



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MÜLLER NA  
RETINOPATIA DEGENERATIVA EM MURGANHO

JOANA ARAÚJO NOBRE CATITA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da  
Silva

Doutora Esmeralda Sofia da Costa  
Delgado

Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

Doutor Jesús Ruberte París

ORIENTADOR

Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

CO-ORIENTADOR

Doutor Jesús Ruberte París

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MÜLLER NA  
RETINOPATIA DEGENERATIVA EM MURGANHO

JOANA ARAÚJO NOBRE CATITA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da  
Silva

Doutora Esmeralda Sofia da Costa  
Delgado

Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

Doutor Jesús Ruberte París

ORIENTADOR

Doutora Maria Luísa Mendes Jorge

CO-ORIENTADOR

Doutor Jesús Ruberte París

2012

LISBOA

---

*Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.*

António Machado (Sevilha 1875 – França 1939)

O caminho faz-se caminhando, disse António Machado.

Também o caminho da Ciência se faz caminhando, e o meu caminho enquanto Investigadora tem vindo a ser feito caminhando, passo a passo, com a tranquilidade necessária e a expectativa sedenta de quem vai desvendando, numa escala microscópica, tantas vezes invisível aos olhos de quem não vê com o olhar científico, com a ajuda de um pequeno bisturi dilacerante, descobertas tão relevantes como apaixonantes. Aprendi a observar, a pensar, a interpretar, a ler em cada olhar dos murganhos as marcas reveladoras de tudo o que lá está e é preciso decifrar. O caminho da Ciência faz-se caminhando, e, de repente, algo se revela aos olhos do Cientista, e depois, através dele, aos olhos do Mundo que, quantas vezes incrédulo, observa a evolução do conhecimento.

Este foi o caminho que me veio a revelar uma paixão desconhecida, um caminho feito de pequeninos passos, onde os nossos olhares se cruzam com outros olhares, onde encontrei pessoas fantásticas que têm a generosidade de se entregar à pesquisa e à partilha de conhecimentos.



## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer a todos os que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho, sem as quais não teria sido possível:

À minha Orientadora, a Professora Doutora Luísa Mendes Jorge, pelo convite para participar neste projeto de investigação que iniciou um novo rumo na minha vida, por ter acreditado em mim, pela atitude positiva com que me contagiou e por todo o empenho, dedicação e amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Jesús Ruberte París, por me ter dado a oportunidade de trabalhar numa área fascinante e desafiadora como a visão, pela incrível abertura e conhecimento, que representaram uma valiosa fonte de inspiração e aprendizagem.

Ao Professor Doutor Luís Tavares, Presidente do Conselho Diretivo da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL) e Coordenador do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) agradeço o interesse e apoio no desenvolvimento deste trabalho que tornaram a concretização deste projeto possível.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira, pelos conselhos, pela ajuda e pelos sorrisos com que sempre me motivou.

À Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço, por ter aberto tão generosamente as portas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMV-UTL.

À Professora Doutora Cristina Vilela, pela amabilidade, pelo apoio e pela motivação, sem os quais não teria sido possível a elaboração deste trabalho.

À Margarida Simões, Carla Margarida Duarte e Virgínia Pires, pelo que com elas aprendi, pela imensa dedicação e disponibilidade e pelo carinho com que me receberam.

À Doutora Cristina Mateus, pela generosidade e devoção.

À Professora Doutora Esmeralda Delgado e Dra. Ana Paula Resende, pela ajuda e pelo tempo cedido para a experimentação de novas técnicas.

A todos os que me ajudaram no trabalho laboratorial, nomeadamente à Carla, Ferdinando, Manuela, António e a todos os companheiros do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

À Professora Doutora Ana Carretero, Dr. David Ramos, Verónica Melgarejo e Lorena Noya, do grupo de investigação da Unidade de Análise Morfológica do CBATEG pela simpatia com que me acolheram e por partilharem todos os conhecimentos, de forma a apoiar e ajudar à elaboração deste estudo.

Às Técnicas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMV-UTL, pela sua simpatia e permanente disponibilidade.

Um especial agradecimento à Dra. Andreia, minha companheira de laboratório, com quem foi um prazer trabalhar, pela ajuda fundamental, pelo tempo dedicado, e sobretudo pela amizade que nos uniu ao longo destes meses.

À minha família, amigos e às manas Pais Dias, por todo o apoio, força, amor e por me motivarem a encontrar o meu caminho e incentivarem a ir mais além.

Este trabalho foi realizado no âmbito dos projetos de investigação “Análise de uma nova via de aporte de ferro à retina: papel da ferritina como proteína transportadora de ferro e o seu envolvimento na eliminação dos radicais livres” - PTDC/SAU-ORG/110856/2009 da Fundação para a Ciência e Tecnologia do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Portugal e “Senescencia celular en los vasos sanguíneos de la retina: implicaciones de P16 en el cross-linking enzimático del colágeno de la membrana basal durante el envejecimiento” - PS09/01152 do Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Espanha.



## RESUMO

### **Título: Identificação de padrões de resposta das células de Müller na retinopatia degenerativa em murganho**

#### Introdução:

Este trabalho teve como objectivo caracterizar as alterações retinianas observadas num modelo murino de retinopatia com degenerescência dos fotorreceptores, de forma a poder estabelecer padrões de resposta nas diferentes fases de evolução do processo degenerativo-inflamatório.

#### Material e Métodos:

Neste estudo foram utilizadas retinas de murganhos ICR adultos. Foram constituídos grupos de 4 animais. Os murganhos foram injetados intraperitonealmente com uma dose de 100 mg/Kg de iodato de sódio e eutanasiados 24, 48 e 72 horas após a injeção. Um animal não injetado serviu como controlo em cada grupo. As retinas foram analisadas por meio de técnicas de histologia de rotina, imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR.

#### Resultados:

A gliose reativa ocorre em resposta a estímulos agressivos. Nos processos de retinopatia, a ativação das células de Müller induz a sobre-expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). As técnicas de imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR utilizadas permitiram caracterizar, no modelo em estudo, níveis de expressão de GFAP específicos de cada uma das fases pré-definidas da resposta inflamatória.

#### Conclusões:

No modelo estudado de retinopatia induzida pela injeção de iodato de sódio, as diferenças de expressão de GFAP permitiram estabelecer padrões de resposta passíveis de ser utilizados na identificação da fase do processo inflamatório em curso.

**Palavras chave:** retinopatia, gliose, GFAP, padrões de expressão proteica

## **ABSTRACT**

### **Title: Identification of Müller cell response patterns during degenerative retinopathy in mice**

#### Introduction

The purpose of this study was to characterize the structural retinal alterations in a murine model of retinopathy with photoreceptor degeneration, in order to establish response patterns in the different stages of the degenerative-inflammatory process.

#### Material and Methods:

In this work, retinas from adult ICR mice were used. Groups of 4 animals were intraperitoneally injected with 100 mg/Kg of sodium iodate, and euthanized 24, 48 and 72 hours after injection. A non-injected animal was used as a control in each group. The retinas were analyzed by means of conventional histological techniques, immunohistochemistry, Western Blotting and q-RT-PCR.

#### Results:

Reactive gliosis occurs in response to aggressive stimuli. During retinopathy, Müller cell activation induces glial fibrillary acidic protein (GFAP) over-expression. Immunohistochemistry, Western Blotting and q-RT-PCR techniques allowed us to characterize the levels of GFAP expression of each predefined inflammatory stage.

#### Conclusions:

In the analyzed murine sodium iodate injection-induced model of retinopathy, differences in GFAP expression allowed us to establish expression patterns of this protein which may be used to identify the phase of the inflammatory response in progress.

**Keywords:** retinopathy, gliosis, GFAP, protein expression patterns

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>APOIO FINANCEIRO</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA</b> .....	xvi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>ANATOMIA OCULAR</b> .....	1
<b>GLOBO OCULAR</b> .....	1
<b>RETINA</b> .....	4
<b>RESPOSTA INFLAMATÓRIA</b> .....	18
<b>RETINOPATIAS</b> .....	21
<b>MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	23
<b>OBJECTIVOS</b> .....	25
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>1. ANIMAIS</b> .....	27
<b>2. MODELO DE RETINOPATIA INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE IODATO DE SÓDIO</b> ....	27
<b>3. OBTENÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS</b> .....	27
<b>3.1. Obtenção dos globos oculares</b> .....	28
<b>3.2. Extração das retinas</b> .....	28
<b>4. PROCESSAMENTO DA RETINA PARA TÉCNICAS HISTOLÓGICAS</b> .....	28
<b>4.1. Inclusão em parafina</b> .....	28

5. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	29
5.1. Coloração de cortes histológicos com hematoxilina-eosina .....	29
6. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS .....	30
6.1. Imunohistoquímica sobre cortes histológicos.....	30
7. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	32
7.1. Método <i>Bicinchoninic Acid Protein</i> (BCA) ou de Smith.....	32
7.1.1. Preparação do reagente BCA (solução A+B).....	32
7.1.2. Preparação das amostras de retina .....	32
7.1.3. Preparação da solução da curva-padrão com albumina sérica bovina (BSA)	
.....	33
7.1.4. Quantificação .....	33
7.2. Método de Bradford.....	33
7.2.1. Preparação do reagente Bradford .....	34
7.2.2. Preparação da amostra.....	34
7.2.3. Preparação da solução para a curva-padrão de albumina sérica bovina	
(BSA).....	34
7.2.4. Quantificação .....	35
8. <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	35
8.1. Preparação das amostras .....	35
8.2. Preparação do gel de poliacrilamida.....	36
8.3. Electroforese unidimensional.....	36
8.4. Transferência por electroforese .....	36
8.5. Colorações.....	37
8.6. Bloqueio .....	37
8.7. Imunodeteccção .....	37
8.8. Revelação por quimioluminescência .....	38
9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO	
REAL (q-RT-PCR).....	39
9.1. Preparação das amostras .....	40
9.2. Extração de ARNm .....	40
9.3. Quantificação do ARN.....	41
9.4. Retrotranscrição de ARNm a ADNc .....	41
9.5. Preparação dos <i>primers</i> .....	42
9.6. Amplificação ADNc .....	42
RESULTADOS .....	45
1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	45

<b>2. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>3. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Método BCA.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2. Método de Bradford .....</b>	<b>55</b>
<b>4. WESTERN BLOTTING.....</b>	<b>57</b>
<b>5. q-RT-PCR.....</b>	<b>61</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** **Globo ocular de murganho.** **A:** imagem macroscópica do globo ocular de murganho. **B:** corte sagital do globo ocular, corado com coloração tricômica de Mallory. No, nervo óptico; E, esclera; I, íris; Ca, câmara anterior do globo ocular; Co, córnea; Cr, coroideia; Cc, corpo ciliar; R, retina; Cv, câmara vítrea do globo ocular; Cp, câmara posterior do globo ocular; C, cristalino. Imagens cedidas por Jesús Ruberte. ....1
- Figura 2** **Representação esquemática da estrutura da retina.** MLI, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; CB, camada dos fotorreceptores; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem da esquerda adaptada de Srienc, Kurth-Nelsons & Newman, 2010 (<http://www.frontiersin.org/>). Imagem da direita adaptada de Kolb, Fernandez, Nelson & Jones, 2011 (<http://webvision.med.utah.edu/>). .....6
- Figura 3** **Imagem microscópica dos diferentes estratos da retina.** MLI, membrana limitante interna (seta); CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa (seta); CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; Coloração pela hematoxilina-eosina. Barra: 20 µm (original). .....7
- Figura 4** **Representação tridimensional do globo ocular de murganho, destacando a estratificação da retina.** E, esclera; C, Cristalino; R, retina; MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem da esquerda adaptada de Turbosquid (<http://www.turbosquid.com>). Imagem da direita obtida por coloração hematoxilina-eosina da retina de murganho (original). .....8

- Figura 5 Estrutura da retina com detalhe dos fotorreceptores.** MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; SE, segmentos externos dos fotorreceptores; SI, segmentos internos dos fotorreceptores. Microscopia electrónica de varrimento sobre tecido intacto. Barra: 6 µm. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge. ....9
- Figura 6 População celular da retina: tipos celulares presentes na camada nuclear interna.** CB, camada de cones e bastonetes; CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; A, célula amácrina (núcleo); B, célula bipolar (núcleo); M, célula de Müller (núcleo); H, célula horizontal (núcleo). Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge. .. 11
- Figura 7 Representação esquemática da origem das ondas características da eletrorretinografia. A:** ERG de murganho. Adaptado de Machalińska et al., 2010. **B:** A despolarização dos fotorreceptores origina a onda-a. Na geração da onda-b estão envolvidas principalmente as células de Müller. EP, epitélio pigmentar da retina; CB, cones e bastonetes; B, células bipolares; M, células de Müller; A, células amácrinas; G, células ganglionares. Imagem adaptada de Digital Journal of Ophtalmology ([www.djo.harvard.edu](http://www.djo.harvard.edu)). ..... 13
- Figura 8 Astrócitos nas camadas mais internas da retina.** Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP (original). ..... 13
- Figura 9 Padrão vascular da retina.** Injeção de fluoresceína. A partir do disco óptico a artéria central da retina ramifica-se em várias arteríolas retinianas que se distribuem radialmente até à periferia. As vénulas retinianas surgem num plano mais profundo e convergem no disco óptico. DO, disco óptico; A, arteríolas; V, vénula. Imagem cedida por Jesús Ruberte. .... 15
- Figura 10 Fundo do olho humano.** Ma, mácula lútea; Fo, fóvea central; DO, disco óptico; A, arteríola; V, vénula; (original). ..... 16

- Figura 11** **Gliose reativa em retina humana.** Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, revelada com DAB. CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge. ....20
- Figura 12** **Cortes histológicos de retina de murganho após injeção de iodato de sódio (NaIO<sub>3</sub>).** **A (Con):** arquitetura normal da retina. **B (T<sub>24</sub>):** aspeto da desorganização dos núcleos dos fotorreceptores na camada nuclear externa (seta); a camada de fotorreceptores mantém a integridade. **C (T<sub>48</sub>):** redução do número de fotorreceptores (cabeça de seta preta), associada a uma extensa desorganização dos núcleos das camadas nuclear externa (seta) e interna (cabeça de seta branca). **D (T<sub>72</sub>):** degenerescência dos fotorreceptores (cabeça de seta), com alteração de toda a estrutura da retina, incluindo as camadas nuclear externa (seta) e interna (cabeça de seta branca). CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de fotorreceptores (cones e bastonetes). Coloração histológica de Hematoxilina-Eosina. Barra: 30 µm (original). .....47
- Figura 13** **Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela administração de iodato de sódio (NaIO<sub>3</sub>).** **A (retina-controlo):** expressão basal de GFAP, com maior intensidade de sinal nas camadas internas da retina (seta) e aspeto normal dos núcleos dos fotorreceptores. **B (T<sub>24</sub>):** início do processo degenerativo dos fotorreceptores. Discreto aumento da expressão de GFAP (seta) e início da desorganização da camada nuclear externa. **C (T<sub>48</sub>):** pico de sobre-expressão de GFAP, evidenciado pela máxima intensidade de fluorescência, inclusive nos estratos mais externos (seta), devido à possível hipertrofia das células de Müller. **D (T<sub>72</sub>):** diminuição da expressão de GFAP em relação à fase anterior (seta) associada a uma marcada degenerescência dos fotorreceptores e à desorganização das camadas nuclear externa e interna. Con, controlo; CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de fotorreceptores (cones e bastonetes). Núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* (azul) e GFAP marcado com *Alexa Fluor® 488* (vermelho). Barra: 30 µm (original). .....50-51

- Figura 14 Método BCA: curva-padrão (BSA).** A equação de ajustamento à curva-padrão foi utilizada para determinar a concentração proteica em solução. A equação de ajustamento encontrada foi linear ( $y = 0,0011x + 0,0274$ ) e de alta precisão, como indicado pelo coeficiente de determinação de 0,92 ( $R^2$ ).  $A_{562}$ : valor da absorvância determinada a 562 nm; [BSA], concentração da proteína albumina sérica bovina (original). .....53
- Figura 15 Método de Bradford: curva-padrão (BSA).** A equação de ajustamento encontrada foi linear ( $y = 0,7226x + 0,0194$ ) e de alta precisão, como indicado pelo coeficiente de determinação de 0,99 ( $R^2$ ).  $A_{595}$ : valor da absorvância determinada a 595 nm; [BSA], concentração da proteína albumina sérica bovina (original). .....56
- Figura 16 Otimização da concentração proteica para amostras de retina de murganho em *Western Blotting*.** **A:** diluições seriadas de amostra marcadas com anti-GFAP. O tamanho da banda 1 é maior que o das restantes bandas; as bandas 2, 3 e 4 apresentam um tamanho constante. **B:** diluições seriadas da amostra marcadas com anti- $\beta$ -actina. Todas as bandas apresentam tamanho semelhante. 1, 40  $\mu$ g de proteína total; 2, 20  $\mu$ g de proteína total; 3, 10  $\mu$ g de proteína total; 4, 5  $\mu$ g de proteína total (original). .....58
- Figura 17 Expressão da proteína GFAP no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio em *Western Blotting*.** Amostras normalizadas com a proteína de referência  $\beta$ -actina e correspondência com os resultados obtidos por análise imunohistoquímica. **Con**, controlo; **T<sub>24</sub>**, tempo de 24 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$ ; **T<sub>48</sub>**, tempo de 48 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$ ; **T<sub>72</sub>**, tempo de 72 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$  (original). .....60
- Figura 18 Expressão da proteína GFAP no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, quantificada por densitometria óptica, em *Western Blotting*.** **Con**, controlo; **T<sub>24</sub>**, tempo de estudo 24 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$ ; **T<sub>48</sub>**, tempo de estudo 48 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$ ; **T<sub>72</sub>**, tempo de estudo 72 horas após a indução com  $\text{NaIO}_3$  (original). .....60

- Figura 19** Curvas de “*melting*” obtidas por q-RT-PCR, para os genes GFAP e  $\beta$ -actina, no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, em murganho. A, B, C, D: curvas de *melting* para o gene  $\beta$ -actina nas fases Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. E, F, G, H: curvas de *melting* para o gene GFAP nas fases Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. -Rn', magnitude de fluorescência detetada; T<sub>m</sub>, temperatura de *melting* (original). .....63
- Figura 20** Curvas de amplificação obtidas por q-RT-PCR, para os genes GFAP e  $\beta$ -actina, no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, em murganho. As curvas obtidas relacionam os ciclos de amplificação com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do cDNA nas amostras. A, B, C, D: curvas de amplificação para o gene  $\beta$ -actina nas fases de controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. E, F, G, H: curvas de amplificação para o gene GFAP nas fases de controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente.  $\Delta$ Rn: intensidade de sinal de fluorescência emitida (original). .....63
- Figura 21** Análise q-RT-PCR da expressão génica de GFAP no modelo de retinopatia induzida pela injeção de iodato de sódio, em murganho. Variação dos níveis de expressão génica da proteína GFAP. *Fold changes*, níveis de transcrição, Con, controlo; T<sub>24</sub>, tempo de estudo 24 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>48</sub>, tempo de estudo 48 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>72</sub>, tempo de estudo 72 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub> (original). .....64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	<b>Anticorpos primários utilizados.</b> ....	37
Tabela 2	<b>Anticorpos secundários utilizados.</b> ....	38
Tabela 3	<b>Volumes necessários para preparação da uma reação de RT-PCR.</b> Adaptada de <a href="http://www.appliedbiosystems.com">www.appliedbiosystems.com</a> . ....	41
Tabela 4	<b>Primers utilizados.</b> ....	42
Tabela 5	<b>Volumes necessários para preparação de uma reação de PCR de 25 µl.</b> Adaptada de <a href="http://www.appliedbiosystems.com">www.appliedbiosystems.com</a> . ....	42
Tabela 6	<b>Método BCA: absorvâncias das soluções de BSA.</b> Os valores obtidos são utilizados para a elaboração da curva-padrão. Os valores de concentração de 100 µg/ml a 800 µg/ml correspondem a 10 µg a 80 µg de proteína total, respetivamente. $A_{562}$ , valor da absorvância determinada a 562 nm; BSA, albumina sérica bovina. ....	53
Tabela 7	<b>Método BCA: absorvâncias e concentração proteica determinada para a amostra de retina de murganho.</b> $A_{562}$ , valor da absorvância determinada a 562 nm. ....	54
Tabela 8	<b>Método de Bradford: absorvâncias das soluções de BSA.</b> Os valores obtidos são utilizados para a elaboração da curva-padrão. $A_{595}$ , valor da absorvância determinada a 595 nm; BSA, albumina sérica bovina. ....	56
Tabela 9	<b>Método de Bradford: absorvâncias e concentração proteica determinadas para a amostra de retina de murganho.</b> $A_{595}$ : absorvância determinada a 595 nm. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN (*Deoxyribonucleic acid*) - Ácido desoxirribonucleico

ADNc (*Complementary deoxyribonucleic acid*) - Ácido desoxirribonucleico complementar

APS (*Ammonium persulfate*) - Persulfato de amônio

ARN (*Ribonucleic acid*) – Ácido ribonucleico

ARNm (*Messenger ribonucleic acid*) – Ácido ribonucleico mensageiro

BCA (*Bicinchoninic acid*) – Ácido bicinconínico

BSA (*Bovine serum albumin*) - Albumina sérica bovina

DAB - Diaminobenzidina

DEPC (*Diethylpyrocarbonate*) - Dietilpirocarbonato

d’NTPs (*Deoxyribonucleotide triphosphates*) - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ECI (*Enhanced Chemiluminescence*) – Reação de quimioluminescência

EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERG- Electrorretinograma

GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) - Proteína glial fibrilar ácida

HCL (*Hydrochloric acid*) - Ácido clorídrico

HRP (*Horseradish peroxidase*) - Enzima peroxidase de rábano silvestre

IgG – Imunoglobulina da classe G

IL-1 (*Interleukin 1*) – Interleucina 1

NBF (*Neutral buffered formalin*) - Formol tamponado

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBI - PBS + 0,1% Igepal

PBS (*Phosphate buffer saline*) – Solução-tampão de fosfato

PBST (*Phosphate buffer saline Tween 20*) – Solução-tampão de fosfato e Tween 20

PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) - Fluoreto de *polivinilideno*

q-RT-PCR (*Real time, reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) – Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa, em tempo real

RIPA (*modified radioimmunoprecipitation assay*)

SDS (Sodium dodecyl sulfate) – Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TEMED (N,N,N',N'-*Tetramethylethylenediamine*) – N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina

TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor-alpha*) - Factor de necrose tumoral-alfa

WB (*Wash buffer*) – Solução-tampão

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

g – grama (Unidade SI de massa)

H<sub>2</sub>O – água

HCl – ácido clorídrico

K<sup>+</sup> - potássio

KCl – cloreto de potássio

kDa – kilodaltons

kg - quilograma (Unidade SI de massa)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monopotássico

l - litro (Unidade SI de volume)

M - molar

mA - miliamperes

mg - miligrama (submúltiplo do quilograma, kg)

mg/kg – miligramas por quilograma

mg/ml – miligramas por mililitro

ml - mililitro (submúltiplo do litro, l)

mm - milímetro (submúltiplo do metro, m)

ms - milisegundos

Na<sup>+</sup> - sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaIO<sub>3</sub> – iodato de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monossódico

nm - nanómetro (submúltiplo do metro, m)

pH - simétrico do logaritmo decimal da actividade hidrogeniónica

rpm – revoluções por minuto

µg - micrograma (submúltiplo do quilograma, kg)

µl - microlitro (submúltiplo do litro, l)

$\mu\text{m}$  - micrómetro (submúltiplo do metro, m)

$\mu\text{V}$ - microvolts

U.A. – unidades arbitrárias

V - volts

x g – força centrífuga relativa

% - percentagem

$^{\circ}\text{C}$  - grau Celcius ou centígrado (Unidade SI da grandeza temperatura)



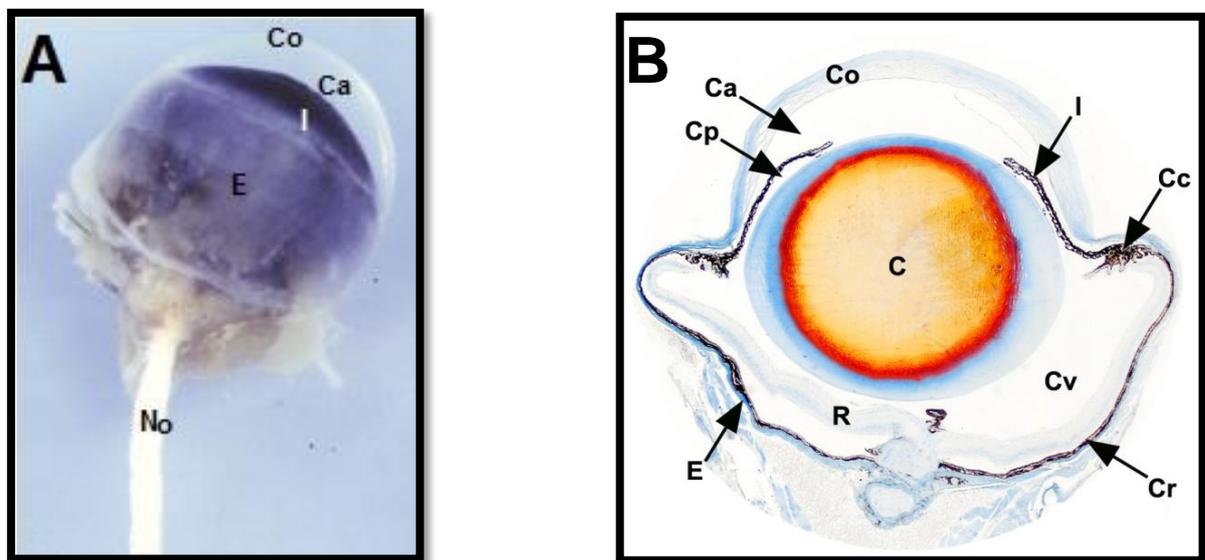
## INTRODUÇÃO

## ANATOMIA OCULAR

O olho, órgão responsável pela visão, é constituído pelo globo ocular e órgãos anexos, entre os quais podemos considerar as pálpebras, conjuntiva, aparelho lacrimal, bainha do globo ocular e músculos extrínsecos do globo ocular (Jorge, 2009).

