

Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho



CAMILA MARRA DE ALMEIDA

CITOCINAS E A SOBREVIDA DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA DE RATO IN VITRO E IN VIVO.

Rio de Janeiro 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

CAMILA MARRA DE ALMEIDA

CITOCINAS E A SOBREVIDA DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA DE RATO IN VITRO E IN VIVO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Alfred Sholl Franco



Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho 2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurogênese, Programa de Neurobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação do professor Alfred Sholl Franco, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Almeida, Camila Marra de

Citocinas e a sobrevida de células ganglionares da retina de rato *in vitro* e *in vivo*/ Camila Marra de Almeida – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2009. XVII,125f.: 31 il.; 29,7 cm.

Orientador: Alfred Sholl-Franco.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2009.

Referências bibliográficas: f. 111-125

1. Neuroimunologia 2.Citocinas 3. Interleucina-2 4. Interleucina-4 5. Retina 6. Células Ganglionares I. Sholl-Franco, Alfred. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica. IV. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Citocinas e a sobrevida de células ganglionares da retina de rato *in vitro* e *in vivo*"

CAMILA MARRA DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Rio de Janeiro, 23 de março de 2009.

DRA. PATRÍCIA FRANCA GARDINO

DRA. PAULA CAMPELLO COSTA

DRA. ROSALIA MENDES OTERO

DR. ALFRED SHOLL FRANCO (ORIENTADOR)

DRA. MARIA CHRISTINA FIALHO DE MELLO (REVISORA)

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, acima de tudo!!!!!! Por ter permitido que eu chegasse até aqui, mesmo com todas as dificuldades que surgiram desde o início da minha caminhada. "Quando tudo diz que não, TUA voz me encoraja a prosseguir..." PAI, muito obrigada por me encorajar sempre!!!!

Aos meus pais, Sandra e Antonio Carlos (Carlinhos, Almeida etc.) que sempre incentivaram e apoiaram meus estudos, em todos os momentos. Por acreditarem em mim !!! Mãe, nunca mais vou esquecer da história de José e de todas as outras que você me contou para me animar. Enfim, pai e mãe, obrigada pela força em todos os momentos!

Aos meus irmãos. Carol, pelos momentos compartilhados, pelas fugas para Cabo Frio (rs), por ficar acordada me ouvindo enquanto eu falava "pelos cotovelos", mesmo morrendo de sono. Caique, desculpe pela ausência nos feriados, fins de semana e férias.

Meu cunhado Jefferson (figura) por sempre me socorrer com a impressão dos pôsteres, problemas no computador e pelas divertidas viagens de última hora "à bordo" do falecido "Unão Preto", hehehe. Vc é maluco mas é legal!

Minha avó Maria José e minha tia Iza, por sempre torcerem por mim.

Thales, obrigada pelo computador!!!

EDUUUUUUUUUUU!!!!!!!! Por você ter aparecido na minha vida assim, tão de repente. ("OLHA SÓ!" "COMO ASSIM?" rsrs) Chegou no momento CERTO! Obrigada por suas palavras, sempre sábias, me ajudando sempre. Pela paciência, compreensão e por aturar minhas crises de estresse. Ah, e pelo lap top que passou

vi

as férias comigo. Enfim, por tudo!!! Você é MUUUUUUUUUUUITO especial pra mim!!!!!

Ao meu querido orientador Alfred Sholl. Pela paciência, pela amizade, pelo carinho, por ter confiado em mim, por ser um verdadeiro MESTRE!!!! Por ter me ensinado tudo que sei e me ajudado a caminhar sempre!!!! Simples adjetivos não são suficientes para caracterizá-lo. Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientanda. Você é mais que um orientador, é um verdadeiro AMIGO! OBRIGADA SEMPRE!!!!!!!

Ao professor Rafael Linden, por ter aberto as portas do laboratório de Neurogênese para mim.

A toda a equipe do laboratório de Neurogênese, em especial à Jú, Tamara, Isadora, Bob, Céu, Lucianne, Carol e Nilson.

Tamara, amigaaaaaaa!!!!!! Pelas conversas (tanto pelas inteligentes como pelas besteiras). Pelas poucas vezes em que conseguimos fugir para o shopping depois do trabalho, por me proteger dos malucos hehehehehe (não pude deixar de dizer isso) e por todas as outras coisas. Te adoro amigaaa!!!

Isadora e Céulem, pelas conversas na bancada, pelas gargalhadas censuradas (rs), pelos momentos divertidos nos congressos, pela ajuda nos experimentos.

À Hilda Petrs e Paula Campello por terem me ensinado a técnica das injeções intravítreas.

À Jainne, pelos vários artigos que me enviou sempre, me socorrendo e tirando do sufoco. rs Obrigada!!!

