netzer, C., Li, Y., Schambeck, M., Wittmer, M., Feil, S., Kirschner-Schwabe, R., Rosenberg, T., Cremers, F.P.M., Bergen, A.A.B., Barthelmes, D., Baraki, H., Schmid, F., Tanner, G., Fleischhauer, J., Orth, U., Becker, C., Wegscheider, E., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Bolz, H.J., Gal, A. & Berger, W. (2008). Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Molecular Vision*, 14, 1081-1093.
- Newman, E.A. (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, 26, 536-542.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Ng, T.F. & Streilein, W. (2001). Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 3301-3310.
- O'Mahoney, P.R., Wong, D.T & Ray, J.G. (2008). Retinal vein occlusion and traditional risk factors for atherosclerosis. *Archives of Ophthalmology*, 126, 692-699.
- Paques, M., Tadayoni, R., Sercombe, R., Laurent, P., Genevois, O., Gaudric, A. & Vicaut, E. (2003). Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 4960-4967.
- Phelan, J.K. & Bok, D. (2000). A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Molecular Vision*, 6, 116-124.
- Prior, R., Wihl, G. & Urmoneit, B. (2000). Apolipoprotein E, smooth muscle cells and the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy: the potential role of impaired cerebrovascular A beta clearance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 903, 180-186.
- Provis, J.M., Penfold, P.L., Edwards, A, J. & van Driel, D. (1995). Human retinal microglia: expression of immune Markers and relationship to the *glia limitans*. *Glia*, 14, 243-256.
- Ramirez, A.I., Salazar, J.J., Haddad, A., Laicine, E.M., Ramirez, J.M. & Trivino, A. (2001). Application of confocal microscopy in the study of the relationships between astrocytes and blood vessels in the retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 76, 409-416.
- Ramos, D. (2008). *Análisis morfológico de los anillos arteriolares en la retina del ratón y del hombre*. Tesis de Mestrado. Barcelona: Facultad de Biociencias – Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rehak, J. (2008). Branch retinal vein occlusion: pathogenesis, visual prognosis, and treatment modalities. *Current Eye Research*, 32, 111-131.
- Ritter, M.R., Banin, E., Moreno, S.K., Aguilar, E., Dorrell, M.I. & Friedlander, M. (2006). Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 3266-3276.
- Robinson, M.K. & Halpern, J.I. (1992). Retinal vein occlusion. *American Family Physician*, 45, 2661-2666.
- Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (2001). *Immunology*. (6th ed.). London: Ed. Mosby.
- Ruberte, J., Ayuso, E., Navarro, M., Carretero, A., Nacher, V., Haurigot, V., George, M., Llombart, C., Casellas, A., Costa, C., Bosch, A. & Bosch, F. (2004). Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 1149-1157.

- Rungger-Brandle, E., Dosso, A.A. & Leuenberger, P.M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1971-1980.
- Ryeom, S.W., Sparrow, J.R. & Silverstein, R.L. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *Journal of Cell Science*, 109, 387-395.
- Sarks, J.P., Sarks, S.H. & Killingsworth, M.C. (1997). Morphology of early choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: correlation with activity. *Eye*, 11, 515-522.
- Schnitzer, J. (1987). Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neuroscience Letters*, 78, 29-32.
- Sen, P., Bhargava, A., George, R., Ramesh, V., Hemamalini, A., Prema, R., Kumaramanickavel, G. & Vijaya, L. (2008). Prevalence of retinitis pigmentosa in south indian population aged above 40 years. *Ophthalmic Epidemiology*, 15, 279-281.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte – a review. *Tissue & Cell*, 18, 153-174.
- Slatter, D. (2001). *Fundamentals of veterinary ophthalmology*. (3rd ed.). Philadelphia: Saunders.
- Smith, R.S. (2002). *Systematic evaluation of the mouse eye – Anatomy, Pathology, and Biomethods*. New York: CRC Press LLC.
- Sohal, R.S. & Brunk, U.T. (1989). Lipofuscine as an indicator of oxidative stress and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 266, 17-26.
- Springer, T. Galfré, G., Secher, D.S. & Milstein, C. (1979). Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *European Journal of Immunology*, 9, 301-306.
- Stone, J. & Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 255, 35-49.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85, 845-881.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leucocyte Biology*, 74, 179-185.
- Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V. & Beynem, A.C. (2001). *Principles of laboratory animal science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results*. Revised edition. Amsterdam: Elsevier.