## GLOBO OCULAR

O globo ocular (*Bulbus oculi*) está situado na órbita. É constituído por três túnicas concêntricas em íntima aposição: túnica externa ou fibrosa, túnica média ou musculo-vascular e túnica interna ou nervosa (Figura 1). O interior do globo ocular é preenchido pelo humor aquoso (câmaras anterior e posterior do globo ocular), cristalino e corpo vítreo (câmara vítrea) (Walde, Schaffer & Kostlin, 1998).



**Figura 1 – Globo ocular de murganho.** A: imagem macroscópica do globo ocular de murganho. B: corte sagital do globo ocular, corado com coloração tricômica de Mallory. No, nervo óptico; E, esclera; I, íris; Ca, câmara anterior do globo ocular; Co, córnea; Cr, coroideia; Cc, corpo ciliar; R, retina; Cv, câmara vítrea do globo ocular; Cp, câmara posterior do globo ocular; C, cristalino. Imagens cedidas por Jesús Ruberte.

### **Túnica fibrosa (externa)**

A túnica fibrosa ou externa (*Tunica fibrosa bulbi*) é constituída pela esclera e pela córnea.

A esclera ou esclerótica (*Sclera*) é a porção posterior da túnica externa, de cor branca. Constituída por tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio tipo I e fibras elásticas, esta camada fibro-elástica resistente, protege o globo ocular e é zona de inserção dos músculos extrínsecos (Walde et al., 1998). A superfície visível da esclera está coberta por parte da conjuntiva. Na zona de união com a córnea apresenta um sulco que se designa por limbo esclerocorneano (*Limbus cornae*) (Smith, 2002).

Na porção anterior da túnica fibrosa situa-se a córnea (*Cornea*). Esta membrana, transparente, apresenta uma forma mais convexa que a esclera. Concretamente, nos murganhos, a córnea apresenta uma forma hemi-esférica (Smith, 2002). A transparência da córnea deve-se à sua estrutura e aos processos fisiológicos constantes de movimentos passivos de líquidos condicionados pela bomba de iões a nível do epitélio posterior (Cook & Peiffer, 2001). A córnea é avascular, sendo o transporte de nutrientes assegurado pela secreção lacrimal e humor aquoso. Da face externa à face interna, a córnea é constituída pelo epitélio corneano anterior, membrana limitante anterior ou de Bowman, estroma ou substância própria (fibroblastos, fibras de colagénio tipo I e IV e proteoglicanos) que representa 90% da sua espessura, membrana limitante posterior ou de Descemet e o endotélio corneano posterior (Walde et al., 1998).

### **Túnica musculo-vascular (média)**

A túnica musculo-vascular ou média (*Tunica vasculosa bulbi*) é composta pela corioideia (porção posterior), corpo ciliar (porção média) e íris (porção anterior). As suas funções são assegurar a nutrição do globo ocular, acomodar o cristalino, regular o tamanho da pupila e segregar o humor aquoso (Walde et al., 1998).

A corioideia (*Choroidea*) forma a porção posterior da túnica média, situando-se entre a esclera e a retina. É constituída por uma vasta rede de capilares sanguíneos, que nutre as camadas mais externas desta última (Walde et al., 1998). Esta membrana conjuntivo-vascular, com células pigmentares, estende-se desde a *ora serrata* até ao nervo óptico e, devido ao seu elevado conteúdo em melanina, permite absorver a luz que atravessa a retina, evitando a sua refração no interior do globo ocular. Em algumas espécies a região posterior da corioideia apresenta uma estrutura designada por tapete lúcido (*Tapetum*

*lucidum*) que reflete a luz como um espelho e aumenta a eficácia da visão noturna. No entanto, esta estrutura não está presente no Homem nem nos Roedores (Hedrich & Bullock, 2004).

O corpo ciliar (*Corpus ciliare*) localiza-se entre a íris e a coroideia. É composto pela *pars plicata*, que corresponde aos processos ciliares, e a *pars plana*. Os processos ciliares (*Processus ciliares*) são espessamentos da túnica vascular em forma de cristas que no seu conjunto formam a coroa ciliar (*Corona ciliares*) responsável pela secreção de humor aquoso, porção mais externa do corpo ciliar, mais próxima da esclera é constituída pelo músculo ciliar (*Musculus ciliares*), em forma de anel, que tem um papel importante na acomodação do cristalino (Cook & Peiffer, 2001).

A íris (*Iris*) continua anteriormente a coroideia (*Iris*). Divide o espaço entre a córnea e o cristalino em câmara anterior e câmara posterior. As duas câmaras comunicam-se através da zona de abertura central, a pupila (*Pupilla*), estando ambas preenchidas por humor aquoso (Walde et al., 1998). A íris, cujo formato é uma coroa circular, assemelha-se a um diafragma, regulando a passagem da luz através da modificação da forma e tamanho da pupila (Cook & Peiffer, 2001).

### **Túnica nervosa (interna)**

A túnica nervosa ou interna (*Tunica interna bulbi*) é o estrato mais interno do globo ocular. É constituída pela retina (*Retina*), formada fundamentalmente por tecido nervoso. Está diretamente envolvida na receção e transmissão de estímulos luminoso ao nervo óptico que, por sua vez, transmite essa informação ao córtex cerebral (Walde et al., 1998).

A retina prolonga-se, sob a forma de epitélio cilíndrico biestratificado, cobrindo o corpo ciliar e a íris (Junqueira & Carneiro, 2004)

No interior do globo ocular existe também o cristalino ou lente e diferentes meios transparentes que permitem a passagem da luz com a mínima interferência: humor aquoso, e corpo vítreo (Jorge, 2009).

### **Humor aquoso**

Como referido anteriormente a íris divide o espaço entre a córnea e o cristalino em duas câmaras que se comunicam através da pupila. A câmara anterior (*Camara anterior*) é de

maior tamanho e situa-se entre a córnea e a íris. A câmara posterior (*Camara posterior*), de menor tamanho, localiza-se entre a íris e o cristalino e o corpo ciliar. Ambas estão preenchidas por humor aquoso (*Humor aquosus*), um líquido transparente produzido pelos processos ciliares e drenado através do seio venoso da esclera (Canal de Schlemm), no ângulo irido-corneano. Este meio transporta nutrientes às estruturas adjacentes, nomeadamente, córnea e cristalino. A pressão hidrostática a nível da câmara anterior mantém a forma convexa da superfície externa da córnea, permitindo a correta focagem da luz na retina (Jorge, 2009).

### **Cristalino**

O cristalino ou lente (*Lens*) é uma lente biconvexa, de estrutura sólida mas elástica, avascular e transparente. Suspenso no globo ocular pelas fibras zonulares ou de Zinn, situa-se entre a face posterior da íris e o corpo vítreo. É constituído pelas fibras do cristalino, células epiteliais modificadas, em forma de prisma de seis faces. Revestidas por uma cápsula, estas fibras organizam-se de forma muito regular, unidas no centro, formando camadas concêntricas. A sua nutrição é realizada por meio de difusão através da cápsula (Walde et al., 1998). A acomodação do cristalino confere ao olho a capacidade de focagem das imagens na retina. No murganho, o cristalino apresenta uma maior dimensão relativa, quando comparada com outros Mamíferos (Chalupa & Williams, 2008). Concretamente, o cristalino ocupa cerca de 75% do espaço intra-bulbar e conseqüentemente o corpo vítreo é de menor volume (Smith, 2002).

### **Corpo vítreo**

Entre o cristalino e a retina, comprimindo esta última contra a coroideia, encontra-se o corpo vítreo (*Corpus vitreum*), contido na câmara vítrea (*Camara vitreum*). O corpo vítreo é uma estrutura de consistência gelatinosa, transparente e incolor, formada por 99% de água e por um estroma de fibras delicadas. O seu volume é constante (Walde et al., 1998).

## **RETINA**

O desenvolvimento do olho dos Vertebrados baseia-se numa série de interações entre a ectoderme superficial e o diencéfalo (Chalupa & Williams, 2008). Durante a embriogénese, o tecido retiniano origina-se a partir de uma evaginação do diencéfalo que irá formar a vesícula óptica primária. No murganho, a vesícula óptica desenvolve-se por volta do 8º dia

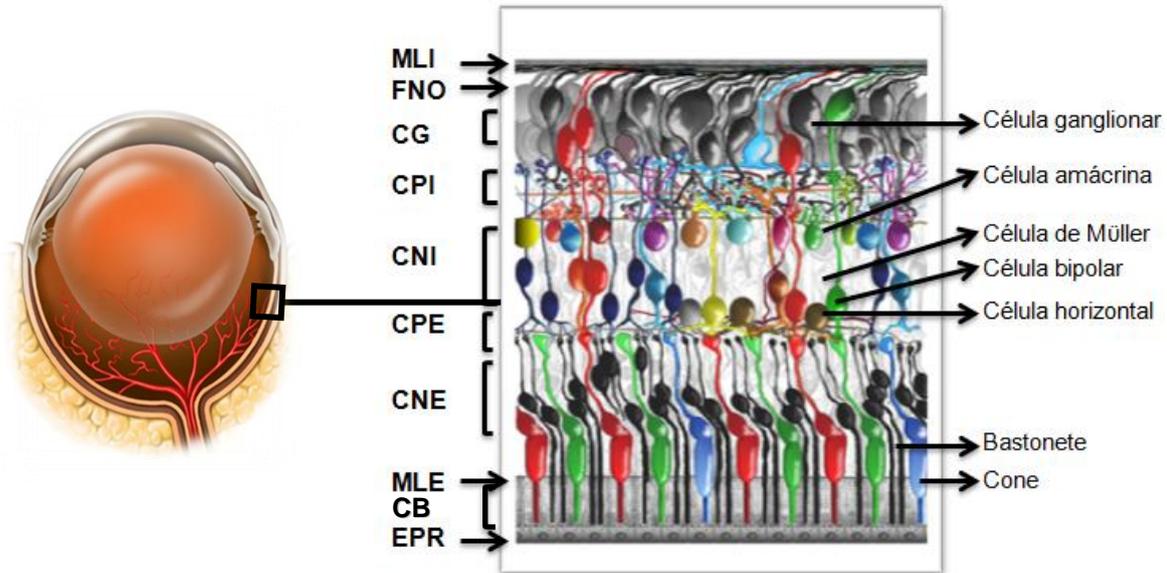
do embrião, e ao 9º dia esta vesícula induz a invaginação da ectoderme adjacente para originar o cristalino (Sernagor, Eglen, Harris & Wong, 2006). De igual modo, a vesícula óptica invagina-se, originando a taça óptica bilaminar que, posteriormente, origina a retina neuro-sensorial e o epitélio pigmentar da retina (Carlson, 1999). O pedículo óptico é a estrutura que liga a vesícula óptica ao cérebro. Dá origem ao nervo óptico e, em conjunto com a neuro-retina, constitui o “oftalmocéfalo”, uma expansão do encéfalo projetada para o interior da órbita (Carlson, 1999).

A retina é, portanto, um prolongamento do sistema nervoso central, sendo uma estrutura bastante complexa e delicada (Chalupa & Williams, 2008). Estende-se desde o disco do nervo óptico até à pupila, forrando internamente a coróideia, corpo ciliar e íris. É constituída por três porções: a porção óptica (posterior), porção ciliar (média) e porção iridiana (anterior). A parte óptica da retina é sensível à luz e estende-se desde o nervo óptico até à *ora serrata*. A parte cega compreende a porção ciliar e iridiana (Jorge, 2009).

O disco ou papila óptica (*Discus nervi optici*) é a região da retina por onde as fibras do nervo óptico emergem e por onde se efetua também a passagem da artéria e veia centrais da retina. Outra região de extrema importância é a mácula lútea (*Macula lutea*), sendo a área de maior acuidade visual. No seu centro existe a fóvea (*Fovea centralis*) (Walde et al., 1998). Esta estrutura é extremamente sensível por ser a área de maior transparência da retina, uma vez que não é vascularizada e é formada apenas por uma fina camada de fotorreceptores. É também a zona de maior densidade de cones. No entanto, a retina dos Roedores não possui nem mácula lútea nem fóvea central, sendo o disco óptico coincidente com o eixo central do olho (Chalupa & Williams, 2008).

Histologicamente consideram-se 10 estratos na retina, que são, desde o mais interno, que se relaciona com o corpo vítreo, até ao mais externo, que se relaciona com a coróideia (Figuras 2, 3 e 4):

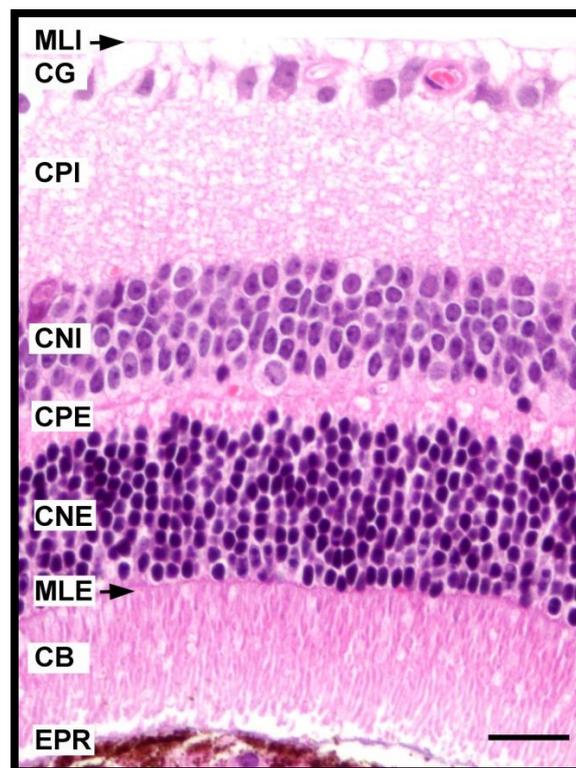
1. Membrana limitante interna (*Stratum limitans internum*): formada pelas expansões citoplasmáticas das células de Müller.
2. Camada de fibras do nervo óptico (*Stratum neurofibrarum*): as fibras nervosas do nervo óptico são constituídas pelos axónios não mielinizados das células ganglionares, que se reúnem no disco do nervo óptico, atravessam a coróideia e esclera, saindo do globo ocular para dar origem ao nervo óptico, no polo posterior do olho. A rodear estas fibras e os vasos sanguíneos estão os processos celulares dos astrócitos e das células de Müller.



**Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da retina.** MLI, membrana limitante interna; FNO, camada de fibras do nervo óptico; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; CB, camada dos fotorreceptores; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem da esquerda adaptada de Srienc, Kurth-Nelsons & Newman, 2010 (<http://www.frontiersin.org/>). Imagem da direita adaptada de Kolb, Fernandez, Nelson & Jones, 2011 (<http://webvision.med.utah.edu/>).

3. Camada de células ganglionares (*Stratum ganglionicum*): onde se localizam os corpos celulares das células ganglionares, astrócitos e algumas células amácrinas.
4. Camada plexiforme interna (*Stratum plexiforme internum*): matriz na qual ocorrem sinapses entre as células bipolares, células ganglionares e amácrinas.
5. Camada nuclear interna (*Stratum nucleare internum*): composta pelos corpos celulares das células bipolares, horizontais, amácrinas e células de Müller. Segundo Jeon, Strettoi e Masland (1998), as células bipolares representam 41% da população celular deste estrato; 39% é constituído por células amácrinas, 16% por células de Müller e 3% por células horizontais. As células bipolares participam na sinapse entre as células ganglionares e fotorreceptores. As células horizontais e amácrinas interpõem-se entre estas uniões, juntamente com as expansões citoplasmáticas das células de Müller, que se distribuem nos espaços entre células, pelos diferentes estratos da retina.
6. Camada plexiforme externa (*Stratum plexiforme externum*): região retiniana onde ocorrem sinapses entre os axónios dos fotorreceptores e as dendrites das células bipolares e horizontais.
7. Camada nuclear externa (*Stratum nucleare externum*): ocupada pelos corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes).

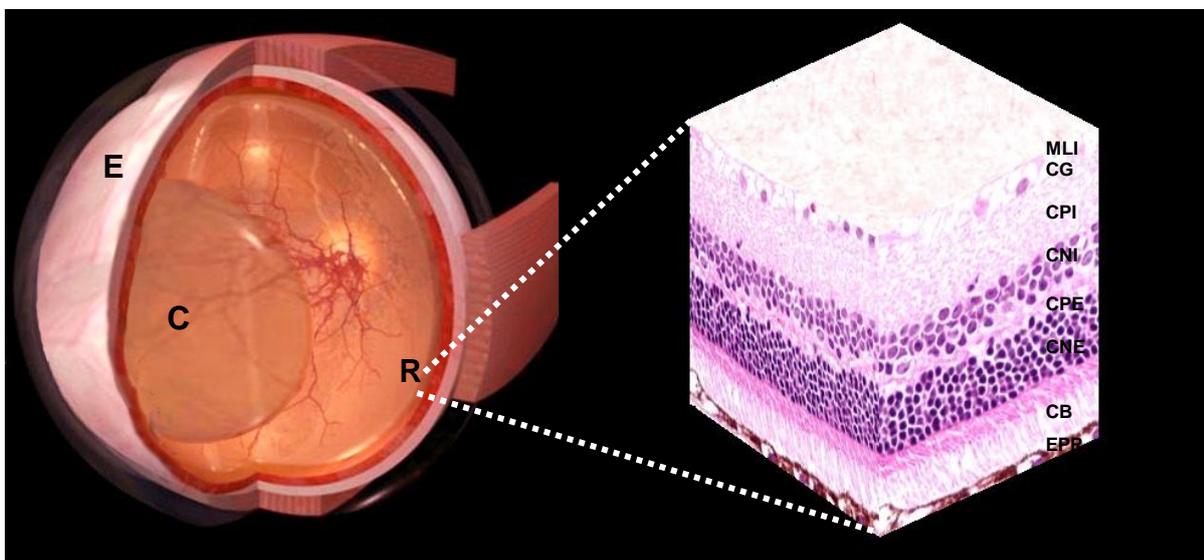
8. Membrana limitante externa (*Stratum limitans externum*): não se considera uma membrana propriamente dita, mas sim o limite externo dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller que a este nível se unem aos segmentos internos dos fotorreceptores por uniões intercelulares.
9. Camada de fotorreceptores (*Stratum neuroepitheliale*): constituída pelos segmentos internos e externos dos cones e bastonetes.
10. Camada de células pigmentares (*Stratum pigmentosum*): o epitélio pigmentar da retina é a camada celular mais externa adjacente à coroideia, que reveste praticamente todo o interior do globo ocular. Representa a interface entre a neuro-retina e a coroideia, formando a barreira hemato-retiniana externa. Distingue-se pela cor negra, devido aos grânulos de melanina das células pigmentares e apresenta várias funções, nomeadamente o transporte de nutrientes, iões e água, absorção e eliminação dos raios luminosos não captados pela retina, fagocitose e secreção (Simó, Villarroel, Corraliza, Hernández & Garcia-Ramírez, 2010). A porção apical dos fotorreceptores relaciona-se com este epitélio pigmentar.



**Figura 3 – Imagem microscópica dos diferentes estratos da retina.** MLI, membrana limitante interna (seta); CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; MLE, membrana limitante externa (seta); CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina; Coloração pela hematoxilina-eosina. Barra: 20  $\mu$ m (original).

A retina é constituída por uma rede neuronal complexa capaz de captar estímulos luminosos externos veiculados sob a forma de fótons. Converte esses estímulos elétricos em sinais químicos, transmitidos, através do nervo óptico, sob a forma de estímulos electroquímicos ao córtex cerebral. Esta informação é modulada e transmitida, por neurotransmissores ou através de alterações de potencial de membrana, ao longo de uma série de células neuronais (Kolb et al., 2011).

As principais células neuronais retinianas são: fotorreceptores, neurónios de associação, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares.



**Figura 4 - Representação tridimensional do globo ocular de murganho, destacando a estratificação da retina.** E, esclera; C, Cristalino; R, retina; MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem da esquerda adaptada de Turbosquid (<http://www.turbosquid.com>). Imagem da direita obtida por coloração pela hematoxilina-eosina da retina de murganho (original).