À Denise Gomes, pelos experimentos com o heparan sulfato.

vii

À Rose, que com muita simpatia e boa vontade sempre tirava minhas dúvidas a respeito das montagens planas.

À Camila Zaverucha, pelo ensino da técnica do esmagamento do nervo óptico.

A todos aqueles, que acreditaram que um dia eu estaria aqui, mesmo quando eu ainda estava na graduação. Em especial às minhas queridas amigas Rosângela e Elaine (saudades de vocês) pelo incentivo. À Luciene Dias por ter me "apresentado ao mundo da ciência" e ao Aydamari por estar sempre disposto a me ajudar em todos os momentos.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

"...porque de Deus vêm, o querer e o executar, segundo a Sua boa vontade." (Fp. 2:13)

RESUMO

A Interleucina-2 (IL-2) e a interleucina-4 (IL-4) são citocinas descritas inicialmente pelas suas funções no sistema imune, mas que apresentam ações pleiotróficas no sistema nervoso. Neste trabalho, descrevemos o papel neurotrófico destas moléculas em células ganglionares da retina (RGC) de ratos após 2 e 5 dias in vitro (DIV). A IL-4 (5 U/mL) bloqueou a morte das RGC axotomizadas (2 DIV, 90.03 ± 6.43 ; 5 DIV, 80.83 ± 8.32) e seu efeito foi totalmente dependente da ativação de tirosinas cinase e da janus cinase (JAK), liberação de fatores tróficos, presença do fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) endógeno e ativação de receptores Trk. As vias de sinalização mediadas por proteínas tirosina cinases reguladas por estímulos externos (ERK) 1/2, fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e proteína cinase dependente de cAMP (PKA) também estão parcialmente envolvidas neste efeito. Observamos ainda que a IL-4 aumentou a expressão de BDNF em células de Müller in vitro. A neuroproteção mediada pela IL-2 (50 U/mL; 2 DIV, 85,43 ± 5,43; 5 DIV, 50,23 ± 5,32) envolveu a ativação de tirosinas cinase, JAK e ERK1/2. O tratamento com a IL-2 aumentou a expressão de heparan sulfato em todas as camadas da retina, sendo o efeito neuroprotetor da IL-2 completamente dependente da presença inicial deste glicosaminoglicano. Utilizando o método de esmagamento do nervo óptico (ONC) demonstramos que a administração intravítrea de IL-2 (2.500 U/µL) também aumentou em 50% o número de células na camada de células ganglionares da retina após 5 dias de lesão. Desta forma, nossos resultados demonstram que, in vitro, a IL-4 aumenta a sobrevida de RGC de forma indireta, através da liberação de fatores tróficos, enguanto que a IL-2 provavelmente exerce sua ação de maneira direta. Além disso, mostramos, pela primeira vez, a ação in vivo da IL-2 na sobrevida de RGC no modelo de ONC.