- Vinores, S.A. (1995). Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histology and Histopathology*, 10, 141-154.
- Wang, S., Voisin, M., Larbi, K.Y., Dangerfield, J., Scheiermann, C., Tran, M., Maxwell, P.H., Sorokin, L. & Nourshargh S. (2006). Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 203, 1519-1532.
- Wangsa-Wirawan, N.D. & Linsenmeier, R.A. (2003). Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of Ophthalmology*, 121, 547-557.
- Williams, K., Alvarez, X. & Lackner, A.A. (2001). Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*, 36, 156-164.
- Wise, N.G., Dollery, C.T. & Henkind, P. (1971). *The retinal circulation*. New York: Harper & Row Publishers Inc.
- Wolburg, H., Liebner, S., Reichenbach, A. & Gerhardt, H. (1999). The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation. *International Review of Cytology*, 187, 111-159.
- Wolf, G. (2004). The visual cycle of the cone photoreceptors of the retina. *Nutrition Reviews*, 62, 283-286.
- Xu, H., Forrester, J.V., Liversidge, J. & Crane, I.J. (2003). Leucocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 226-234.
- Xu, H., Dawson, R., Crane, I.J. & Liversidge, J. (2005). Leucocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 2487-2494.
- Xu, H., Chen, M., Mayer, E.J., Forrester, J.V. & Dick, A.D. (2007a). Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia*, 55, 1189-1198.
- Xu, H., Dawson, R., Forrester, J.V. & Liversidge, J. (2007b). Identification of novel dendritic cell populations in normal mouse retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 1701-1710.
- Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N. & Forrester, J.V. (2008). Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell*, 7, 58-68.
- Xu, Q., Qaum, T. & Adamis, A.P. (2001). Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantification using Evans blue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 789-794.

- Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T. & Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 628-640.
- Yau, K.W. & Baylor, D.A. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 2785-2802.
- Yefimova, M.G., Jeanny, J.C., Guillonneau, X., Keller, N., Nguyen-Legros, J., Sergeant, C., Guillou, F. & Courtois, Y. (2000). Iron, ferritin, transferrin and transferrin receptor in the adult rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 2343-2351.
- Yu, D. & Cringle, S.J. (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularized and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Progresses in Retina and Eye Research*, 20, 175-208.
- Yu, D., Cringle, S.J., Su, E. & Yu, P.K. (2005). Sphincter activity in retinal arterioles feeding the deeper capillary layer in pig. *Current Eye Research*, 30, 781-787.
- Zakin, M. (1989). Regulation of transferrin expression. *The FASEB Journal*, 6, 3253-3258.
- Zeng, H.Y., Zhu, X.A., Zhang, C., Yang, L.P., Wu, L.M. & Tso, M.O. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 2992-2999.
- Zeng, X.X., Ng, Y.K. & Ling, E.A. (2000). Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual Neuroscience*, 17, 463-471.
- Zhang, C., Lam, T.T. & Tso, M.O. (2005a). Heterogeneous population of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Experimental Eye Research*, 81, 700-709.
- Zhang, C., Shen, J., Lam, T.T., Zeng, H., Chiang, S.K., Yang, F. & Tso, M.O.M. (2005b). Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Molecular Vision*, 11, 887-895.
- Zhang, J., Wu, G, Ishimoto, S., Pararajasegaram, G & Rao, N.A. (1997). Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 1848-1857.
- Zhang, Y. & Stone, J. (1997). Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 1653-1665.
- Zheng, L., Gong, B., Hatala, D.A. & Kern T.S. (2007). Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 361-367.





**ANEXO**



**ANEXO - Preparação de soluções****PBS 0,1M, pH 7,4:**

7,7 g NaCl + 1,54 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O + 0,27 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O + 1000 ml H<sub>2</sub>O destilada

**PBI:**

1 ml de Igepal + 1000 ml PBS

**WB:**

1000 ml PBS + 1 ml de Igepal + 3 g Albumina de Soro de Bovino (Sigma-Aldrich)

**NBF a 10%:**

100 ml formaldeído a 37% + 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O + 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 900 ml H<sub>2</sub>O destilada, pH 7

**Solução tampão de PO<sub>4</sub>:**

1000 ml H<sub>2</sub>O destilada + 1,54 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O + 0,27 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O

**Solução tampão de cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,4**

100 ml H<sub>2</sub>O destilada + 4,28 g Na (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O + 8,4 ml HCl 0,2 M