### Fotorreceptores

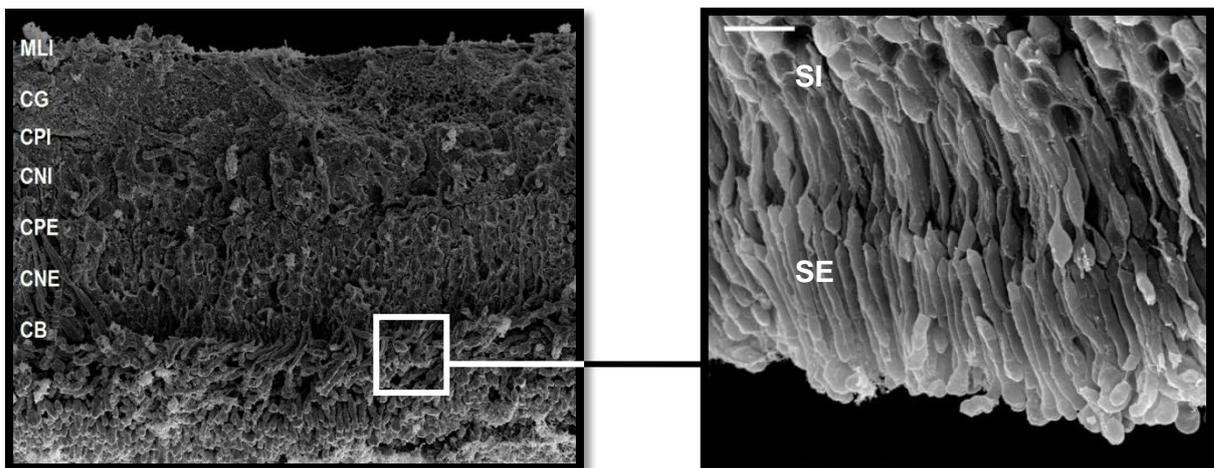
Os dois tipos de células fotorreceptoras presentes na retina são os cones e os bastonetes. Estas células são especializadas em captar os estímulos luminosos, dando início à condução de impulsos nervosos (Figura 5).

Os cones caracterizam-se pela forma cónica dos segmentos externos e por serem ativados em condições fotópicas. Na retina de murganho existem cones sensíveis a luminosidades de 360 nm e 510 nm e ainda à luz ultra-violeta (Lyubarsky, Falsini, Pennesi, Valentini, Pugh, 1999). O mecanismo de percepção da cor (visão cromática) é levado a cabo por estas células com alto poder de resolução.

Os segmentos externos dos bastonetes apresentam uma forma mais alongada e são ativados em regime escotópico, já que são sensíveis a condições de baixa luminosidade, correspondendo a valores de 498 nm (Kolb et al., 2011).

Segundo Jeon, Strettoi e Masland (1998), no murganho, a distribuição dos fotorreceptores é de cerca de 97,2% para os bastonetes e de 2,8% para os cones. A prevalência de bastonetes relativamente à densidade de cones (32:1) justifica-se pelo facto de se tratar de uma espécie de hábitos noturnos.

Morfologicamente distinguem-se 4 regiões celulares nos fotorreceptores: o segmento externo que contém moléculas de pigmento visual, dispostas em pilhas de discos, rodeadas por membrana biológica. No segmento interno reúnem-se mitocôndrias, ribossomas e membranas onde as moléculas de pigmento visual se ligam. Por último, existe a região nuclear e a região sináptica, a qual contém neurotransmissores (Kolb et al., 2011).



**Figura 5 – Estrutura da retina com detalhe dos fotorreceptores.** MLI, membrana limitante interna; CG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; SE, segmentos externos dos fotorreceptores; SI, segmentos internos dos fotorreceptores. Microscopia electrónica de varrimento sobre tecido intacto. Barra: 6 µm. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge.

O tipo de pigmento visual acumulado no segmento externo determina o comprimento de onda de luz que a célula é capaz de absorver. A maioria dos Mamíferos, tal como o murganho, possui dois tipos de pigmentos visuais, a opsina acumulada nos cones e a rodopsina nos bastonetes (Lyubarsky et al., 1999).

O mecanismo de conversão da luz inicia-se através da absorção de fótons, que têm de atravessar todas as camadas celulares da retina até atingir o segmento externo dos fotorreceptores, local de ativação da cascata da fototransdução. Após a excitação das células pelos fótons, o grupo 11-cis-retinal do ftopigmento muda de configuração para trans-retinal, provocando o encerramento dos canais de sódio na membrana celular, causando uma diminuição do influxo de cargas positivas ( $\text{Na}^+$ ) para o interior do segmento externo (Wu, Chen, & Koutalos, 2006). Esta alteração do potencial traduz-se numa hiperpolarização da membrana que cessa a secreção de neurotransmissores (Penn & Williams, 1986). Quando a incidência de luz se reduz, a concentração de rodopsina tende a aumentar, uma vez que os bastonetes se tornam mais ativos. O aumento deste ftopigmento induz a abertura dos canais de sódio e uma corrente de iões de carga positiva para o interior da célula que despolariza a membrana, conduzindo à libertação de glutamato nas terminações sinápticas (Kolb et al., 2011). As alterações na taxa de libertação de neurotransmissores geram um potencial de ação ao longo das camadas celulares, responsável pela transmissão do impulso nervoso (Penn & Williams, 1986).

### **Neurónios de associação**

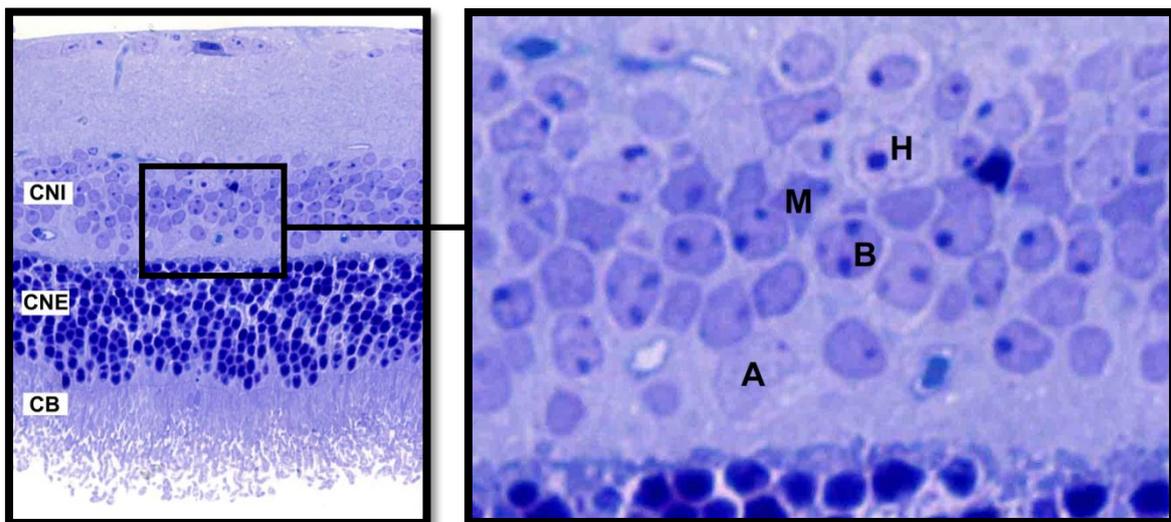
As células neuronais de associação incluem as células bipolares, horizontais e células amácrinas (Figura 6).

As células bipolares, predominantes na camada nuclear interna (Jeon et al., 1998) transferem o estímulo luminoso dos fotorreceptores para as células ganglionares e amácrinas. Morfologicamente distinguem-se pelo menos 9 tipos de células bipolares dos cones e 1 tipo de célula bipolar dos bastonetes, na retina de Mamíferos. De acordo com alguns estudos esta classe de células também se pode subdividir consoante a resposta à luz – *ON* e *OFF* (Wassle, Puller, Muller & Haverkamp, 2009).

Entre a camada plexiforme externa e a camada nuclear interna situam-se as células horizontais, que como o nome sugere dispõem os seus prolongamentos citoplasmáticos horizontalmente ao longo da retina, interagindo com fotorreceptores e células bipolares. A

maioria dos Mamíferos possui dois tipos de células horizontais, contudo, no murganho apenas existe um tipo (Watson, Paxinos & Puelles, 2012).

As células amácrinas encontram-se em grande concentração na camada nuclear interna. Podem considerar-se interneurónios de morfologia variada, cujo corpo celular se localiza no limite interno da camada nuclear interna e os seus prolongamentos estendem-se até à camada plexiforme interna (Watson et al.,2012).



**Figura 6 – População celular da retina: tipos celulares presentes na camada nuclear interna.** CB, camada de cones e bastonetes; CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; A, célula amácrina (núcleo); B, célula bipolar (núcleo); M, célula de Müller (núcleo); H, célula horizontal (núcleo). Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge.

### **Células ganglionares**

Os corpos celulares das células ganglionares concentram-se na camada ganglionar da retina. O nervo óptico reúne os axónios destas células que constituem as fibras do nervo óptico. Desta forma são as células ganglionares que se encarregam de transmitir a mensagem visual recolhida pelos neurónios de associação da retina até ao encéfalo (Kolb et al., 2011).

### **Células da nevrógia**

Para além dos neurónios de associação, na retina distinguem-se as células da nevrógia, indispensáveis para a integridade estrutural e nutrição da retina. No tecido glial descrevem-se as células de Müller e os astrócitos.

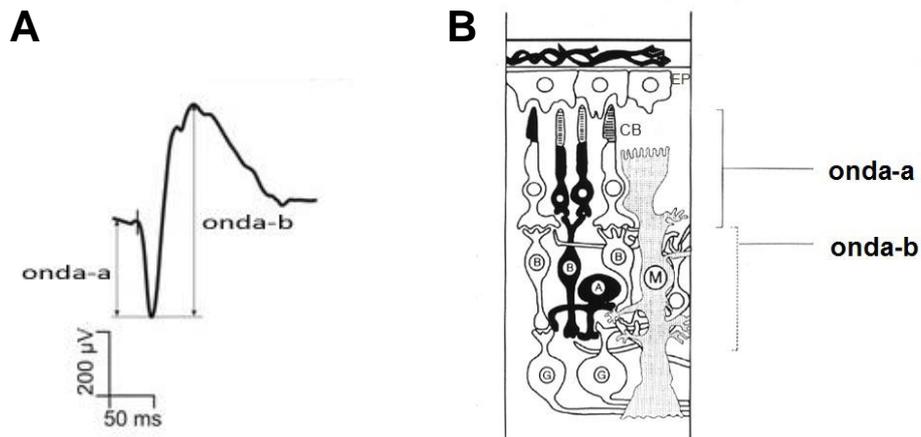
### **Células de Müller**

O suporte estrutural da retina é fornecido pelo arranjo arquitetónico tridimensional das células de Müller. Com os corpos celulares localizados na camada nuclear interna, estas células estendem-se ao longo das diferentes camadas da retina. Os seus prolongamentos citoplasmáticos dispõem-se em colunas, por entre as células retinianas, desde a membrana limitante interna até à membrana limitante externa, envolvendo os axónios das células ganglionares e os vasos sanguíneos. (Hollander et al., 1991). A membrana limitante interna forma a separação entre a retina e o corpo vítreo, constituindo uma importante barreira de difusão. Na membrana limitante externa, os prolongamentos citoplasmáticos das células de Müller unem-se aos segmentos internos dos fotorreceptores por uniões intercelulares (Kolb et al., 2011; Jorge, 2009).

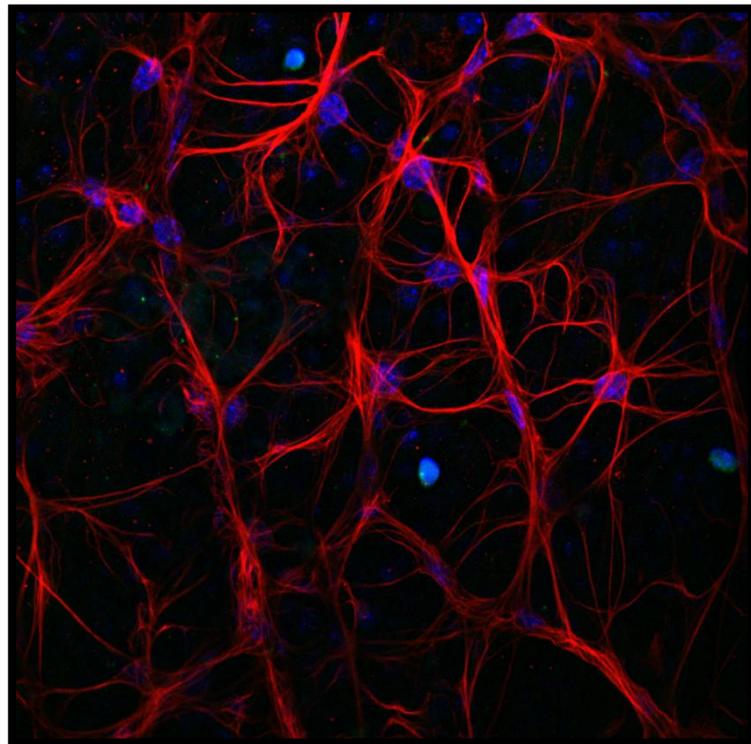
Consideradas as principais células da glia, para além do seu importante papel na sustentação estrutural da retina, são fundamentais para a sobrevivência das células neuronais retinianas: sintetizam enzimas e metabolitos necessários para o metabolismo das células nervosas; fagocitam detritos celulares; regulam a concentração de neurotransmissores, como o glutamato, caracterizando-se, inclusivamente, pela presença da enzima glutamato-sintetase; são responsáveis pela manutenção da homeostasia de iões, nomeadamente a monitorização do potássio ( $K^+$ ) extracelular. Para além disso, contêm consideráveis reservas de glicogénio, fonte de glicose para o metabolismo neuronal (Limb, Salt, Munro, Moss & Khaw, 2002; Kolb et al., 2011).

Segundo Kolb et al. (2011), o envolvimento destas células no mecanismo de regulação de  $K^+$  é responsável pela geração da onda -b no electrorretinograma (ERG) (Figura 7).

As células de Müller contêm filamentos intermédios imunorreativos para a vimentina e para a proteína glial fibrilar acídica (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Kolb et al., 2011; Limb et al., 2002). A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-GFAP é considerada como uma das mais fiáveis para identificação destas células.



**Figura 7 – Representação esquemática da origem das ondas características da eletrorretinografia. A:** ERG de murganho. Adaptado de Machalińska et al., 2010. **B:** A despolarização dos fotorreceptores origina a onda-a. Na geração da onda-b estão envolvidas principalmente as células de Müller. EP, epitélio pigmentar da retina; CB, cones e bastonetes; B, células bipolares; M, células de Müller; A, células amácrinas; G, células ganglionares. Imagem adaptada de Digital Journal of Ophtalmology ([www.djo.harvard.edu](http://www.djo.harvard.edu)).



**Figura 8 – Astrócitos nas camadas mais internas da retina.** Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP (original).

### **Astrócitos**

Os astrócitos caracterizam-se pela sua forma estrelada, restringindo-se a sua presença à camada das fibras do nervo óptico e à das células ganglionares (Figura 8). Os prolongamentos destas células circundam os axónios das células ganglionares e os vasos sanguíneos. As funções reguladoras, de sustentação, nutrição e homeostasia da retina, assumidas pelos astrócitos explicam a íntima aposição dos vários tipos celulares. Os prolongamentos citoplasmáticos dos astrócitos e células de Müller que envolvem os vasos sanguíneos, denominados “pés vasculares”, desempenham um papel importante nos processos de homeostasia e neovascularização da retina (Kolb et al., 2011).

### **Micróglia**

Ramón y Cajal (1920) descreveu um terceiro tipo celular, as células da micróglia. Considerados os macrófagos residentes da retina, as células da micróglia exercem funções necessárias para manter a homeostasia em situações de agressão traumática da retina. Os microgliócitos situam-se nos estratos mais superficiais da retina e após estímulos nocivos ativam-se, conduzindo à sua proliferação, migração, atividade fagocitária e secreção de mediadores da inflamação, sendo responsáveis pela cicatrização glial e imunorregulação da retina (Kolb et al., 2011; Langmann, 2007).

Observam-se outros dois tipos de células retinianas responsáveis por funções imunoreguladoras, nutritivas e sensoriais, as células do epitélio pigmentar da retina e as células vasculares que se descrevem nos capítulos seguintes (Jorge, 2009).

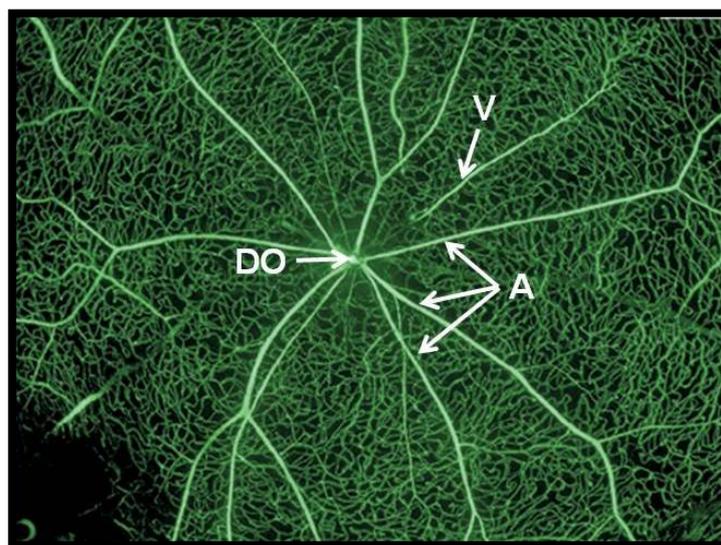
### **Vascularização da retina**

Como referido anteriormente, no processo visual, a luz tem de atravessar toda a espessura da retina para alcançar os fotorreceptores, pelo que a distribuição espacial das estruturas vasculares deve interferir o menos possível com a passagem da luz. Na verdade, as estruturas vasculares representam menos de 5% da massa retiniana total (Gardner, Antonetti, Barber, LaNoue & Levison, 2002).

Nos Roedores, o suprimento sanguíneo à retina tem duas origens diferentes, a artéria central da retina e os capilares da coroideia. Desde a zona mais interna da retina até à camada nuclear externa a vascularização realiza-se através da circulação intra-retiniana. Os restantes estratos mais externos dependem da circulação coroideia (65-85%). Estes dois

sistemas vasculares encarregam-se de satisfazer as elevadas necessidades de oxigénio e glucose das células nervosas (Kolb et al., 2011).

Os Roedores possuem uma retina do tipo holoangiótico, o que significa que a árvore vascular tem origem na artéria central da retina e se ramifica, desde o disco do nervo óptico até à periferia, em arteríolas, vénulas e numa extensa rede de capilares (Figura 9). Os vasos sanguíneos retinianos distribuem-se por três plexos vasculares: o plexo vascular superficial, situado na camada ganglionar, o plexo vascular intermédio, a nível da camada plexiforme interna, e, mais profundamente, o plexo vascular profundo que invade a camada plexiforme externa (Paques et al., 2003).

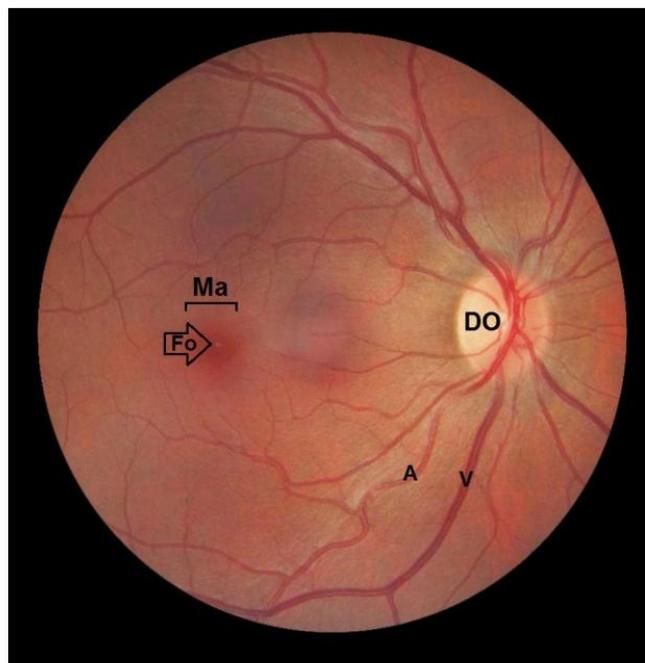


**Figura 9 – Padrão vascular da retina.** Injeção de fluoresceína. A partir do disco óptico a artéria central da retina ramifica-se em várias arteríolas retinianas que se distribuem radialmente até à periferia. As vénulas retinianas surgem num plano mais profundo e convergem no disco óptico. DO, disco óptico; A, arteríolas; V, vénula. Imagem cedida por Jesús Ruberte.

A artéria central da retina (*A. centralis retinae*) origina-se a partir da artéria oftálmica (*A. ophthalmica*). Ramifica radialmente em 5 a 7 arteríolas que posteriormente se subdivide em arteríolas pré-capilares, constituindo o plexo vascular superficial. À medida que os ramos das arteríolas se dividem, diminui a lúmen vascular e as paredes tornam-se mais finas até se continuarem com as dos capilares retinianos nos plexos vasculares intermédio e profundo (Watson et al., 2012). Os capilares terminam em vénulas pós-capilares ou nas arcadas venosas periféricas. Estas continuam-se com as vénulas, que aumentam de espessura parietal e calibre à medida que se aproximam do disco óptico. As vénulas

retinianas dispõem-se de forma intercalada com as arteríolas retinianas e terminam na veia central da retina (*V. centralis retinae*), efluente da veia oftálmica (*V. ophthalmica*) (Jorge, 2009).

No Homem, a estrutura e o padrão de distribuição vascular da retina são semelhantes aos do Murganho, apresentando, contudo, algumas particularidades (Figura 10). Na espécie humana existe a mácula lútea e fóvea central. Nestas, as camadas da retina estão reduzidas de forma a aumentar a transparência deste tecido. A rede capilar que rodeia esta área encarrega-se da nutrição e oxigenação da zona. A vascularização arterial é também diferente, uma vez que a artéria central da retina possui quatro ramificações, arteríola nasal superior (*Arteriola nasalis retinae superior*), arteríola nasal inferior (*Arteriola nasalis retinae inferior*), arteríola temporal superior (*Arteriola temporalis retinae superior*), e arteríola temporal inferior (*Arteriola temporalis retinae inferior*), que se dividem numa ampla rede capilar disposta, à semelhança do Murganho, em três plexos vasculares. O mesmo sucede com o sistema venoso, cujo padrão vascular consiste em quatro vénulas correspondentes (Kolb et al., 2011; Jorge, 2009).



**Figura 10 – Fundo do olho humano.** Ma, mácula lútea; Fo, fóvea central; DO, disco óptico; A, arteríola; V, vénula; (original).

As arteríolas e vénulas, de uma forma geral, são formadas por três túnicas: túnica íntima, média e adventícia.

Nas arteríolas, a túnica íntima ou interna está formada por uma camada única de células endoteliais, orientadas paralelamente ao eixo do vaso e assentes numa lâmina basal comum, e por tecido conjuntivo subendotelial. As células endoteliais relacionam-se entre si por zónulas de oclusão (*Zonulae occludentes*). Este tipo de epitélio não fenestrado constitui um dos componentes principais da barreira hemato-retiniana (Shakib & Cunha-Vaz, 1966).

A túnica média ou própria é formada por vários estratos de células musculares lisas, orientadas circularmente ao eixo central do vaso e que se encontram separadas entre si por uma membrana basal individual. O número de camadas de células musculares diminui à medida que os vasos se ramificam, de tal forma que as arteríolas pré-capilares apresentam apenas um revestimento descontínuo de músculo liso. Os capilares e vénulas pós-capilares de menor calibre veem-se reduzidos a apenas uma camada de pericitos (Jorge, 2009).

O limite externo das arteríolas e vénulas consiste na túnica adventícia, formada por alguns fibroblastos e fibras de colagénio dispostas ao acaso.

As veias de pequeno calibre têm três túnicas um pouco mais desorganizadas e algumas vénulas apenas apresentam um endotélio com a respetiva membrana basal. Os capilares intra-retinianos, que fazem a comunicação entre o sistema arterial e venoso, estão compostos apenas por células endoteliais, pericitos e membrana basal, o que permite um contacto direto com o tecido nervoso (Jorge, 2009; Junqueira & Carneiro, 2004).

A envolver as estruturas vasculares encontra-se um conjunto de células gliais que formam a membrana glial (*Glia limitans*), que separa os vasos do parênquima retiniano, delimitando o espaço perivascular. A membrana glial está constituída pelos ramos vasculares das células da nevrógia (células de Müller e astrócitos) (Jorge, 2009).

### **Barreira hemato-retiniana**

Um dos mecanismos desenvolvidos para controlar a difusão de substâncias entre o sangue e o parênquima retiniano é a barreira hemato-retiniana (Runkle & Antonetti, 2011). Esta barreira seletiva localiza-se em dois níveis, no epitélio pigmentar da retina e nas células endoteliais dos vasos constituindo as chamadas barreiras hemato-retinianas externa e interna, respetivamente (Murta, 1990). A barreira hemato-retiniana interna, para além de

estar formada pelo endotélio vascular, engloba também pericitos, membrana basal e membrana glial. Ao longo da barreira ocorrem zónulas de oclusão entre as células endoteliais, que são essenciais para impedir a passagem de macromoléculas. As células da nevrógia rodeiam os vasos sanguíneos, contribuindo para reforçar o isolamento do parênquima retiniano (Runkle & Antonetti, 2011; Simó et al., 2010).

No decurso das retinopatias, esta barreira sofre alterações que comprometem a permeabilidade seletiva, causando um desequilíbrio do tecido retiniano que se repercute na função visual (Simó et al., 2010).

### **RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

A inflamação define-se como um processo biológico complexo do organismo, em resposta a uma lesão ou infeção dos tecidos, e envolve uma série de mecanismos de reparação tecidular e do sistema imunitário, numa tentativa para restabelecer a homeostasia prévia do organismo e eliminar o estímulo nocivo (Cruvinel et al., 2010; Janssen & Henson, 2012). A reação de defesa do organismo é uma resposta inata, não específica, que precede as reações imunológicas específicas.

A resposta inflamatória desencadeia uma série de alterações hemodinâmicas no próprio tecido, estimulando a síntese local de mediadores químicos da inflamação que provocam o aumento da permeabilidade vascular, afetam as células endoteliais e ativam células inflamatórias (Yamashita et al., 1994). A vasodilatação e aumento da permeabilidade dos capilares provocam estase vascular que causa a expressão de moléculas de adesão (selectinas) nas células endoteliais, a que se ligam os leucócitos. A ativação das células endoteliais estimula a síntese de mediadores químicos da inflamação como a histamina, bradicinina e leucotrienos (Cruvinel et al., 2010). Os mediadores químicos unem-se a recetores específicos das células endoteliais, provocando a migração das células inflamatórias até ao foco da lesão. Por sua vez, de modo a amplificar a resposta, estes mecanismos produzem outros mediadores químicos, que se difundem para o espaço extracelular e passam para a circulação sanguínea. Entre estes, podemos referir as citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ), quimosinas, fatores da coagulação, complexo maior de histocompatibilidade e outros elementos que regulam a resposta imunitária inata e adquirida (Huang & Glass, 2010). As células inflamatórias que intervêm no mecanismo da inflamação são leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) macrófagos, plasmócitos e mastócitos. A migração de leucócitos é auxiliada por mecanismos de diapedese e

fenómenos de quimiotaxia, atraindo os últimos e favorecendo a saída dos mesmos para o espaço extravascular (Janssen & Henson, 2012). A mobilização de neutrófilos para o foco da lesão provoca a fagocitose dos elementos agressivos e liberta substâncias tóxicas para eliminar os mesmos (Huang & Glass, 2010).

Alguns anticorpos, as opsoninas, cobrem determinadas bactérias (opsonização), tornando a sua fagocitose por neutrófilos mais rápida e eficaz (Cruvinel et al., 2010).

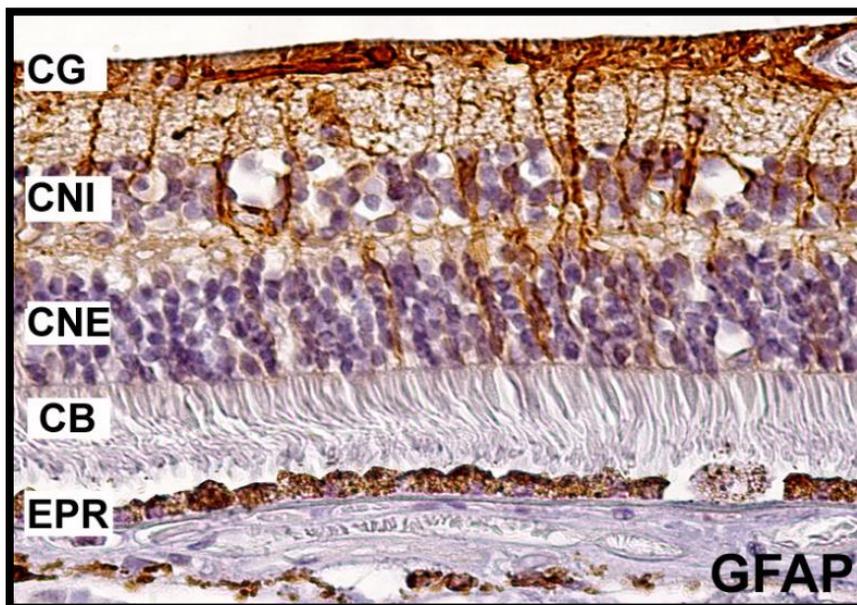
No final do processo ocorre a apoptose dos leucócitos, normalização dos níveis dos mediadores químicos e reparação do tecido lesionado, restabelecendo-se a homeostasia do sistema (Kohli & Levy, 2009). No entanto, a resolução da inflamação nem sempre toma este caminho. À medida que o processo inflamatório se desenvolve, os mecanismos de defesa descritos amplificam-se exponencialmente. Para contrabalançar existem mediadores endógenos anti-inflamatórios, proteínas que ativam vias inibidoras e genes repressores, que regulam e limitam a duração da fase aguda da inflamação. Quando a inflamação é exagerada ou prolongada (fase crónica), os tecidos afetados podem danificar-se de forma permanente, resultando na perda da estrutura e funções fisiológicas, como acontece nas doenças neurodegenerativas. O processo inflamatório evolui para uma remodelação do tecido destruído, cicatrização e fibrose, condicionando a funcionalidade do mesmo (Huang & Glass, 2010; Serhan et al., 2007).

A complexa estrutura e organização do globo ocular são fundamentais para o elevado grau de especialização dos seus tecidos constituintes, responsáveis pela função visual. Qualquer alteração na integridade e/ou transparência do mesmo é crítica, uma vez que, como já foi referido, qualquer interferência no delicado eixo de visão pode ser extremamente prejudicial (Caspi, 2010). Como tal, as estruturas do globo ocular desenvolveram a capacidade de regular e limitar respostas inflamatórias e imunológicas locais, de forma a preservar a visão, constituindo aquilo que Peter Medawar descreveu em 1940 como “privilégio imunológico”. Este fenómeno de regulação combina vários fatores de defesa que atuam em conjunto, modulando mecanismos locais e sistémicos, e que são nomeadamente, a barreira hemato-retiniana, substâncias imunossupressoras e células apresentadoras de antigénios. Contudo, na retina, a resposta inflamatória obedece aos mesmos mecanismos gerais referidos (Medawar, 1986).

Um processo biológico frequente nas retinopatias, bem como nas afeções do sistema nervoso, caracteriza-se pela ativação das células gliais em fases precoces do processo

inflamatório, numa tentativa de eliminar o estímulo agressor e de reparação tecidual (Bargagna-Mohan et al., 2010).

Conforme referido anteriormente, os astrócitos e células de Müller são os principais componentes da nevrógia (Duh, 2008; Wu, Madigan, Billson & Penfold, 2003). Ambos os tipos celulares contêm baixa quantidade de filamentos intermédios tipo III de vimentina e GFAP que, em condições fisiológicas, se concentram nas camadas mais internas da retina. A gliose reativa inicia-se com a ativação e possível hipertrofia das células gliais, que levam a uma sobre-expressão dos filamentos intermédios. No entanto, perante estímulos nocivos, são as células de Müller as principais responsáveis pelo aumento da produção de GFAP (Figura 11), como ocorre nas degenerescências retinianas por envelhecimento ou experimentais, distrofias retinianas, retinopatia diabética, isquémia retiniana e glaucoma, entre outras (Ho et al., 2009; Vecino & Garcia, 2004).



**Figura 11 – Gliose reativa em retina humana.** Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, revelada com DAB. CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de cones e bastonetes; EPR, epitélio pigmentar da retina. Imagem cedida por Luísa Mendes Jorge.

O aumento da expressão de GFAP acontece após a ativação transcricional do gene respectivo, nas células de Müller, e por esta razão é utilizado como marcador indicativo de gliose reativa nas células. (Vecino & Garcia, 2004; Wu et al., 2003). A indução do aumento

de GFAP está modulada por citocinas, fatores de crescimento, difusão de outras substâncias e infiltrado inflamatório até ao foco da lesão (Vecino & Garcia, 2004). O mecanismo continua-se com a projeção dos processos citoplasmáticos das células da glia para o espaço sub-retiniano, invadindo toda a retina, predominantemente com células de Müller ativas, produtoras de GFAP. O resultado desta ativação é a acumulação de tecido fibroso, no qual existem moléculas inibidoras de crescimento da matriz extracelular e de moléculas de adesão, como glicoproteínas e proteoglicanos, que limitam o crescimento dos axónios e a migração celular, impedindo as sinapses intercelulares, provocando degenerescência celular e alteração da função visual (Besharse & Bok, 2011).

### RETINOPATIAS

A retina caracteriza-se por ser uma estrutura delicada com uma organização muito particular de neurónios, células da glia e vasos sanguíneos. Quando este conjunto de alta complexidade sofre uma agressão, desenvolvem-se alterações importantes que interferem na função principal da retina, a visão. Compreender a etiologia destas entidades patológicas que condicionam um dos sentidos mais críticos para o ser humano é fundamental, sendo que a investigação na área da visão, na persecução de novos alvos terapêuticos, é considerada indispensável e de grande interesse, atendendo ao aumento da longevidade da população e o conseqüente aparecimento de doenças degenerativas. Destacam-se certo tipo de retinopias degenerativas, responsáveis pela perda de visão, com impacto crescente na qualidade de vida da população mundial.

#### Retinopia diabética

A *diabetes mellitus* é uma doença crónica, progressiva, de elevada prevalência na população humana, que apresenta como uma das complicações crónicas associadas a retinopia diabética. Segundo dados da *International Diabetes Federation*, esta doença sistémica tem vindo a aumentar e é atualmente considerada a 8ª causa de morte nos países desenvolvidos, sendo afetados 6% da população mundial. Em Portugal estima-se uma prevalência de 11,7%, e 85 a 95% dos doentes com diabetes são do tipo 2, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Subsequentemente, a retinopia diabética, como complicação microvascular da doença, é a maior causa de cegueira em adultos entre os 20 e os 74 anos de idade, e estima-se que cerca de 60% dos doentes com diabetes do tipo 2 sejam afetados. Clinicamente evidenciam-se duas fases de evolução: a retinopia diabética não proliferativa e a retinopia diabética proliferativa, embora todas as formas apresentem

hiperglicémia crónica que conduz a alterações metabólicas e lesões celulares importantes (Nabais et al., 2011).

### **Retinopatia hipertensiva**

A retinopatia hipertensiva surge associada a patologia cardiovascular de alta prevalência no ser humano. Em 2009, estimou-se que cerca de 42% dos habitantes de Portugal seriam hipertensos e esta taxa tende a aumentar à medida que a população envelhece (Cortez-Dias, Martins, Belo, Fiuza, 2009). A incidência é maior para indivíduos de idade mais avançada (superior a 64 anos), do sexo masculino, com excesso de peso e de raça negra (Queiroz, 2005). Na hipertensão arterial sistémica ocorrem uma série de alterações vasculares que se refletem na retina, e conseqüentemente na função visual (Ashton & Garner, 1979).

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

Considerada uma doença neurodegenerativa multifactorial da área central da retina, a degenerescência da mácula geralmente desenvolve-se em pacientes com idade superior a 60 anos, sendo uma das principais causas da perda de visão irreversível nos países mais desenvolvidos, uma vez que existe uma tendência crescente para o envelhecimento das populações (Cook, Patel & Tufail, 2008). Já em 2006, em Portugal calculou-se que existiam 310 000 doentes afetados com degenerescência macular precoce e 45 000 com a forma avançada e tardia (Cunha-Vaz & Lobo, 2006).

### **Retinite pigmentosa**

A retinite pigmentosa enquadra-se no conjunto das retinopatias degenerativas progressivas dos fotorreceptores, de carácter hereditário na maior parte dos casos (Farrar, Kenna & Humphries, 2002; Hamel et al., 2006). Este tipo de retinopatia representa uma das principais causas de perda de visão, com uma incidência aproximada de 1:4000, a nível mundial (Sen et al., 2008). Natarajan (2011) refere que a prevalência aumenta durante as primeiras 4 décadas da vida de cada indivíduo e que raramente se instala cegueira total. No entanto a função visual reduz-se em cerca de 25% dos pacientes com retinite pigmentosa.

### MODELO EXPERIMENTAL

O murganho é uma das espécies animais mais utilizadas na investigação biomédica. A escolha deste mamífero como modelo de investigação deve-se a uma série de fatores que permitem a reprodução das condições desejadas a analisar (Stahl et al., 2010). Uma das principais vantagens é a semelhança do código genético, em que cerca de 85% dos genes entre murganho e ser humano são coincidentes, o genoma é de aproximadamente o mesmo tamanho e conserva a mesma ordem (Twyman, 2002). De igual modo, mutações que nos humanos que causam processos patológicos, originam doenças semelhantes no murganho. Por outra parte, a sua elevada prolificidade e ciclo reprodutivo de curta duração permitem obter murganhos anatómica e fisiologicamente maduros rapidamente. Além do mais, existe uma grande variabilidade intra-espécie que pode ser vantajosa para análises genéticas e para criação de híbridos mutantes e transgênicos (Chalupa & Williams, 2008). Por estes motivos o murganho é utilizado com frequência para testar a eficácia e segurança de novos fármacos, para produzir vacinas e anticorpos monoclonais e para o estudo de mecanismos patogênicos de doenças humanas, entre as quais nos centramos nas retinopatias (Chalupa & Williams, 2008; Chorilli, Michelin & Salgado, 2007).

No que diz respeito à área da visão e, mais concretamente, ao estudo dos processos de retinopatia, o murganho constitui também o modelo experimental de eleição dadas as grandes semelhanças estruturais entre as retinas humana e de murganho.



### OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo caracterizar as alterações retinianas observadas no modelo murino de retinopatia pela injeção de iodato de sódio, com degenerescência dos fotorreceptores, por meio das técnicas de histologia de rotina, imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR. Deste modo, o que se pretende é estabelecer padrões de resposta das células de Müller que permitam identificar as fases do processo degenerativo-inflamatório que se desenvolve.

A definição deste padrões de resposta foi fundamental, devido à reduzida dimensão de uma retina de murganho, e a que, por vezes, a preparação específicas das amostras para cada metodologia, inviabiliza a execução de diferentes técnicas, numa mesma amostra de retina.

A utilização de um modelo murino de retinopatia com degenerescência dos fotorreceptores no âmbito do projeto de investigação “Análise de uma nova via de aporte de ferro à retina: papel da ferritina como proteína transportadora de ferro e o seu envolvimento na eliminação dos radicais livres - PTDC/SAU-ORG/110856/2009” tornou necessário estabelecer critérios objetivos que permitissem determinar as diferentes fases do processo degenerativo-inflamatório



### MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados 25 murganhos (*Mus musculus*) da estirpe ICR (CD-1) (Harlan Laboratories, Inc., Itingen, Suíça.), com idades compreendidas entre 4 e 6 meses.

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.

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

A administração sistémica de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ) provoca lesões específicas no epitélio pigmentar da retina e subsequente degenerescência dos fotorreceptores. Por esta razão o iodato de sódio é utilizado com frequência em modelos de indução de retinopatias degenerativas com apoptose dos fotorreceptores, em várias espécies, incluindo o murganho (Enzmann et al., 2006; Kiuchi, Yoshizawa, Shikata, Moriguchi & Tsubura, 2002).

Os murganhos, distribuídos em grupos de 4 animais cada, foram injetados intraperitonealmente com 100 mg/Kg de iodato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) em soro fisiológico (NaCl 0,9%), de maneira a obter-se uma solução final de 250 ml e foram eutanasiados 24, 48 e 72 horas após a injeção, respetivamente. Para cada grupo foi usado 1 animal injetado com igual volume de soro fisiológico como controlo negativo (Kiuchi et al, 2002). Assim, foram estabelecidos os seguintes tempos de estudo: Controlo,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ,  $T_{72}$ .

As retinas foram obtidas e processadas como descrito, em seguida, para estudo por meio das técnicas de histologia de rotina, imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR.

#### 3. OBTENÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS

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

A eutanásia dos animais foi realizada mediante anestesia com Isoflurano (Isoflo®, Esteves Veterinária, Carnaxide, Portugal), seguida de deslocamento cervical (Van Zutphen, Baumans & Beymen, 2001).

### 3.1. Obtenção dos globos oculares

Após enucleação dos globos oculares, estes foram colocados na solução recomendada pelo protocolo da técnica a efetuar. De um modo geral, a solução utilizada foi a solução-tampão de fosfato (*phosphate buffer saline*, PBS). No caso das amostras para a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (q-RT-PCR), a solução de lavagem foi água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% (*Fluka*® –Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América).

### 3.2. Extração das retinas

As retinas foram obtidas com recurso a um microscópio estereoscópico ou lupa binocular (Wild M3®, Heerbrugg, Suíça). Procedeu-se à fixação de cada globo ocular com pinças de insetos (FST®, 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. Posteriormente, com uma tesoura de microcirurgia, efetuou-se uma incisão ao longo do limbo da córnea para extrair o cristalino através da pupila e permitir o acesso à retina. Após seccionar o nervo óptico, a retina foi separada, deixando o epitélio pigmentar da retina aderente à coroideia.

Após a obtenção das retinas, cada técnica respeitou métodos de processamento diferentes, pelo qual no início de cada protocolo serão descritos em detalhe os procedimentos efetuados para a amostra a analisar.

## 4. PROCESSAMENTO DA RETINA PARA TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

### 4.1. Inclusão em parafina

- Fixação: imersão dos globos oculares em formol a 10% (NBF, *neutral buffered formalin*), durante 24 horas, à temperatura ambiente.

- Lavagem: eliminação do excesso de fixador com 4 passagens em Igepal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) a 0,1% em solução-tampão de fosfato (PBI), durante 2 horas, à temperatura ambiente, com agitação da amostra.
- Desidratação: imersão das amostras numa bateria de álcoois de concentração 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;
- Diafanização: passagem da peça durante 1 hora por xilol;
- Impregnação em parafina: impregnação das peças em parafina a 57°C, durante 24 horas, realizando-se uma mudança da parafina durante esse tempo.
- Formação do bloco de parafina (inclusão propriamente dita).
- Cortes com micrótomo: realização de cortes sagitais dos olhos, com 4 µm de espessura, em micrótomo Shandon Retraction AS325 (Rankin Biomedical Corp., Holly, Estados Unidos da América).
- Colagem dos cortes: flutuação dos cortes num banho de água destilada aquecida a 50-55°C; passagem das lâminas, previamente cobertas com silano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América), sob os cortes, de forma a que estes adiram.
- Secagem a 60°C durante 30 minutos.

### 5. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

As técnicas histológicas visam a preparação dos tecidos, mantendo a estrutura e organização dos mesmos intactos, de forma a identificar ao microscópio as características próprias dos tecidos e quaisquer alterações morfológicas que possam estar presentes. Para uma melhor visualização e diferenciação eficazes de tecidos e seus componentes recorre-se à coloração hematoxilina-eosina (Fischer, Jacobson, Rose & Zeller, 2008)

#### 5.1. Coloração de cortes histológicos com hematoxilina-eosina

Para a realização das técnicas histológicas, o protocolo utilizado para o processamento das amostras em cortes histológicos de retina, incluídas em parafina, foi o seguinte:

- Desparafinização: 2 passagens em xilol de 5 minutos cada.
- 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 em água corrente durante 5 minutos.
- Hematoxilina de Harris: 1 banho de 5 a 10 minutos.
- Lavagem em água corrente durante 5 minutos.
- Ácido clorídrico a 0,25% em álcool a 70° (álcool clorídrico): 1 passagem rápida.
- Lavagem em água corrente durante 5 minutos.
- Eosina: 1 banho de 30 segundos a 1 minuto.
- Desidratação rápida: 2 passagens em álcool a 96° durante 5 minutos cada;  
1 passagem em álcool a 100° durante 5 minutos.
- Diafanização: 2 passagens em xilol durante 5 minutos cada.
- Montagem das lâminas: cobriu-se o corte ainda húmido com Entellan®;  
cobriu-se com lamela;
- Lutagem: selou-se com verniz.
- Observação: as retinas foram observadas num microscópio óptico Nikon Eclipse E-800  
e fotografadas com uma câmara digital Nikon DXM 1200F.

## 6. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS

A imunohistoquímica é uma ciência que combina técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas para identificar tipos celulares ou determinados constituintes celulares pela interação específica anticorpo-antigénio. A ligação de anticorpos a epítomos moleculares específicos torna-se visível pela utilização de anticorpos conjugados a substâncias detectáveis, específicos para o antigénio selecionado. Desta forma, permite localizar componentes celulares e intercelulares, sobretudo proteínas e enzimas. É também uma técnica bastante utilizada para a identificação celular e estudo da distribuição das células nos diversos tecidos (Luttmann, Bratke & Küpper, 2006).

### 6.1. Imunohistoquímica sobre cortes histológicos

Para a realização das técnicas imunohistoquímicas, o protocolo utilizado para o processamento das amostras em cortes histológicos de retina, incluídas em parafina, foi o seguinte:

- Desparafinização: 2 passagens de 5 minutos cada em xilol.
- 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: 1 passagem em água destilada de 5 minutos;
  - 1 passagem em solução-tampão (WB, *wash buffer*) de 5 minutos.
- Montagem da câmara de incubação.
- Lavagem com água destilada durante 5 minutos;
- Lavagem com WB durante 5 minutos;
- Incubação do anticorpo primário (*rabbit anti-mouse* GFAP, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca):
  - anti-GFAP (1:500) em WB + 10% soro bloqueador;
  - incubação em câmara húmida, a 4°C, durante toda a noite.
- Lavagem: 3 lavagens de 5 minutos cada com PBI.
- Incubação do anticorpo secundário:
  - anti-IgG *rabbit* biotinilado (1:100) em WB;
  - incubação em câmara húmida, à temperatura ambiente, durante 2 horas.
- Lavagem: 3 lavagens de 5 minutos cada com PBI.
- Incubação do fluorocromo:
  - estreptavidina conjugada com Alexa Fluor® 488 (1:100) em PBS;
  - incubação em câmara húmida, à temperatura ambiente, durante 2 horas.
- Lavagem: 3 lavagens de 5 minutos cada com PBI.
- Coloração dos núcleos:
  - To-Pro®-3 iodide (1:100) em PBS durante 5 minutos.
- Lavagem: 3 lavagens de 5 minutos cada com PBI.
- Montagem das lâminas com Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e colocação de lamela;
  - secagem durante 1 hora à temperatura ambiente;
- Lutagem: selou-se com verniz.
- Observação: as retinas foram observadas num microscópio de varrimento laser confocal Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems GmbH, Westzlar, Alemanha).

O controlo negativo foi sempre realizado, suprimindo a adição do anticorpo primário. Após a adição do fluorocromo, as amostras foram processadas em câmara escura para evitar a extinção da fluorescência.

### 7. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

A determinação da proteína total permitiu quantificar a concentração de proteína de cada amostra, de forma a otimizar a deteção por *Western Blotting*. Para este estudo, a quantificação proteica da amostra foi realizada através de dois métodos:

#### 7.1. Método *Bicinchoninic Acid Protein (BCA)* ou de Smith

Foi utilizado o kit da Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América – *Bicinchoninic Acid Protein assay*® e respeitou-se o protocolo sugerido (*Standart 2.1ml Assay Protocol*).

O princípio do método do ácido bicinconínico (BCA) baseia-se na formação de complexos proteína-cobre em meio alcalino. O processo consiste na redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  pelas proteínas, com a deteção colorimétrica do ião  $\text{Cu}^+$ . O BCA une-se ao  $\text{Cu}^+$  e forma um produto de cor roxa, com forte absorvância a 562 nm, que é linear com concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma extensa gama de concentrações (200  $\mu\text{g/ml}$  – 1000  $\mu\text{g/ml}$  ou 20-100  $\mu\text{g}$  de proteína total) (Smith et al., 1985).

##### 7.1.1. Preparação do reagente BCA (solução A+B)

- Reagente BCA: adicionaram-se 50 partes do reagente A a 1 parte do reagente B;  
diluiu-se a solução com água MilliQ (1:5).

##### 7.1.2. Preparação das amostras de retina

As retinas foram obtidas como descrito anteriormente, após o que foram colocadas na solução de lise: 300  $\mu\text{l}$  de tampão RIPA com 1/8 de comprimido de EDTA mini complete (Roche, Amadora, Portugal, Amadora, Portugal).

- Maceração mecânica da amostra com auxílio de um bisturi.
- Homogeneização em vórtex (VWR® International, Carnaxide, Portugal), durante 1 minuto.
- Sonicação (Bandelin Sonoplus®, Berlim, Alemanha) a 50 W de potência, 9 ciclos, em gelo, durante 5 minutos.
- Desnaturação proteica: adicionou-se 2-mercaptoetanol a cada amostra (5:100);  
colocou-se em banho seco a 95°C, durante 15 minutos.
- Centrifugação a 10000x g, em refrigeração (4°C), durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante.

- Diluição da amostra: prepararam-se diluições seriadas da amostra a quantificar:

Amostra total: 100  $\mu$ l + 2 ml reagente BCA;

Diluição (1:5): 20  $\mu$ l amostra + 80  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Diluição (1:10): 10  $\mu$ l amostra + 90  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Controlo negativo: 100  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA.

### 7.1.3. Preparação da solução da curva-padrão com albumina sérica bovina (BSA)

- Diluição: prepararam-se diluições seriadas a partir da solução-padrão (1 mg/ml de BSA) em RIPA:

Diluição 100  $\mu$ g/ml: 10  $\mu$ l BSA + 90  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Diluição 200  $\mu$ g/ml: 20  $\mu$ l BSA + 80  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Diluição 400  $\mu$ g/ml: 40  $\mu$ l BSA + 60  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Diluição 600  $\mu$ g/ml: 60  $\mu$ l BSA + 40  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA;

Diluição 800  $\mu$ g/ml: 80  $\mu$ l BSA + 20  $\mu$ l RIPA + 2 ml reagente BCA.

### 7.1.4. Quantificação

- Incubação: colocaram-se todos os tubos em banho-maria a 60°C, durante 15 minutos.
- Leitura: transferiram-se as soluções para as cuvetes de espectrofotómetro;  
determinar as absorvâncias a 562 nm no espectrofotómetro (*Ultrospec 3100 Pro*, GE Healthcare, Madrid, Espanha).
- Quantificação: construiu-se a curva-padrão com os resultados da solução BSA;  
determinou-se a concentração de proteína para cada uma das diluições da amostra de retina, utilizando a equação da curva-padrão.

## 7.2. Método de Bradford

O método de Bradford (1976) utiliza o corante Azul Brilhante G para a quantificação proteica. O corante, presente no reagente de Bradford, interage com as proteínas e provoca um desequilíbrio, no pH de reação. Os complexos proteína-corante formados absorvem fortemente a 595 nm (Zaia, Zaia, & Lichtig, 1998). O reagente de Bradford utilizado foi adquirido pela Sigma Aldrich (Reagente de Bradford - B 6916, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América).

### 7.2.1. Preparação do reagente de Bradford

- Reagente de Bradford: diluiu-se a solução concentrada com água MilliQ (1:5).

### 7.2.2. Preparação da amostra

As retinas foram obtidas como descrito anteriormente, após o que foram colocadas na solução de lise: 300 µl de tampão RIPA com 1/8 de comprimido de EDTA *mini complete* (Roche, Amadora, Portugal).

- Maceração mecânica da amostra com auxílio de um bisturi.
- Homogeneização em vórtex (VWR® International, Carnaxide, Portugal), durante 1 minuto.
- Sonicação (Bandelin Sonoplus®, Berlim, Alemanha) a 50 W de potência, 9 ciclos, em gelo, durante 5 minutos.
- Desnaturação proteica: adicionou-se 2-mercaptoetanol a cada amostra (5:100); colocou-se em banho seco a 95°C, durante 15 minutos.
- Centrifugação a 10000x g, em refrigeração (4°C), durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante.
- Diluição da amostra: prepararam-se diluições seriadas da amostra a quantificar:
  - Diluição (1:2): 25 µl amostra + 25 µl RIPA + 1,5 ml reagente BCA;
  - Branco: 50 µl RIPA + 1,5 ml reagente BCA.

### 7.2.3. Preparação da solução para a curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA)

- Diluição: prepararam-se diluições seriadas a partir da solução-padrão (1 mg/ml de BSA) em RIPA:

Diluição 0,05 mg/ml: 2,5 µl BSA + 47,5 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,1 mg/ml: 5 µl BSA + 45 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,2 mg/ml: 10 µl BSA + 40 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,3 mg/ml: 15 µl BSA + 35 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,4 mg/ml: 20 µl BSA + 30 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,5 mg/ml: 25 µl BSA + 25 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,6 mg/ml: 30 µl BSA + 20 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,7 mg/ml: 35 µl BSA + 15 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,8 mg/ml: 40 µl BSA + 10 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 0,9 mg/ml: 45 µl BSA + 5 µl RIPA + 1,5 ml do reagente de Bradford;

Diluição 1.0 mg/ml: 50 µl BSA + 1,5 ml do reagente de Bradford.

### 7.2.4. Quantificação

- Leitura: transferiram-se as soluções para as cuvetes de espectrofotómetro; determinaram-se as absorvâncias a 595 nm no espectrofotómetro (*Ultrospec 3100 Pro, GE Healthcare, Madrid, Espanha*).
- Quantificação: construiu-se a curva-padrão com os resultados da solução BSA; determinou-se a concentração de proteína para cada uma das diluições da amostra de retina, utilizando a equação da curva-padrão.

## 8. WESTERN BLOTTING

Em Biologia Molecular, o termo “*blotting*”, faz referência à transferência de uma substância que se deseja identificar para uma membrana (Luttmann et al., 2006). O *Western Blotting* ou *Immunoblotting* foi introduzido por Towbin em 1979 e é hoje em dia, uma das técnicas de análise e deteção de proteínas mais utilizada. De uma forma sucinta, o método envolve a separação das várias proteínas num gel de electroforese, ao qual se aplica uma corrente eléctrica, que resulta na migração e separação das mesmas conforme o peso molecular. A electroforese também transfere as proteínas para a superfície de uma membrana de alta afinidade, produzindo uma réplica do gel original. A proteína a ser identificada é visualizada na membrana por meio de um anticorpo específico contra essa proteína. O protocolo de *Western Blotting* utilizado foi baseado no protocolo sugerido pela Abcam, Cambridge, Reino Unido (Katoch, 2011).

### 8.1. Preparação das amostras

Após a extração das retinas como descrito anteriormente, estas foram colocadas na solução de lise: 100 µl de tampão RIPA com 50 µl de corante 3DB e 1/16 de comprimido de EDTA *mini complete* (Roche, Amadora, Portugal).

- Maceração mecânica da amostra com auxílio de um bisturi.
- Homogeneização em vórtex (VWR® International, Carnaxide, Portugal), durante 1 minuto.
- Sonicação (Bandelin Sonoplus®, Berlim, Alemanha) a 50 W de potência, 9 ciclos, em gelo, durante 5 minutos.
- Desnaturação proteica: adicionou-se 2-mercaptoetanol a cada amostra (5:100); colocou-se em banho seco a 95°C, durante 15 minutos.

- Centrifugação a 10000x g, em refrigeração (4°C), durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante.

### 8.2. Preparação do gel de poliacrilamida

- Montagem do *casting* de SDS-PAGE (*Electroforesis KuroGel Verti 10104K*, VWR® International, Carnaxide, Portugal).
- Gel de resolução: adicionou-se o gel de 12 % de acrilamida ao *casting*; adicionou-se água MilliQ para alinhar o gel e retirar bolhas de ar.
- Polimerização à temperatura ambiente, durante 30 minutos e remoção da água MilliQ.
- Gel de concentração: adicionou-se o gel de 4% de acrilamida ao *casting* e colocou-se o pente de 12 poços.
- Polimerização a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

### 8.3. Electroforese unidimensional

- Montagem do *casting* de electroforese; adicionou-se o tampão de corrida à tina de electroforese; retirou-se pente formador de poços.
- Preparação da corrida: colocaram-se as amostras e marcador molecular (*NZY Colour Protein Marker II*, NZYTech Lda, Lisboa, Portugal) nos respetivos poços; ligou-se à fonte de alimentação.
- Electroforese: aplicou-se uma voltagem constante de 80-120 V, durante o tempo necessário.

### 8.4. Transferência por electroforese

- Ativação da membrana de PVDF (*Immobilon-P Transfer membrane™*, Merck Millipore, Darmstad, Alemanha):
  - 1 passagem em metanol de 1 minuto;
  - equilíbrio no tampão de transferência, durante 20 minutos.
- Montagem do *casting* de transferência:
  - cortou-se o gel de concentração e deixou-se a equilibrar no tampão;
  - montou-se a cassette, colocando o gel, em íntima aposição com a membrana, entre as esponjas e papel de filtro;
  - colocou-se a cassette no *casting*.
- Preparação da transferência: adicionou-se o tampão de transferência.

refrigerou-se a tina com um circuito de água fria corrente e gelo.

- Electroforese: aplicou-se uma corrente elétrica de voltagem constante 20-30 V, durante 16 horas.

### 8.5. Colorações

- Desmontagem: abriu-se a cassette de transferência para extrair a membrana e o gel.
- Lavagem da membrana: 1 passagem em água MilliQ de 5 minutos.
- Coloração da membrana: 1 passagem no corante Ponceau S de 1 minuto.
- Lavagem da membrana: 1 passagem em água MilliQ de 5 minutos.
- Coloração do gel: 1 passagem em corante azul brilhante de Coomassie, sob agitação, durante 4 horas.
- Descoloração do gel: 2 passagens na solução descorante de 10 minutos cada.
- Observação do gel: fotografou-se sob luz ultra-violeta (Image Master® VDS, Pharmacia Biotech, Suíça) utilizando o programa Liscap Image Capture versão 1.0 (Pharmacia Biotech, Suíça).

### 8.6. Bloqueio

- Lavagem: 2 passagens da membrana em Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) a 0,05% em solução-tampão de fosfato (PBST), sob agitação, durante 10 minutos cada.
- Bloqueio: incubação em solução de bloqueio, durante 1 hora, a temperatura ambiente, em agitação.
- Lavagem: 2 passagens da membrana em PBST, sob agitação, durante 10 minutos cada.

### 8.7. Imunodeteção

Para este método foram necessários dois anticorpos primários, o anticorpo que reconhece a proteína que interessava detetar (GFAP) e um anticorpo de *loading control* (anti- $\beta$ -actina).

Anticorpo	Descrição	Especificidade	Peso molecular	Origem
<i>goat anti-mouse</i> GFAP	Policlonal (IgG)	células de Müller e astrócitos	48 - 50kDa	Abcam (ab533554)
<i>rabbit anti-mouse <math>\beta</math>-actina</i>	Policlonal (IgG)	citoesqueleto celular	42kDa	Abcam (ab8227)

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados.

Anticorpo	Descrição	Origem
<i>donkey anti- goat IgG – HRP</i>	Policlonal (IgG)	Abcam (ab97110)
<i>goat anti- rabbit IgG – HRP</i>	Policlonal (IgG)	Southern Biotech (4030-05)

**Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados.**

- Incubação do anticorpo primário:

anti-GFAP (0,3 µg/ml) + solução de bloqueio;

incubação a temperatura ambiente, sob agitação, durante 2 horas;

anti β-actina (1: 1000) + solução de bloqueio;

incubação a temperatura ambiente, sob agitação, durante 2 horas.

- Lavagem: 1 passagem de 15 minutos em PBST, sob agitação;

1 passagem de 10 minutos em PBST, sob agitação;

1 passagem de 5 minutos em PBST, sob agitação.

- Incubação do anticorpo secundário:

*anti-goat* (1:75000) + solução de bloqueio;

incubação a temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos;

*anti-rabbit* (1:5000) + solução de bloqueio;

incubação a temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos.

- Lavagem: 1 passagem de 15 minutos em PBST, sob agitação;

1 passagem de 10 minutos em PBST, sob agitação;

1 passagem de 5 minutos em PBST, sob agitação.

### 8.8. Revelação por quimioluminescência

- Reação de quimioluminescência: adicionou-se à superfície da membrana o reagente quimioluminescente (*ECL Luminata crescendo™-Western HRP substrate*, Merck Millipore, Darmstad, Alemanha) e deixou-se atuar durante 5 minutos.

- Montagem: colocou-se a membrana na cassete de revelação.

- Exposição da película *Amersham Hyperfilm ECL* (*GE Healthcare*, Madrid, Espanha) na câmara escura, durante o tempo necessário.

- Revelação manual: 1 passagem pelo líquido revelador, durante 5 minutos.
- Lavagem: 1 passagem em água corrente, durante 5 minutos.
- Fixação manual: 1 passagem pelo líquido fixador, durante 5 minutos.
- Lavagem: 1 passagem em água corrente, durante 5 minutos.
- Quantificação das bandas reveladas por análise de densitometria óptica pelo programa de análise de imagens "Image J 1.46r" (National Institutes of Health®, Estados Unidos da América).

### 9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (q-RT-PCR)

A técnica de q-RT-PCR é frequentemente utilizada para análise e quantificação da expressão génica de amostras biológicas, por meio de deteção do ácido ribonucleico (ARN) constituinte. Para tal, o ARN mensageiro (ARNm) deve ser retrotranscrito numa cadeia de ácido desoxirribonucleico complementar (ADNc), reação modulada pela enzima transcriptase. Para o início da reação q-RT-PCR, é necessário a presença de iniciadores de síntese (*primers*) cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. A q-RT-PCR permite quantificar em tempo real o ADNc em cada ciclo de amplificação. (Kubista et al., 2006; Nascimento, Suarez & Pinhal, 2010).

A deteção do ADNc amplificado, foi realizada com o fluorocromo intercalador de *DNA Sybr Green I* (PCR-Master mix, Applied Biosystem™, Foster, Estados Unidos da América). Este corante liga-se às cadeias duplas de ADNc sintetizadas em cada ciclo sucessivo. A deteção direta da quantidade de ADNc é proporcional à intensidade de fluorescência emitida (Storch, 2007).

A expressão génica relativa é determinada a partir da comparação da expressão do gene-alvo com um ou mais genes constitutivos, também designados por *housekeeping genes*. Tais genes são utilizados como controlo endógeno da expressão génica, uma vez que apresentam níveis de expressão constante, isto é, não sofrem oscilações significativas na expressão mediada. Para este estudo em concreto, escolhemos o gene que regula a proteína  $\beta$ -actina para comparar com a expressão do gene de interesse, *GFAP* (Suzuki, Higgins & Crawford, 2000).

### 9.1. Preparação das amostras

As retinas foram obtidas como descrito anteriormente e colocadas imediatamente em 350 µl de solução de lise: 10 µl 2-mercaptoetanol com 1000 µl de solução RLT (*buffer RLT*®, Qiagen, Hilden, Alemanha).

### 9.2. Extração de ARNm

A extração e purificação de ARN das amostras utilizadas neste estudo foram realizadas através do *RNeasy*® mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), respeitando-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

- Precipitação: adicionou-se igual volume de etanol a 70% à amostra lisada.
- Montagem: transferência de 700 µl da solução para colunas *RNeasy* de centrifugação do kit (*RNeasy spin column*).
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 30 segundos; eliminação do líquido no fundo da coluna.
- Lavagem: adicionou-se 350 µl de solução de lavagem RW1.
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 30 segundos; eliminação do líquido no fundo da coluna.
- Digestão de ADN: adicionou-se 10 µl da solução de enzima *DNase* e 70 µl da solução RDP a cada amostra; aguardou-se 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavagem: adicionou-se 350 µl de solução de lavagem RW1.
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 30 segundos; eliminação do líquido no fundo da coluna.
- Lavagem: adicionou-se 500µl da solução RPE (4 volumes etanol 96° + tampão *RPE*®).
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 30 segundos; eliminação do líquido no fundo da coluna.
- Lavagem: adicionou-se 500µl da solução RPE.
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 30 segundos; descartou-se o líquido no fundo da coluna.
- Transferiu-se cada amostra para um microtubo de 1,5ml.
- Eluição: adicionou-se 40 µl de água pura RNase diretamente na membrana e aguardou-se 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugação a uma velocidade igual ou superior a 8000x g, a 4°C, durante 1 minuto; recolheu-se o ARN eluído.

### 9.3. Quantificação do ARN

A concentração do ARN total obtido de cada amostra foi determinada por espectrofotometria (Nanodrop® 2000, ThermoScientific, Waltham, Estados Unidos da América) a 260 nm. A pureza e a integridade do ARN total foram avaliadas com base no quociente entre as absorvâncias medidas a 260 nm e a 280 nm.

### 9.4. Retrotranscrição de ARNm

O “*High Capacity RNA-to-cDNA kit*” (Applied Biosystems™, Foster, Estados Unidos da América.) foi utilizado para a transcrição de ARNm. Como tal, seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Cada reação de RT-PCR de volume final de 20 µl deveria conter 500 ng de ARN total, 50 nM de *RT Random Primers*, 0,25 mM de cada nucleótido d’NTPs e 3,33 U/µl da *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 0,25 U/µl de *RNase inhibitor*.

A Tabela 3, fornecida pelo fabricante, indica os volumes dos reagentes necessários.

Reagentes	Volume /1x reação
<i>RT Buffer 10x</i>	2 µl
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i>	1 µl
d’NTPs 25x	0,8 µl
<i>RT Random Primers 10x</i>	2 µl
<i>RNase inhibitor</i>	1 µl
<i>RNeasy free water</i>	3,2 µl
ARN total	10µl
<b>Total por reação</b>	<b>20 µl</b>

**Tabela 3 - Volumes necessários para preparação uma da reação de RT-PCR.** Adaptada de [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

- Retrotranscrição: submeteu-se cada amostra a um programa de três fases (10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C) num termociclador Doppio ® (VWR® Internacional, Carnaxide, Portugal).

### 9.5. Preparação dos primers

No presente estudo foram analisados dois genes referentes à espécie *Mus musculus*: *GFAP* e *β-actina*. Os primers utilizados estão listados na tabela seguinte:

Gene		Primers no sentido 5'-3'	Temperatura de annealing	%G+C	Origem
<b>GFAP</b>	F	AAGGTTGAATCGCTGGAGGA	58,3°C	50	NZYTech
	R	CTGTGAGGTCTGGCTTGGC	58°C	63	
<b>β-actina</b>	F	TGTTACCAACTGGGACGACA	Gentilmente cedidos pelo Prof. Doutor		
	R	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	António Duarte (Trindade, A, 2008)		

Tabela 4 - Primers utilizados.

- Reconstituição: adicionou-se o volume de água pura (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) ao primer liofilizado para obter uma solução de 100 µM.
- Homogeneizou-se em vórtex, durante 1 minuto.
- Diluiu-se cada primer a 2 pmol/µl.

### 9.6. Amplificação ADNc

Foram adicionados os volumes dos reagentes necessários para uma reação de 25 µl, seguindo a tabela fornecida pelo fabricante como referência:

Reagentes	Volume /1x reação
2x SYBR green	6,25 µl
Primer Forward (2pmol/µl)	1 µl
Primer Reversed (2pmol/µl)	1 µl
ADNc (3,125 ng/µl)	1 µl
RNeasy free water	3,25 µl
<b>Total por reação</b>	<b>12,5 µl</b>

Tabela 5 - Volumes necessários para preparação de uma reação de PCR de 25 µl. Adaptada de [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

- Amplificação ADNc: pipetou-se 12,5 µl para cada poço da placa (*Micro Amp Fast® 96 well Reactor Plate of 0,1 ml*, Applied Biosystem™, Foster, Estados Unidos da

América). q-RT-PCR realizada com StepOne plus (Applied Biosystem™, Foster, Estados Unidos da América) programado para 40 ciclos (desnaturação inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e de 1 minuto a 60°C).



**RESULTADOS****1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

A análise histológica dos cortes de retina fixados em formol e incluídos em parafina, para observação em microscopia óptica convencional, foi o ponto de partida deste trabalho. Foram avaliadas as alterações morfológicas, visto que, a compreensão dos fenómenos tecidulares que ocorrem na inflamação é fundamental para o presente estudo.

De forma a evidenciar os componentes celulares do tecido, recorreu-se à coloração de hematoxilina-eosina. Esta técnica de coloração visa a identificação e diferenciação de tecidos orgânicos, uma vez que devido às propriedades ácidas ou básicas dos corantes constituintes, estes se ligam aos componentes acidófilos ou basófilos, respetivamente (Fischer et al., 2008; Junqueira & Carneiro, 2004).

**Retina-controlo**

A retina-controlo apresentou uma arquitetura normal, com a distribuição espacial dos diferentes tipos celulares nos respetivos estratos retinianos (Figura 12A). Externamente identificou-se a camada dos fotorreceptores, bem definida, com os núcleos destas células dispostos na camada nuclear externa. Na camada nuclear interna observaram-se os corpos celulares das células normalmente presentes neste estrato. Internamente, e como esperado, a camada de células ganglionares surgiu sem alterações e delimitada pela membrana limitante interna.

**T 24**

A retina do animal eutanasiado 24 horas após a administração de iodato de sódio exibiu alterações estruturais evidentes, sobretudo a nível dos estratos mais externos da retina, observando-se o início da desorganização da camada nuclear externa (Figura 12B). As restantes camadas não apresentaram alterações significativas.

**T 48**

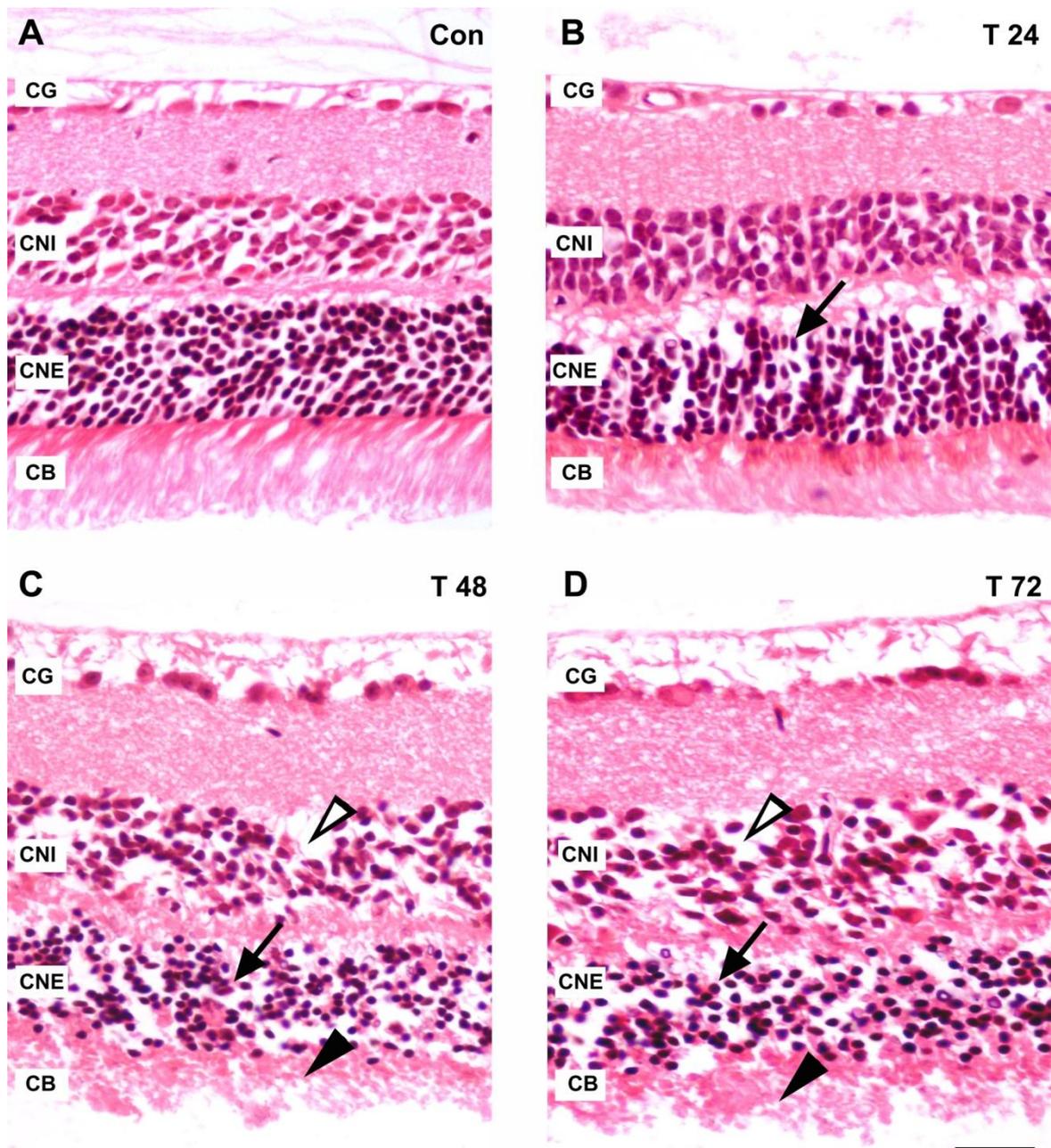
Transcorridas 48 horas da injeção intraperitoneal de iodato de sódio, detetou-se uma marcada alteração da estrutura retiniana, tanto nos estratos mais externos como nos mais internos. O estrato dos fotorreceptores apresentava lesões significativas associadas a uma acentuada redução do número destas células, de tal modo que se podiam observar zonas em que, devido à perda progressiva de fotorreceptores, esta camada tinha desaparecido completamente (Figura 12C). Relativamente à fase anterior, verificou-se um aumento do

grau de desorganização dos núcleos da camada nuclear externa. A camada nuclear interna exibiu igualmente uma extensa desorganização, com diminuição do número de núcleos e alteração da sua distribuição espacial. A nível da camada das células ganglionares, da camada das fibras do nervo óptico e da membrana limitante interna observaram-se igualmente alterações, com alterações da arquitetura tecidual (Figura 12C).

### **T 72**

Foram avaliadas as alterações 72 horas após a administração de iodato de sódio, período em que está descrito o início da fase de resolução do processo inflamatório (Kiuchi et al., 2002). As lesões estruturais observadas traçavam uma imagem histológica semelhante à observada às 48 horas (Figura 12D).

A análise dos cortes histológicos das retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub>, e T<sub>72</sub> permitiu comprovar o estabelecimento do processo degenerativo dos fotorreceptores e caracterizar, em cada uma das fases definidas para o modelo de retinopatia em estudo, a evolução das lesões morfológicas e estruturais da retina.



**Figura 12 - Cortes histológicos de retina de murganho após injeção de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ).**  
**A (Con):** arquitetura normal da retina. **B ( $T_{24}$ ):** aspecto da desorganização dos núcleos dos fotorreceptores na camada nuclear externa (seta); a camada de fotorreceptores mantém a integridade. **C ( $T_{48}$ ):** redução do número de fotorreceptores (cabeça de seta preta), associada a uma extensa desorganização dos núcleos das camadas nuclear externa (seta) e interna (cabeça de seta branca). **D ( $T_{72}$ ):** degenerescência dos fotorreceptores (cabeça de seta), com alteração de toda a estrutura da retina, incluindo as camadas nuclear externa (seta) e interna (cabeça de seta branca). CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de fotorreceptores (cones e bastonetes). Coloração histológica de Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$  (original).

## **2. TÉCNICAS IMUNOHISTOQUÍMICAS**

As técnicas de imunohistoquímica baseiam-se na interação específica anticorpo-antígeno, permitindo identificar e quantificar a proteína em estudo, neste caso a GFAP, específica das células da nevrógia. A sobre-expressão deste filamento intermédio nas células de Müller representa um sinal precoce específico de gliose reativa. A gliose é um processo biológico que ocorre quando as células nervosas sofrem agressões, como sucede nas retinopatias. A ativação das células de Müller produtoras de GFAP, após a lesão dos tecidos retinianos, induz o aumento de expressão desta proteína (Wu et al., 2003) que, no presente estudo, foi detetado por meio de técnicas imunohistoquímicas.

A visualização da ligação anticorpo-antígeno é possível pela adição de um fluorocromo conjugado ao anticorpo. O fluorocromo emite fluorescência em espectros de absorção de luz específicos. A fluorescência desta substância pode ser observada por meio de microscopia confocal de varrimento laser, permitindo identificar a proteína de interesse a nível subcelular. Neste estudo em particular, utilizou-se a estreptavidina conjugada com Alexa Fluor®-488 (excitação: 488 nm, emissão: 519-520 nm) para marcar o anticorpo anti-GFAP. A marcação dos núcleos foi realizada com a coloração To-Pro®-3 iodide (excitação: 633 nm, emissão: 661 nm).

A expressão de GFAP foi avaliada no modelo de retinopatia induzida pela injeção de iodato de sódio, ao longo das diferentes fases pré-definidas (Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>).

### **Retina-controlo**

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-GFAP revelou a presença deste filamento intermédio do tipo III nas células de Müller. A discreta expressão de GFAP observou-se em todo o citoplasma destas células, desde a membrana limitante interna até membrana limitante externa, embora com maior intensidade de sinal nas camadas mais internas da retina. A este nível, observaram-se os pés vasculares destas células a envolver os vasos sanguíneos. Na retina-controlo e, portanto, em condições fisiológicas, o padrão de emissão de fluorescência, que corresponde à expressão deste filamento intermédio, caracterizou-se por um nível basal de intensidade (Figura 13A).

Comparativamente ao corte histológico pode dizer-se que existe uma coerência com o aspeto normal da retina, visto que os estratos celulares se encontraram igualmente organizados e não se verificaram alterações estruturais significativas.

### **T 24**

Em concordância com os resultados obtidos na análise histológica, após 24 horas da injeção de iodato de sódio, as retinas apresentaram um aumento da expressão de GFAP nos prolongamentos citoplasmáticos e a nível dos corpos celulares das células de Müller, evidenciado pela intensificação de sinal fluorescente. Este comportamento das células de Müller, com aumento da produção de GFAP, indicou que as lesões degenerativas características dos processos de retinopatia se instauraram, estabelecendo o início do processo de gliose reativa. A marcação dos núcleos evidenciou a desorganização da camada nuclear externa, à semelhança do observado nos cortes histológicos da mesma fase (Figura 13B).

### **T 48**

Nas retinas dos murganhos eutanasiados 48 horas após a administração de iodato de sódio, a sobre-expressão de GFAP foi mais marcada, associada a uma clara hipertrofia das células de Müller. A expressão de GFAP estendeu-se até à camada dos fotorreceptores, invadindo as camadas mais externas da retina. A sobre-expressão de GFAP pelas células de Müller ocorre quando estas são ativadas pela resposta inflamatória, igualmente responsável pela projeção dos processos citoplasmáticos das células por toda a neuroretina. Além da sobre-expressão de GFAP, também os núcleos das camadas nucleares externa e interna evidenciaram uma desorganização mais extensa (Figura 13C).

### **T 72**

Na fase  $T_{72}$ , a expressão de GFAP diminuiu em relação à fase anterior ( $T_{48}$ ). Os prolongamentos das células de Müller surgiram dispostos de forma menos invasiva, concentrando-se sobretudo nos estratos internos da retina. Contudo, os núcleos da camada nuclear externa evidenciaram uma marcada desorganização, à semelhança do observado nos cortes histológicos da fase correspondente (Figura 13D).

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-GFAP revelou uma expressão crescente desta proteína nas células de Müller até à fase  $T_{48}$ , na qual se verificou o pico da fluorescência. Este aumento da expressão de GFAP ocorreu paralelamente à evolução do processo de retinopatia, com as alterações estruturais próprias observadas em cada uma das fases definidas. Em  $T_{72}$ , enquanto que a coloração de hematoxilina-eosina mostrava alterações mais avançadas do que em  $T_{48}$ , a fluorescência das células de Müller diminuiu em relação a  $T_{48}$ .

---

**Figura 13 – Modelo de retinopatia em murganho, induzida pela administração de iodato de sódio (NaIO<sub>3</sub>).** **A (retina-controlo):** expressão basal de GFAP, com maior intensidade de sinal nas camadas internas da retina (seta) e aspeto normal dos núcleos dos fotorreceptores. **B (T<sub>24</sub>):** início do processo degenerativo dos fotorreceptores. Discreto aumento da expressão de GFAP (seta) e início da desorganização da camada nuclear externa. **C (T<sub>48</sub>):** pico de sobre-expressão de GFAP, evidenciado pela máxima intensidade de fluorescência, inclusive nos estratos mais externos (seta), devido à possível hipertrofia das células de Müller. **D (T<sub>72</sub>):** diminuição da expressão de GFAP em relação à fase anterior (seta) associada a uma marcada degenerescência dos fotorreceptores e à desorganização das camadas nuclear externa e interna. Con, controlo; CG, camada de células ganglionares; CNI, camada nuclear interna; CNE, camada nuclear externa; CB, camada de fotorreceptores (cones e bastonetes). Núcleos marcados com *To-Pro®-3 iodide* (azul) e GFAP marcado com *Alexa Fluor® 488* (vermelho). Barra: 30 µm (original).

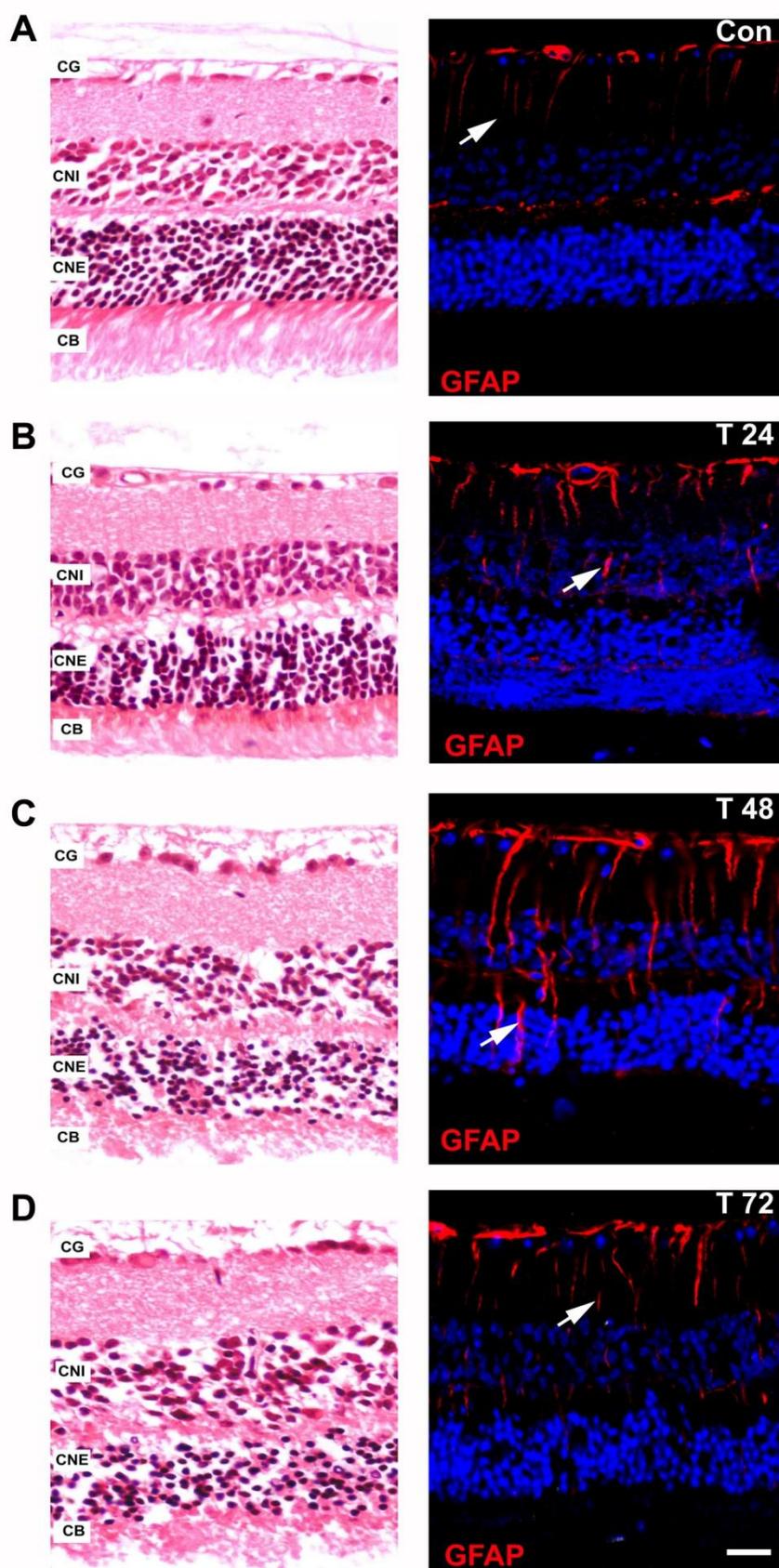


Figura 13 – Modelo de retinopatia em murgancho, induzida pela administração de iodato de sódio ( $\text{NaIO}_3$ ).

### **3. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA**

A retina de murganho é um tecido com características próprias, pelo que se devem ajustar os protocolos às especificidades desta estrutura. Relativamente à técnica de *Western Blotting*, foi necessário proceder à determinação da concentração proteica, de forma a otimizar o volume de amostra, para assegurar a correta execução desta técnica. O volume da amostra deve respeitar o valor mínimo de concentração de proteínas totais recomendado pelo fabricante (Abcam: 0,1 mg/ml), de modo a utilizar a quantidade de proteína suficiente que permita a sua deteção.

Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados. No entanto, as metodologias mais utilizadas para este efeito são as espectrofotométricas que detetam mudanças de cor proporcionais à quantidade de proteína total contida na amostra (Zaia et al., 1998).

No presente estudo recorreu-se a dois métodos de quantificação proteica para uma maior precisão: o método BCA ou de Smith e o método de Bradford.

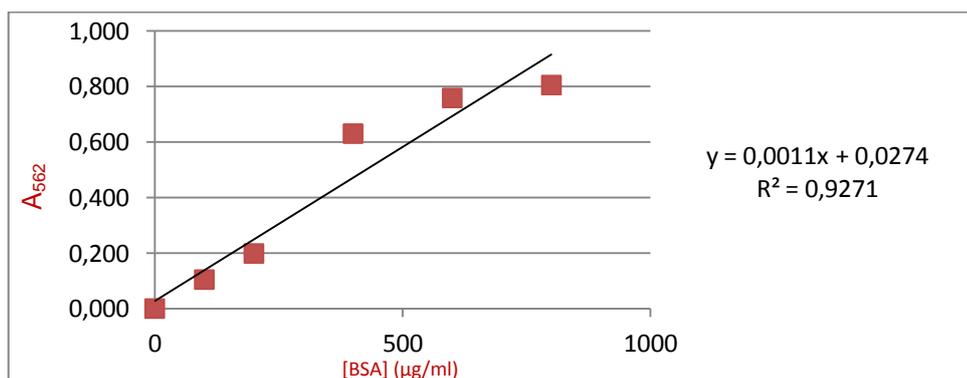
#### **3.1. Método BCA**

O método proposto por Smith et al. (1985) tem por base a reação de redução do cobre, pela ligação de  $\text{Cu}^{2+}$  a proteínas, em meio alcalino. O ácido bicinconínico (BCA) é um composto estável, hidrossolúvel, capaz de formar complexos com o ião  $\text{Cu}^+$ , que apresentam cor roxa, detetável por espectrofotometria, na região dos 560 nm de absorvância. A cor produzida pela reação aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de proteína presente (Smith et al., 1985).

Para uma melhor exatidão na medição da absorvância por espectrofotometria, realizaram-se três leituras das diluições da solução de BSA e de cada solução de amostra de retina.

Concentração BSA		A <sub>562</sub>	Média A <sub>562</sub>
100 µg/ml	Leitura 1	0,108	0,105
	Leitura 2	0,101	
	Leitura 3	0,081	
200 µg/ml	Leitura 1	0,198	0,199
	Leitura 2	0,199	
	Leitura 3	0,170	
400 µg/ml	Leitura 1	0,627	0,630
	Leitura 2	0,633	
	Leitura 3	0,577	
600 µg/ml	Leitura 1	0,763	0,759
	Leitura 2	0,754	
	Leitura 3	0,677	
800 µg/ml	Leitura 1	0,784	0,805
	Leitura 2	0,694	
	Leitura 3	0,826	
Branco	Leitura 1	0,231	0,231

**Tabela 6 - Método BCA: absorvâncias das soluções de BSA.** Os valores obtidos são utilizados para a elaboração da curva-padrão. Os valores de concentração de 100 µg/ml a 800 µg/ml correspondem a 10 µg a 80 µg de proteína total, respectivamente. A<sub>562</sub>, valor da absorvância determinada a 562 nm; BSA, albumina sérica bovina.



**Figura 14 - Método BCA: curva-padrão (BSA).** A equação de ajustamento à curva-padrão foi utilizada para determinar a concentração proteica em solução. A equação de ajustamento encontrada foi linear ( $y = 0,0011x + 0,0274$ ) e de alta precisão, como indicado pelo coeficiente de determinação de 0,92 ( $R^2$ ). A<sub>562</sub>: valor da absorvância determinada a 562 nm; [BSA], concentração da proteína albumina sérica bovina (original).

Foram determinadas as absorvâncias das soluções de BSA com concentração conhecida por espectrofotometria (Tabela 6). Calculou-se a relação linear entre as absorvâncias e a concentração proteica das mesmas, através da equação de ajustamento determinada para a curva-padrão de BSA:  $y = 0,0011x + 0,0274$  (Figura 14).

A equação de ajustamento determinada permitiu extrapolar a quantidade de proteína total presente nas várias diluições das amostras de retina a analisar. Para o efeito, foram medidas as absorvâncias das amostras de retina e calculada a quantidade de proteína total aplicando a equação de ajustamento da curva-padrão (Tabela 7). Obteve-se uma concentração de proteína total de 648,24 µg/ml, para uma amostra de duas retinas de murganho, diluída em 300µl de solução-tampão RIPA, a partir da média aritmética dos valores de cada diluição.

Tendo em conta a discrepância nas várias diluições da mesma amostra, foi utilizada outra técnica de quantificação proteica, o método de Bradford para confirmar os resultados.

		A <sub>562</sub>	Média A <sub>562</sub>	Concentração proteica(µg/ml)
Amostra total	Leitura 1	0,708	0,708	<b>618,73</b>
	Leitura 2	0,708		
Diluição 1:5	Leitura 1	0,213	0,211	<b>825,68</b>
	Leitura 2	0,214		
	Leitura 3	0,205		
Diluição 1:10	Leitura 1	0,077	0,081	<b>490,30</b>
	Leitura 2	0,082		
	Leitura 3	0,085		

**Tabela 7- Método BCA: absorvâncias e concentração proteica determinada para a amostra de retina de murganho.** A<sub>562</sub>, valor da absorvância determinada a 562 nm.

### **3.2. Método de Bradford**

O método de Bradford constitui outra técnica de análise espectrofotométrica utilizada para determinar a concentração proteica de soluções. O reagente de Bradford (Azul Brilhante G dissolvido em ácido fosfórico e metanol) interage com os aminoácidos da amostra, formando complexos de cor azul. A cor azul é tanto mais intensa quanto maior a concentração proteica da amostra e pode ser quantificada pela medição da absorvância a 595 nm (Zaia et al., 1998).

As absorvâncias medidas para as soluções de BSA foram as indicadas na Tabela 8.

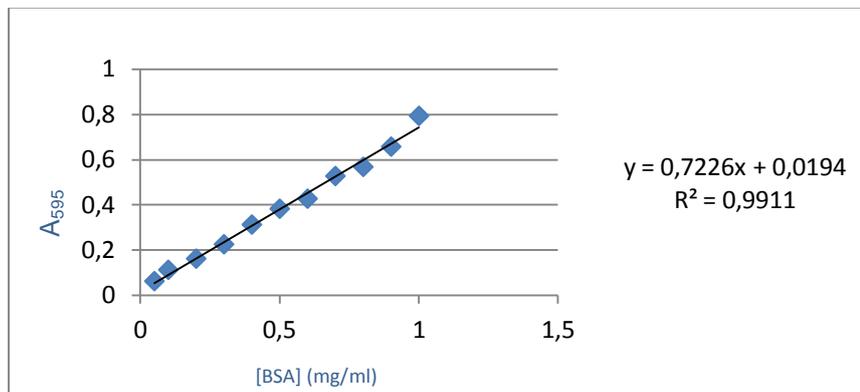
A curva-padrão foi obtida a partir dos valores de absorvância das soluções de BSA de concentrações conhecidas e pelos valores de proteína total presentes nas respectivas soluções (Figura 15). A equação de ajustamento da curva-padrão obtida ( $y = 0,7226x + 0,0194$ ) permitiu extrapolar a quantidade de proteína total presente nas várias diluições das amostras de retina a analisar.

Aplicando a equação de ajuste da curva-padrão, obteve-se uma concentração proteica de 580 µg/ml numa amostra com duas retinas de murganho diluídas em 300 µl de solução-tampão RIPA (Tabela 9). Este resultado é consistente com o valor obtido pelo método de BCA.

Considerando os resultados finais determinados por ambos métodos de quantificação, determinou-se um valor médio aproximado de 614,12 µg/ml de concentração proteica total em duas retinas de murganho.

	Concentração BSA	A <sub>595</sub>
Diluições da solução BSA	0,05 µg/ml	0.062
	0,1 mg/ml	0.112
	0,2 mg/ml	0.161
	0,3 mg/ml	0.225
	0,4 mg/ml	0.312
	0,5 mg/ml	0.382
	0,6 mg/ml	0.426
	0,7 mg/ml	0.526
	0,8 mg/ml	0.567
	0,9 mg/ml	0.656
	1 mg/ml	0.792

**Tabela 8 - Método de Bradford: absorvâncias das soluções de BSA.** Os valores obtidos são utilizados para a elaboração da curva-padrão. A<sub>595</sub>, valor da absorvância determinada a 595 nm; BSA, albumina sérica bovina.



**Figura 15 - Método de Bradford: curva-padrão (BSA).** A equação de ajustamento encontrada foi linear ( $y = 0,7226x + 0,0194$ ) e de alta precisão, como indicado pelo coeficiente de determinação de 0,99 ( $R^2$ ). A<sub>595</sub>: valor da absorvância determinada a 595 nm; [BSA], concentração da proteína albumina sérica bovina (original).

		A <sub>595</sub>	Concentração proteica (µg/ml)
Diluições da amostra de retina	1:2	0,229	580

**Tabela 9 - Método de Bradford: absorvâncias e concentração proteica determinadas para a amostra de retina de murganho.** A<sub>595</sub>: absorvâncias determinada a 595 nm.

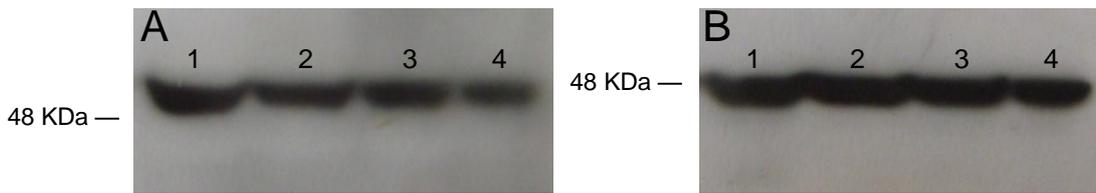
#### 4. *Western Blotting*

A técnica *Western blotting* ou *Immunoblotting* permite analisar o perfil proteico de uma amostra biológica, determinar os pesos moleculares das proteínas constituintes e quantificá-las. Utiliza a electroforese para separar macromoléculas num gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) com uma malha selecionada, de forma a reter as proteínas pretendidas. Uma vez obtido o padrão de migração das proteínas no gel, é necessário transferir esse padrão de bandas de proteínas para uma superfície mais estável e resistente, como a membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*), que facilita a ligação de anticorpos específicos aos epitopos antigénicos selecionados (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter, 2002). A reação anticorpo-antigénio é detetada por meio de substâncias fluorescentes conjugadas ao anticorpo. Para tal, recorreu-se à enzima peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) catalisadora da reação quimioluminescente com o reagente ECL (*Luminata Classico Western HRP substrate, Millipore*) (Durrant, 1994).

A marcação imunohistoquímica permitiu avaliar as diferenças de expressão da proteína GFAP, em resposta ao processo de gliose reativa, para cada uma das fases de estudo. De modo a estabelecer os padrões de expressão de GFAP nas retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>, aquela foi quantificada por meio de *Western Blotting*. A correspondência entre a imunomarcação e a quantidade de proteína produzida em cada fase foi igualmente determinada.

Neste sentido, sabendo-se que a proteína GFAP apresenta um peso molecular aproximado de 50 kDa, fabricou-se um gel de poliacrilamida de 12% (gel de resolução). A alta concentração de acrilamida molda uma malha estreita, indicada para separação de proteínas com o peso molecular entre 30 e 60 kDa (Hunte, Jagow & Schagger, 2003).

Atendendo a que a concentração proteica total estimada, para duas retinas de murganho, tinha um valor aproximado de 614,12 µg/ml, procedeu-se à determinação do valor basal para a marcação com o anticorpo anti-GFAP. Este valor foi calculado a partir de diluições seriadas de amostra (Figura 16). Dado que a partir da segunda diluição a quantidade de GFAP era constante, adotaram-se 20 µg como valor basal de proteína total a utilizar. Estes resultados foram normalizados a partir da concentração da proteína de referência, β-actina.



**Figura 16 – Otimização da concentração proteica para amostras de retina de murgancho em *Western Blotting*.** **A:** diluições seriadas de amostra marcadas com anti-GFAP. O tamanho da banda 1 é maior que o das restantes bandas; as bandas 2, 3 e 4 apresentam um tamanho constante. **B:** diluições seriadas da amostra marcadas com anti- $\beta$ -actina. Todas as bandas apresentam tamanho semelhante. 1, 40  $\mu$ g de proteína total; 2, 20  $\mu$ g de proteína total; 3, 10  $\mu$ g de proteína total; 4, 5  $\mu$ g de proteína total (original).

A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como *housekeeping protein*, pois constitui um dos 6 isómeros da actina que se encontra de forma estável no citoesqueleto das células, participando na estrutura, mobilidade e coesão celular. A sua expressão na célula é constante e relativamente elevada, sendo considerada uma proteína de referência (Suzuki et al., 2000). Para assegurar que nas diferentes amostras a estudar existia a mesma quantidade de proteína total, realizaram-se *loading controls*. Para o efeito, carregaram-se em paralelo amostras para quantificação da proteína a investigar (GFAP) e para a *housekeeping protein*. Neste estudo, os *loading controls* foram realizados com a  $\beta$ -actina, servindo a sua marca de deteção como referência para as diferenças de expressão da proteína a estudar.

### Retina-controlo

As retinas dos animais-controlo apresentaram um discreto sinal quimioluminescente após a marcação com anti-GFAP. Este resultado está em conformidade com o nível de expressão da proteína GFAP em situação fisiológica (Figura 17).

### T 24

No estadio T<sub>24</sub> verificou-se um aumento da expressão de GFAP face ao observado na retina-controlo (Figura 17). A quantificação por densitometria óptica revelou que a intensidade do sinal foi cerca de 1,8 vezes superior (Figura 18). Este aumento de expressão de GFAP está de acordo com os resultados obtidos por imunohistoquímica.

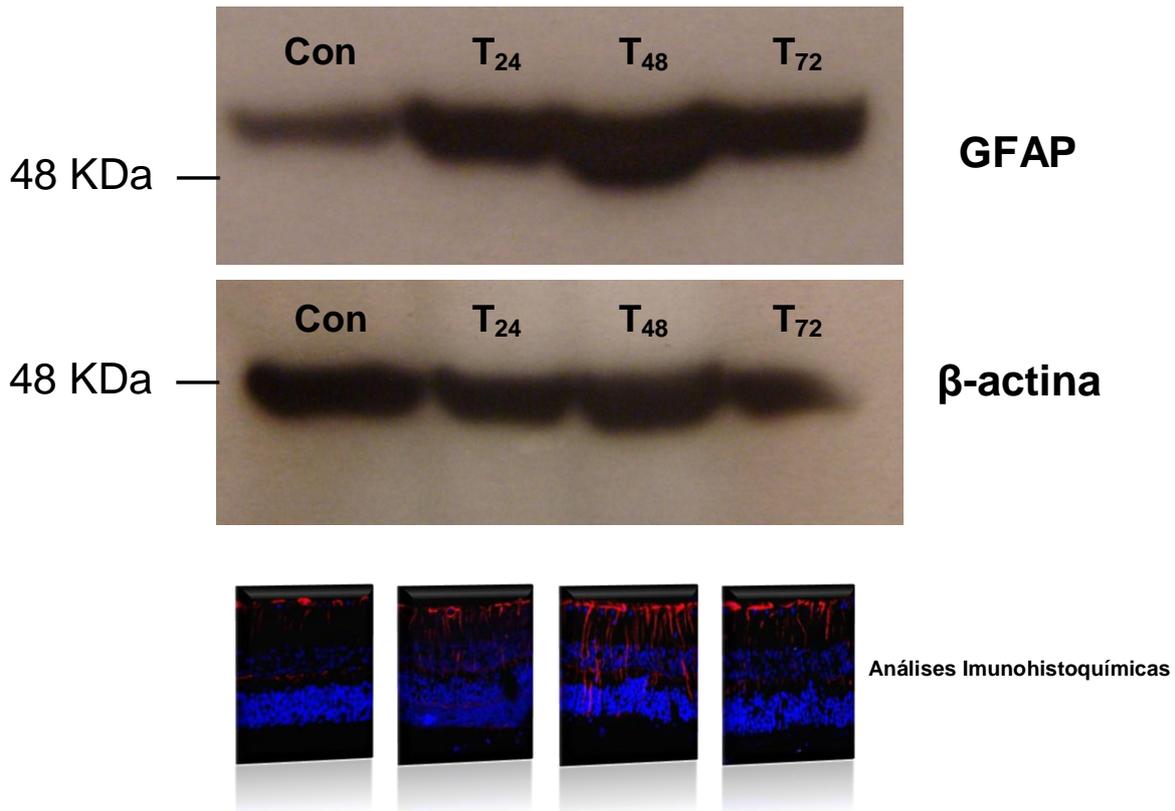
### **T 48**

Nas retinas T<sub>48</sub> observou-se uma sobre-expressão pronunciada de GFAP (Figura 17). A avaliação da densidade óptica do sinal detetado determinou um aumento 4,3 vezes superior à expressão da retina-controlo (Figura 18). Esta sobre-expressão coincidiu com o pico de expressão da proteína na marcação imunohistoquímica.

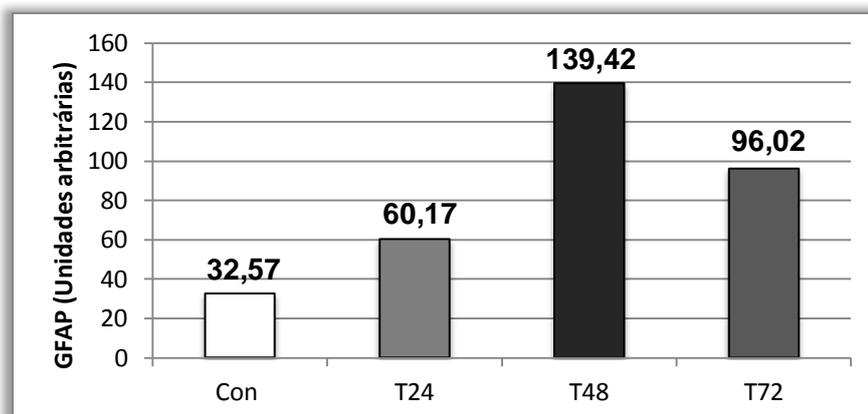
### **T 72**

Às 72 horas, observou-se uma diminuição da expressão de GFAP relativamente à fase anterior (T<sub>48</sub>), manifestada por uma diminuição da fluorescência emitida (Figura 17). Contudo, relativamente à expressão de GFAP na retina-controlo, o sinal detetado foi 3 vezes superior (Figura 18). De igual modo, o nível de expressão de GFAP foi idêntico ao determinado em imunohistoquímica, embora a apreciação por esta última técnica fosse apenas subjetiva.

Os resultados obtidos confirmaram que há um padrão de expressão de GFAP característico de cada uma das fases do modelo de retinopatia em estudo. No início da resposta inflamatória, T<sub>24</sub>, a quantidade de GFAP duplica. Ocorre um pico de expressão na fase T<sub>48</sub>, com um aumento da quantidade de GFAP quatro vezes superior ao nível basal determinado. Nas retinas T<sub>72</sub> continua a observar-se uma sobre-expressão de GFAP, que contudo equivale a um valor três vezes superior à das retinas controlo.



**Figura 17 - Expressão da proteína GFAP no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio em *Western Blotting*.** Amostras normalizadas com a proteína de referência β-actina e correspondência com os resultados obtidos por análise imunohistoquímica. **Con**, controle; **T<sub>24</sub>**, tempo de 24 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; **T<sub>48</sub>**, tempo de 48 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; **T<sub>72</sub>**, tempo de 72 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub> (original).



**Figura 18 - Expressão da proteína GFAP no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, quantificada por densitometria óptica, em *Western Blotting*.** Con, controle; T<sub>24</sub>, tempo de estudo 24 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>48</sub>, tempo de estudo 48 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>72</sub>, tempo de estudo 72 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub> (original).

## 5. q-RT-PCR

O método q-RT-PCR permite a detecção fiável e análise da expressão de genes, por retrotranscrição e amplificação de sequências de ácidos nucleicos, em amostras biológicas. A combinação q-RT-PCR possibilita a detecção e ao mesmo tempo quantificação de um ou mais genes de interesse (Nascimento et al., 2010).

Atendendo às diferenças observadas de expressão da proteína GFAP, no decurso do processo de retinopatia em estudo, analisou-se o perfil de expressão do gene *GFAP* nas retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>.

Para garantir a fiabilidade dos resultados, os níveis de expressão obtidos para o gene *GFAP* foram normalizados com a expressão do gene *β-actina*, gene constitutivo, uma vez que, como referido, o nível de expressão deste na célula é constante (Suzuki et al., 2000).

De modo a utilizar a mesma quantidade de ácido nucleico nas diferentes amostras a analisar por q-RT-PCR, determinou-se a concentração de ARNm de cada amostra. O quociente entre a absorvância medida a 260 nm e 280 nm revela o grau de pureza das amostras (Farrell, 2010). Os valores obtidos, próximos de 2, indicam uma purificação de ARNm adequada, significando que não se verificou contaminação das amostras.

Na reação de q-RT-PCR, à medida que a temperatura aumenta, ocorre a separação das cadeias duplas de ADNc. A temperatura à qual metade do ADNc está sob a forma desnaturada é designada por temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) ou de dissociação. O fluorocromo SYBR Green I emite fluorescência quando ligado a material genético. A desnaturação do ADNc produz a libertação do SYBR Green I com a conseqüente diminuição da intensidade de fluorescência. A variação de intensidade de fluorescência medida ao longo da reação traça uma curva de fluorescência (curva de *melting*) (Storch, 2007).

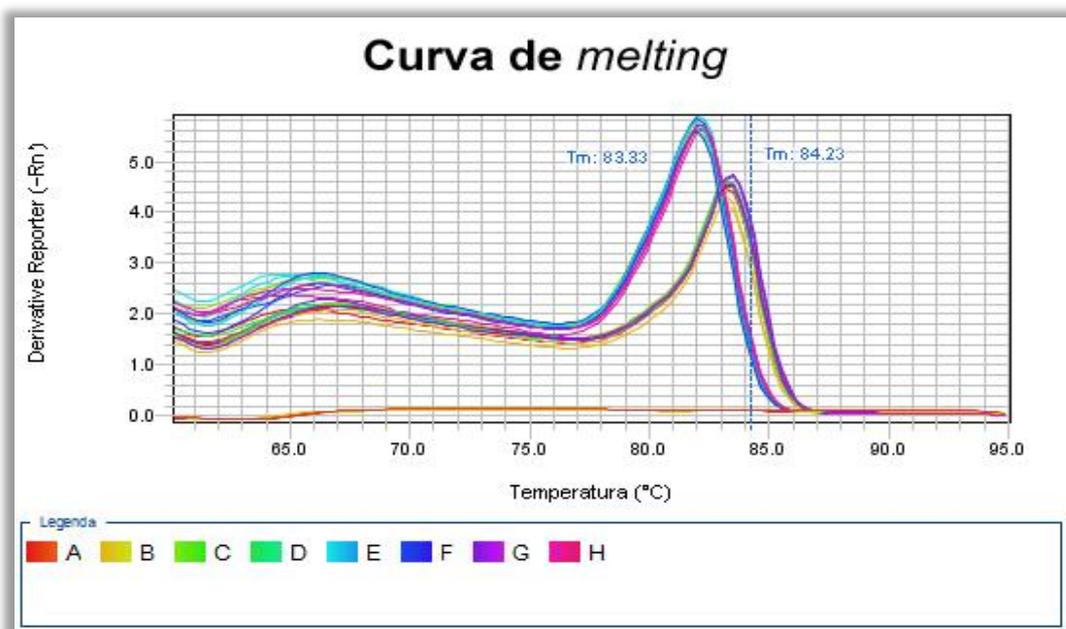
As curvas de *melting* ou de dissociação obtêm-se logo após o término da reação de q-RT-PCR. A análise das curvas de *melting* permitiu avaliar que a amplificação do ADNc das proteínas em estudo foi específica para cada sequência-alvo. Evidenciou-se um padrão consistente e coerente, com ausência da formação de dímeros inespecíficos. As amostras amplificadas com os *primers* desenhados para o gene *GFAP* revelaram apenas um pico de elevação de fluorescência e T<sub>m</sub> de 83,33°C. Para o gene *β-actina* o valor de T<sub>m</sub> foi de 84,23°C (Figura 19).

As curvas de amplificação indicam a intensidade de fluorescência emitida em cada ciclo de amplificação do ADNc. Para esta reação de q-RT-PCR considerámos 40 ciclos. Em cada ciclo o ADNc é amplificado e produz novas cópias, duplicando a quantidade do mesmo e, proporcionalmente, determinando o aumento da fluorescência do SYBR Green I. Se no início existe uma sequência de ADN, após o primeiro ciclo a quantidade duplica, no segundo o ADNc quadruplica, e assim sucessivamente, numa multiplicação exponencial. Após  $n$  ciclos são produzidas  $2^n$  sequências. Contudo, esta multiplicação não é sempre constante. As amplificações variam com a temperatura e a multiplicação exponencial ocorre apenas a partir de uma temperatura específica. Na q-RT-PCR a quantificação de ADNc é realizada na fase exponencial de amplificação. O início da multiplicação exponencial define um limiar de deteção denominado *threshold*. O ponto em que a intensidade de fluorescência passa o *threshold* é denominado por *cycle threshold* (Ct). Um menor valor de Ct corresponde a uma maior expressão do gene (Nascimento et al., 2010). A quantificação relativa do ADNc é corrigida pelos valores de Ct do gene de constitutivo e das amostras de controlo (Kubista et al., 2006).

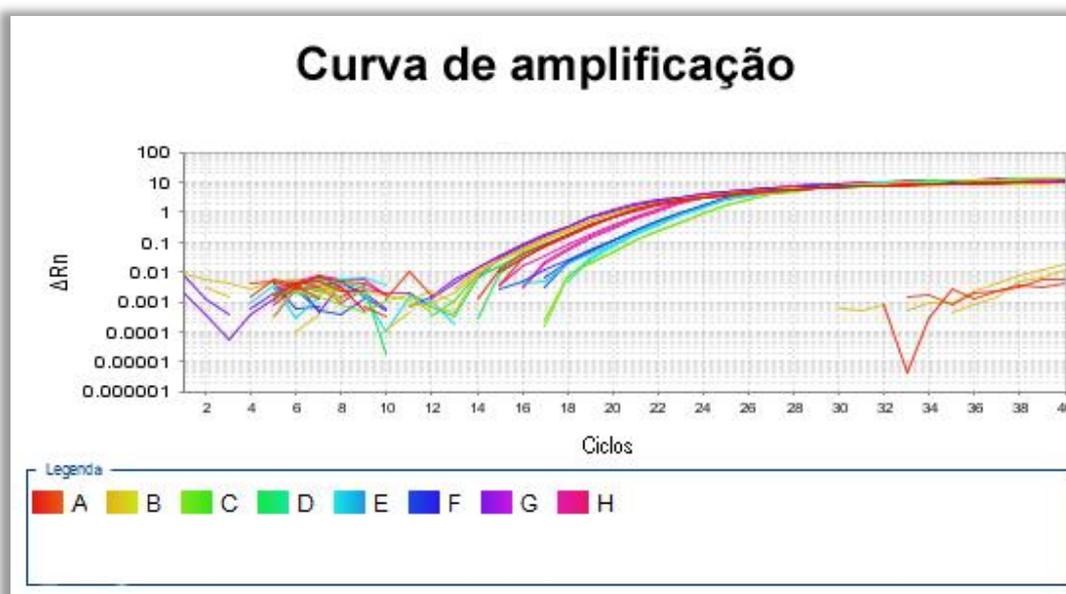
As curvas de amplificação de ADNc para o gene *GFAP* revelaram, em cada fase da retinopatia, diferentes valores médios de Ct: a retina-controlo apresentou o valor mais elevado (22.58); as retinas  $T_{24}, T_{48}$  e  $T_{72}$  apresentaram valores decrescentes (22.18, 20.45 e 20.15, respetivamente). Os valores de Ct para a amplificação do gene de referência ( *$\beta$ -actina*) foram semelhantes em todas as fases, como esperado, dado que a expressão deste gene é bastante estável e regular (Figura 20). A normalização dos resultados obteve-se pela variação ( $\Delta$ Ct) entre os valores médios de Cts de *GFAP* e de  *$\beta$ -actina*, nos quatro tempos de estudo avaliados (controlo,  $T_{24}, T_{48}$  e  $T_{72}$ ).

As variações do nível de expressão génica de *GFAP* nas retinas  $T_{24}, T_{48}$  e  $T_{72}$  foram avaliadas através do valor de *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), correspondente à variação do nível de transcrição (Livak & Schmittgen, 2001). O nível de expressão do gene *GFAP* aumentou em todas as fases do processo de retinopatia; em relação à expressão na retina-controlo houve um aumento de 1.45, 4.5 e 3 vezes nas fases  $T_{24}, T_{48}$  e  $T_{72}$ , respetivamente (Figura 21).

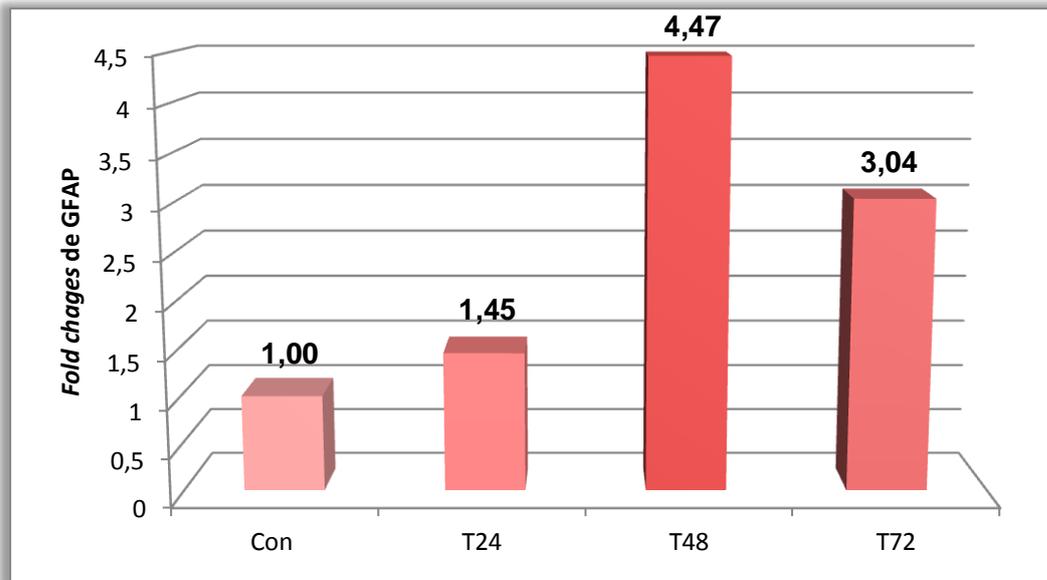
Em resumo, a quantificação da expressão génica de *GFAP* confirmou que, efetivamente, se verificou um aumento considerável na expressão do gene durante a resposta degenerativa-inflamatória. Este aumento está de acordo com as alterações na expressão da proteína *GFAP* observadas nas diferentes fases de retinopatia evidenciadas pelas técnicas de imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR utilizadas.



**Figura 19 -** Curvas de “*melting*” obtidas por q-RT-PCR, para os genes GFAP e  $\beta$ -actina, no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, em murganho. A, B, C, D: curvas de *melting* para o gene  $\beta$ -actina nas fases Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. E, F, G, H: curvas de *melting* para o gene GFAP nas fases Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. -Rn', magnitude de fluorescência detetada; Tm, temperatura de *melting* (original).



**Figura 20 -** Curvas de amplificação obtidas por q-RT-PCR, para os genes GFAP e  $\beta$ -actina, no modelo de retinopatia induzida por iodato de sódio, em murganho. As curvas obtidas relacionam os ciclos de amplificação com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do cDNA nas amostras. A, B, C, D: curvas de amplificação para o gene  $\beta$ -actina nas fases de controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente. E, F, G, H: curvas de amplificação para o gene GFAP nas fases de controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> respetivamente.  $\Delta Rn$ : intensidade de sinal de fluorescência emitida (original).



**Figura 21 – Análise q-RT-PCR da expressão génica de GFAP no modelo de retinopatia induzida pela injeção de iodato de sódio, em murganço.** Variação dos níveis de expressão génica da proteína GFAP. *Fold changes*, níveis de transcrição, Con, controlo; T<sub>24</sub>, tempo de estudo 24 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>48</sub>, tempo de estudo 48 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub>; T<sub>72</sub>, tempo de estudo 72 horas após a indução com NaIO<sub>3</sub> (original).

---

**DISCUSSÃO**

O presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações ocorridas na retina de murganhos, no decurso do processo de retinopatia induzida pela injeção de iodato de sódio, por meio de técnicas de histologia, imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR, de forma a estabelecer padrões de resposta nas diferentes fases do processo degenerativo-inflamatório.

Existe um certo número de retinopatias cuja lesão predominante é a destruição do epitélio pigmentar da retina com a concomitante degenerescência e disfunção dos fotorreceptores (Machalińska et al., 2010).

A degenerescência dos fotorreceptores, induzida pela administração de iodato de sódio constitui um modelo bem caracterizado de retinopatia que permite relacionar as lesões da retina com a diminuição da função visual (Franco et al., 2009). O efeito tóxico do iodato de sódio induz lesões estruturais da retina semelhantes às alterações que se desenvolvem num grande número de retinopatias no Homem. Contudo, as lesões dependem diretamente da dose de administração e do tempo de evolução do processo. A administração intraperitoneal de 100 mg/Kg de iodato de sódio induz a degenerescência dos fotorreceptores, com início da resolução da resposta inflamatória às 72 horas (Kiuchi et al., 2002).

As lesões dos tecidos são interpretadas pelo organismo como uma desestabilização da homeostasia do sistema que responde ativando mecanismos de defesa. Como sucede em qualquer processo inflamatório, os fenómenos desenvolvidos visam a eliminação do agente agressor. Na retina, a gliose reativa associada à degenerescência dos fotorreceptores, origina a hipertrofia das células de nevrógliã, amplificando a resposta inflamatória numa tentativa de neutralizar o estímulo nocivo. A ativação das células de Müller traduz-se num aumento da produção de filamentos intermédios tipo III, imunorreativos para o anticorpo anti-GFAP, marcador dos processos de gliose (Ho et al., 2009).

No decurso das retinopatias, as alterações estruturais repercutem-se na função visual (Simó et al., 2010). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a funcionalidade da retina é a eletrorretinografia. O ERG é constituído por três componentes, as ondas -a, -b e -c. A hiperpolarização dos fotorreceptores origina um sinal elétrico negativo, a onda-a. A alteração do potencial de membrana, gerado pelas flutuações da concentração de K<sup>+</sup> extracelular nas células de Müller, é responsável pela formação da onda seguinte, de polaridade positiva, a onda -b. Por último, a onda -c reflete a resposta das células do epitélio pigmentar da retina

(Kolb et al., 2000). Nos processos de retinopatia, o traçado do ERG modifica-se completamente, acabando por se verificar a extinção de todas as ondas. Contudo, a onda -b apresenta um perfil de alteração característico. No primeiro dia após a injeção de iodato de sódio, a amplitude da onda -b apresenta um pico, correspondente a um aumento de 30%. Às 48 horas ocorre uma diminuição da amplitude da onda -b para valores de aproximadamente 10% abaixo do valor fisiológico. Às 72 horas a onda -b acaba por se extinguir (Adachi-Usami, Mizoto, Ikeda, Hanawo & Kimura, 1992; Machalińska et al., 2010).

O envolvimento precoce das células de Müller, evidenciado pelo pico no traçado da onda -b (Adachi-Usami et al., 1992), é consistente com as alterações de expressão de GFAP nas retinas T<sub>24</sub>, em que a gliose reativa é um sinal do estabelecimento da resposta inflamatória.

Na fase T<sub>24</sub>, a alteração da estrutura da retina, afetando principalmente os estratos mais externos, foi acompanhada por uma sobre-expressão de GFAP nas células de Müller, sinal de gliose reativa. A quantificação de GFAP por *Western Blotting* confirmou este aumento, com uma quase duplicação (1,8 vezes) da expressão desta proteína. Paralelamente, a expressão génica foi 1,45 vezes mais elevada.

Na fase T<sub>48</sub>, assistiu-se a uma destruição mais extensa da camada dos fotorreceptores, resultado da degenerescência progressiva e apoptose destas células. Verificou-se um novo aumento do nível de expressão de GFAP, que quadruplicou, constituindo o pico da sobre-expressão desta proteína. Este aumento foi observado associado a uma hipertrofia e possível hipertrofia das células de Müller e a uma extensa invasão dos estratos retinianos mais externos pelos prolongamentos citoplasmáticos destas células. O comportamento das células de Müller foi consistente com os resultados de quantificação de expressão génica, onde se obtiveram os valores máximos (4,5 vezes).

Na fase T<sub>72</sub>, embora subsistisse uma marcada alteração da estrutura retiniana, dá-se início ao processo de regeneração celular (Kiuchi et al., 2002). Observou-se uma ligeira diminuição da expressão de GFAP, correspondente ao triplo do valor de referência, associada a uma evidente redução da extensão das células de Müller. Os resultados das técnicas q-RT-PCR refletiram este aspeto, com uma ligeira redução para valores de 3 vezes, em relação à retina-controlo.

No conjunto, este trabalho tornou possível evidenciar a correlação entre os resultados obtidos pelas técnicas de histologia, imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR, permitindo o estabelecimento de padrões de expressão de GFAP característicos de cada

uma das fases de evolução do processo inflamatório. A partir destes padrões é possível, com uma só técnica, identificar a fase do processo em curso.

Acresce a este aspeto o facto de as amostras de retina serem reduzidas. Cada retina tem um peso aproximado de 5 µg. Com frequência, a relativa escassez de amostra impossibilita a utilização das retinas de um mesmo animal para a execução de técnicas laboratoriais distintas. Por outro lado, a preparação das amostras é específica de cada técnica e algumas destas metodologias inviabilizam a realização de técnicas diferentes com a mesma amostra. Por conseguinte, a definição dos padrões de resposta nas fases T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>, pelas diferentes técnicas realizadas, obvia estas limitações, no sentido de permitir determinar a fase em curso do processo degenerativo-inflamatório.

O estabelecimento dos padrões de resposta nas retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> tem uma grande importância no nosso modelo murino de retinopatia, dado que ao analisar outras alterações podemos enquadrá-las na fase de evolução da retinopatia em que ocorrem.



### CONCLUSÕES

1. A injeção intraperitoneal de 100 mg/Kg de iodato de sódio em murganho induziu uma retinopatia com degenerescência dos fotorreceptores cuja resposta inflamatória se desenvolve em 72 horas.
2. Neste modelo murino de retinopatia, em função das alterações estruturais da retina, foram definidas três fases de evolução da resposta inflamatória: T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>.
3. Em resposta à lesão tecidual, as células de Müller sobre-exprimem GFAP, num processo de gliose reativa.
4. Em cada fase considerada notaram-se diferentes níveis de expressão de GFAP.
5. As variações de expressão de GFAP podem ser caracterizadas por meio de diferentes técnicas.
6. Os resultados obtidos pelas técnicas de imunohistoquímica, *Western Blotting* e q-RT-PCR permitiram estabelecer padrões de expressão de GFAP para as retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub>.
7. Notou-se uma correlação entre os padrões de expressão de GFAP caracterizados pelas diferentes técnicas.
8. A partir dos padrões de expressão de GFAP é possível, com uma só técnica, identificar a fase do processo em curso.
9. O estabelecimento dos padrões de expressão de GFAP nas retinas Controlo, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> e T<sub>72</sub> constitui uma ferramenta importante no nosso modelo, dado que permite analisar outras alterações, podendo enquadrá-las na fase de evolução da retinopatia em que ocorrem.



## BIBLIOGRAFIA

- Abcam, *Western Blotting – a beginner's guide*, Acedido em Jul. 20, 2012, em: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>.
- Adachi-Usami, E., Mizoto, A., Ikeda, H., Hanawo, T., Kimura, T. (1992) Transient increase of b-wave in the mouse retina after sodium iodate injection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 33 (11), 3109-3113.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4<sup>th</sup> ed.). New York: GSGarland Science, 152-193.
- Applied Biosystems (2000), *High capacity RNA-to-cDNA kit protocol*, Acedido em Ago. 8, 2012, em: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcbsupport/documents/generaldocuments/cms\\_041198.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcbsupport/documents/generaldocuments/cms_041198.pdf).
- Ashton, N., Garner, A. (1979). Pathogenesis of hypertensive retinopathy: a review, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 72 (5), 362–365.
- Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Dimova, N., Trucchi, B., Srinivasan, C., Elliott, G.I., Zhan, C., Lau, D.L., Zhu, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Cambi, F., Mohan R. (2010). Withaferin A targets intermediate filaments GFAP and vimentin in a model of retinal gliosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (10), 7657-7669.
- Besharse, J., Bok, D. (2011). *The retina and its disorders*. Oxford: Academic Press –Elsevier Lta.
- Carlson, B.M. (1999). *Human embryology and developmental biology*. (2<sup>nd</sup> ed.) Missouri: Mosby, Inc.
- Caspi, R.R. (2010). A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (9), 3073–3083.
- Chalupa, L.M., Williams, R. (2008). *Eye, retina, and visual system of the mouse*. London: MIT Press.

- Chorilli, M., Michelin, D.C., Salgado, H.R.N. (2007). Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, 28 (1), 11-23.
- Cook, C.S., Peiffer, R.L.J. (2001). Clinical basic science, In R.L.J. Peiffer & S.M.P. Jones. *Small animal ophthalmology: a problem-oriented approach* (3<sup>rd</sup> ed.). London: WB Saunders.
- Cook, H.L., Patel, P.J., Tufail, A. (2008). Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *British Medical Bulletin*, 85, 127–149.
- Cortez-Dias, N., Martins, S., Belo, A., Fiuza, M. (2009). Prevalência e padrões de tratamento da hipertensão arterial nos cuidados de saúde primários em Portugal – resultados do estudo de VALSIM. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 28 (5), 499-523.
- Cruvinel, W.M., Júnior, D.M., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S., Silva, N. P., Andrade, L.E.C. (2010). Sistema imunitário – parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(4), 434-61.
- Cunha-Vaz, J., Lobo, C. (2006). Principais recomendações na degenerescência macular relacionada com idade (DMRI). *Programa Nacional para a Saúde da Visão*, Acedido em Ago. 15, 2012, em: <http://www.dgsaude.min-saude.pt/visao/OTec-DMRI.pdf>.
- Duh, E.J. (2008). *Diabetic retinopathy*. Boston: Humana Press.
- Durrant, I. (1994). Enhanced chemiluminescent detection of horseradish peroxidase labeled probes, In A.J. Harwood, *Methods in molecular biology: protocols for gene analysis*. Volume 31, III, (pp. 147-161). New Jersey: Humana Press inc.
- 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 pigment epithelium degeneration. *Experimental Eye Research*, 82, 441–448.

- Farrar, J.G., Kenna, P.F., Humphries, P. (2002). On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO Journal*, 21 (5), 857-864.
- Farrell, R.E. (2010) *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*. (4<sup>th</sup> ed.). London: Academic Press.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocol*, Acedido Ago. 21, 2012, em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/5/pdb.prot4986.abstract>.
- Franco, L.M., Zulliger, R., Wolf-Schnurrbusch, U.E., Katagiri, Y., Kaplan, H.J., Wolf, S., Enzmann, V. (2009). Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50 (8) , 4004–4010.
- Gardner, T.W., Antonetti, D.A., Barber, A.J., LaNoue, K.F., Levison, S.W.. (2002). Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Survey of Ophthalmology*, 47 (2), 253-262.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1 (40), 1186-1750.
- Hedrich, H.J., Bullock, G.R. (2004). *The laboratory mouse: the handbook of experimental animals*. London: Elsevier Academic Press.
- Ho, G., Kumar, S., Min, X.S., Kng, Y.L., Loh , M.Y., Gao, S., Zhuo, L. (2009). Molecular imaging of retinal gliosis in transgenic mice induced by kainic acid neurotoxicity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50 (5), 2459-2464.
- Holländer, H., Makarov, F., Dreher, Z., Driel, D.V., Chan-Ling, T., 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 (4), 587–603.
- Huang, W., Glass , C.K. (2010). Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology*, 30, 1542-1549.

- Hunte, C., Jagow, G.V., Schagger, H. (2003). *Membrane protein purification and crystallization - a practical guide*. San Diego: Academic Press - Elsevier Science: 86-87.
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 18 (21), 8936-8946.
- Janssen, W.J., Henson, P.M. (2012). Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicologic Pathology*, 40 (2), 166-73.
- Jorge, M.L.M. (2009). *Células mato na retina: caracterização morfológica e funcional de uma nova população de células perivasculares autofluorescentes em situação fisiológica e de retinopatia*, Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2004) *Histologia Básica*, 10<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Katoch, R. (2011). *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology*. New York: Springer Science + Business Media.
- Kohli, P., Levy, B.D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 158 (4), 960–971.
- Kolb, H., Fernandez, E. Nelson, R., Jones, B. (2011). *Webvision: the organization of the retina and visual system*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center. Acedido em Ago. 15, 2012, em: <http://webvision.med.utah.edu/>.
- 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.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögren, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The realtime polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.

- Kwok, S., Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238.
- Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal Leukocyte Biology*, 81 (6), 1345-1351.
- Limb, G.A., Salt, T.E., Munro, P.M., Moss, S.E., Khaw, P.T. (2002). In vitro characterization of a spontaneously immortalized human müller cell line (MIO-M1). *Investigative Ophthalmology & Vision Science*, 43 (3), 864-869.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. (2006). *Immunology – the experimenter series*. Oxford: Elsevier Inc, 111-128.
- Lyubarsky, A. L., Falsini, B., Pennesi, M.E., Valentini, P., Pugh, E.N.Jr. (1999). UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. *Journal of Neuroscience*, 19 (1), 442-55.
- Machalińska, A., Lubiński, W., Klos, P., Kawa, M., Baumert, B., Penkala, K., Grzegorzóka, R., Karczewicz, D., Wiszniewska, B., Machaliński, B. (2010). Sodium iodate selectively injures the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. *NeuroReport*, 21 (11), 1819-1827.
- Medawar, P.B. (1986) *Memoirs of a thinking radish: an autobiography*. Oxford University Press, Oxford, 1986.
- Murta, J.C.N. (1990). *Caracterização do componente vascular da barreira hemato-retiniana: estudos de microperfusão de arteríolas retinianas em coelhos normais e diabéticos*. Tese de doutoramento em Medicina Cirúrgica Oftalmológica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra.
- Nabais, C., Perreira, J., Perreira, P., Capote, R., Morbeck, S., Raposo, J. (2011). Retinopatia diabética e condições associadas. *Acta Médica Portuguesa*, 24 (S2), 71-78.

- Natarajan, S. (2011). Retinitis pigmentosa: a brief overview. *Indian Journal of Ophthalmology*, 59 (5), 343–346.
- Nascimento, S., Suarez, E.R., Pinhal, M.A.S. (2010). Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina – Especial oncologia*, 67, 7-19.
- 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 and Visual Science*, 44, 4960–4967.
- Penn, J. S., Williams, T.P. (1986). Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Experimental Eye Research*, 43, 915–928.
- Ramon y Cajal, S. (1920) Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Robertson y Rio-Hortega. *Laboratorio de Investigación Biologica de Madrid*, 18, 109-127.
- Runkle, E.A., Antonetti, D.A. (2011). The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods of Molecular Biology*, 686, 133-148.
- Queiroz, M.J.T. (2005). Saúde em mapas e números-hipertensão, *Eurotrials-Boletim Informativo nº19*, Acedido a Set. 20, 2012, em: <http://www.eurotrials.com/>.
- 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.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A.J., Perretti, M., Rossi, A.G. Wallace, J.L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal*, 21 (2), 325-332.
- Sernagor, E., Eglén, S., Harris, B., Wong, R. (2006). *Retinal Development*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shakib, M., Cunha-Vaz, J.C. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier: IV junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Experimental Eye Research*, 5 (3), 229-234.

- Simó, R., Villarroel, M., Corraliza, L., Hernández, C., Garcia-Ramírez, M. (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood retinal barrier – implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 190724.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.
- Smith, R.S. (2002). *Systematic evaluation of the mouse eye – anatomy, pathology and biomethods*. New York: CRC Press LLC.
- Srienc, A.I., Kurth-Nelsons, Z.L., Newman, E.A. (2010). Imaging retinal blood flow with laser speckle flowmetry, *Frontiers. Neuroenergy*, 2, 128, Acedido em Set. 2, 2012, em: <http://www.frontiersin.org/>.
- Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.L., Hua, J., Löfqvist, C., Hellström, A., Smith, A. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative Ophthalmology Visual & Science*, 51(6), 2813-2826.
- Storch, G.A. (2007). Diagnostic virology. In D.M. Knipe & P.M. Howley (Eds.), *Fields virology – volume 1*. (5<sup>th</sup> ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 565-604.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29, 332-337.
- Trindade, A.J.N. (2008) *Análise da função de delta4 na regulação da angiogénese embrionária e neo-angiogénese tumoral*, Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Turbosquid (2012). *3D models*. Acedido em Set. 2, 2012, em: <http://www.turbosquid.com/>.

- Twyman, R. (2002). Model organisms: the mouse. *Wellcome Trust -The human genome*, Acedido em Ago. 20, 2012, em: [http://genome.wellcome.ac.uk/doc\\_WTD020804.html](http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020804.html).
- 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 ed.) Amsterdam: Elsevier Science.
- Vecino, E., Garcia, M. (2004). The müller glia: role in neuroprotection . In T. Herdegen & J. Delgado-Garcia (eds). *Brain Damage and Repair: From Molecular Research to Clinical Therapy*. USA: Kluwer Academic Publishers, 245-258.
- Walde, I., Schaffer, E.H., Kostlin, R.G. (1998). *Atlas de clínica oftalmológica do cão e do gato* (2ª ed.). São Paulo: Manole Ltda.
- Wässle, H., Puller, C., Müller, F., Haverkamp, S. (2009). Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 29 (1), 106-117.
- Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L. (2012), *The mouse nervous system*. London: Academic Press- Elsevier Lda.
- Wu, Q., Chen, C., Koutalos, Y. (2006) All-trans retinol in rod photoreceptor outer segments moves unrestrictedly by passive diffusion. *Biophysical Journal*, 91 (12), 4678-4689.
- Wu, K.H.C., Madigan, M.C., Billson, F.A., Penfold, P.L. (2003). Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *British Journal of Ophthalmology*, 87, 1159–1166.
- Yamashita, K., Fujinaga, T., Miyamoto, T., Hagio, M., Izumisawa, Y., Kotni, T. (1994). Canine acute phase response: relationship between serum cytoquine activity and acute phase protein in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56 (3), 487-492.
- Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21 (6), 787-793.

---

**ANEXOS****PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES****Acrilamida/bisacrilamida**

100ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 29 g Acrilamida + 1 g Bisacrilamida

**APS 10%**

100mL H<sub>2</sub>O MilliQ + 10 g APS

**Corante 3 DB**

9,4 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 2,8 ml de Tris 1M ph6,7 + 6,8% SDS + 6,6 ml Glicerol + 0,004% Bromofenol

**Corante Coomassie**

1000 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 0,25 g Azul de Coomassie + 400 ml Metanol + 70 ml Ácido acético

**Corante Ponceau**

200 mL H<sub>2</sub>O MilliQ + 1 g Ponceau + 200 µl Ácido acético 1%

**NBF 10% pH7**

900 ml H<sub>2</sub>O destilada + 100 ml formaldeído a 37% + 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**PBS 0,1M ph 7,4**

1000 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,5 g NaH<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub> + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+ HCl 37%

**PBI**

1 ml de Igepal + 1000 ml PBS

**PBST**

950 ml PBS 0,1M ph 7,4 + 500 µl Tween20

**Solução de Bloqueio com Leite 5%**

100 ml PBST + 5 g Leite em pó magro

**Solução para descorar géis corados com Coomassie**

880 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 50 ml Metanol + 70 ml Ácido acético

**SDS 10%**

100 mL H<sub>2</sub>O MilliQ + 10 g SDS

**Tampão de corrida *Western Blotting* ph 8,3**

990 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 3 g Tris + 14,4 g Glicina + 10 ml SDS 10% + HCl 37%

**Tampão de transferência *Western Blotting* ph 8,3**

800 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 3 g Tris + 14,4 g Glicina + 200 ml Metanol

**Tampão RIPA**

16,5 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + 200 µl Tris 1M ph8,2 + 3 ml de NaCl 1M + 100 µl NP-40 + 200 µl SDS a 10% + 100 mg deoxicolato

**Tris 0,5M ph 6,5**

100mL H<sub>2</sub>O MilliQ + 6,057 g Tris + HCl 37%

**Tris 1,5M ph 8,8**

100mL H<sub>2</sub>O MilliQ + 18,17 g Tris + HCl 37%

**WB**

1000 ml PBS + 1 ml de Igepal + 3 g Albumina de Soro de Bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América)