ABSTRACT

Interleukin-2 (IL-2) and interleukin-4 (IL-4) have been initially described for their role in the immune system. However, these cytokines present pleiotropic actions on the nervous system. In this work, we described the neurotrophic actions of these molecules in rat retinal ganglion cells (RGC) after 2 and 5 days in vitro (DIV). IL-4 (5 U/mL) blocked the death of axotomized RGC (2 DIV, 90.03 ± 6.43; 5 DIV, 80.83 ± 8.32), and its effect was dependent on tyrosine kinase and janus kinase (JAK) activation, release of trophic factors, presence of endogenous brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and Trk receptor activation. The signaling pathways mediated by extracellular regulated kinases (ERK) 1/2, phosphoinositol 3 kinase (PI3K), and cAMP-dependent protein kinase (PKA) are also partly involved in this effect. We also observed that IL-4 increased the expression of BDNF in Müller cells in vitro. Neuroprotection mediated by IL-2 (50 U/mL; 2 DIV, 85.43 ± 5.43; 5 DIV, 50.23 ± 5.32) involves activation of tyrosine kinase, JAK and ERK1/2 activity. IL-2 treatment also increased the expression of heparan sulfate in all retinal layers, and IL-2-neuroprotective effect showed to be completely dependent on the early presence of this glycosaminoglycan. Using the optic nerve crushing method (ONC), we demonstrated that intravitreal administration of IL-2 (2,500 U/µL) also increases the number of cells in the ganglion cell layer (50%) after 5 days of injury. Thus, our results show that, in vitro, IL-4 increases the survival of RGC in an indirect way, through the release of trophic factors, whereas IL-2 probably exerts its action directly. Moreover, we show for the first time, the in vivo action of IL-2 on RGC survival in the ONC model.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	ativador de proteína-1									
cAMP	adenosina monofosfato cíclico (do inglês: <i>cyclic adenisone monophosphate</i>)									
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: <i>brain-derived</i> neurotrophic factor)									
BFA	brefeldina									
BSA	albumina de soro bovino (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)									
ChCl	cloreto de gueleritrina									
CNTF	fator neurotrófico ciliar (do inglês: <i>cilliarv neurotrophic factor</i>)									
CNS	sistema nervoso central (do inglês: central nervous system)									
CS	condroitin sulfato									
CSPG	proteoglicano contendo condroitin sulfato (do inglês: <i>chondroitin</i>									
	sulphate proteoplican)									
DAPI	4.6-Diamidino-2-phenylindole									
DIV	dia(s) in vitro									
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco									
DR	rodamina dextran (do inglês: <i>dextran rhodamin</i>)									
ECM	matriz extracelular (do inglês: extracellular matrix)									
ERK	proteína cinase regulada por sinal extracelular (do inglês: extracellular									
	regulated kinase).									
FCS	soro fetal bovino (do inglês: fetal calf serum)									
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico (do inglês: basic fibroblast									
	growth factor)									
GAP-43	proteina associada ao crescimento 43 (do inglês: growth associated protein-43)									
GCL	camada de células ganglionares (do inglês: ganglion cells laver)									
HS	heparan sulfato									
HSPG	proteoglicano contendo heparan sulfato (do inglês: <i>heparan sulphate proteoglican</i>)									
lg	imunoglobulina									
IĹ	interleucina (e.g. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 dentre outras)									
IL-2Rα	subunidade α do receptor de IL-2 (do inglês: <i>interleukin-2 receptor</i> α)									
IL-2Rβ	subunidade β do receptor de IL-2 (do inglês: <i>interleukin-2 receptor</i> β)									
IL-2Rγ	subunidade γ do receptor de IL-2 (do inglês: <i>interleukin-2 receptor</i> γ)									
IL-4Rα	subunidade α do receptor de IL-4 (do inglês: <i>interleukin-4 receptor</i> α)									
IL-13R α_1	subunidade α_1 do receptor de IL-13 (do inglês: <i>interleukin-13 receptor</i> α <i>1</i>)									
ILM	membrana limitante interna (do inglês: inner limiting membrane)									
INL	camada nuclear interna (do inglês: inner nuclear layer)									
iNOS	óxido nítrico sintase do tipo induzida (do inglês: <i>inducible nitric oxide syntase</i>)									
IPL	camada plexiforme interna (do inglês: inner plexiform layer)									
JAK	janus cinase (e.g. JAK1, JAK2, dentre outras)									
KS	keratan sulfato									
MAPK	cinase ativada por mitógeno (do inglês: <i>mitogen activated protein kinase</i>)									

MMPs	metaloproteases
NL	camada neuroblástica (do inglês: neuroblastic layer)
NGF	fator de crescimento de nervo (do inglês: nerve growth factor)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
NS	sistema nervoso (do inglês: nervous system)
NT	neurotrofina (e.g. NT-3, NT-4/5, NT-6 e NT-7)
OD	olho direito
OE	olho esquerdo
OL	camada de fibras do nervo óptico (do inglês: optic nerve layer)
ON	nervo óptico (do inglês: optic nerve)
OLM	membrana limitante externa (do inglês: outer limiting membrane)
ONL	camada nuclear externa (do inglês: outer nuclear layer)
ONC	esmagamento do ON (do inglês: optic nerve crushing)
OPL	camada plexiforme externa (do inglês: outer plexiform layer)
OS	segmentos externos de fotoreceptores (do inglês: outer segment)
P1	dia pós-natal 1
PBS	salina tamponada com fosfato (do inglês: phosphate buffered saline)
PCD	morte celular programada (do inglês: program cell death)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês: plateled derived
	growth factor)
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinase (do inglês: phosphoinositol 3 kinase)
PKA	proteína cinase dependente de cAMP (do inglês: <i>cAMP-dependent</i> protein kinase)
PKB	proteína cinase B (do inglês: <i>protein kinase B</i>), também conhecida como AKT.
PKC	proteína cinase dependente de cálcio (do inglês: calcium-dependent
	protein kinase)
p-L-l	poli-L-lisina
PNS	sistema nervoso periférico (do inglês: peripheral nervous system)
RGC	células ganglionares da retina (do inglês: retinal ganglion cells)
RPE	epitélio pigmentado da retina (do inglês: retinal pigment epithelium)
SEM	erro padrão da média (do inglês: standart error of mean)
STAT	proteína de transdução de sinal e ativador transcricional (<i>e.g.</i> STAT6; do inglês: signal transducer and activator of transcription)
TGE-R	fator de crescimento tumoral β (do inglês: transforming growth factor β)
TO P Th	L infócito T helper
TIMP	inibidor tissular de metaloprotease (do inglês: tissue inhibitor of
	metalloprotease)
Trk	cinase relacionada a tropomiosina (e.a. Trk A. Trk B e Trk C)
TNF-α	fator de necrose tumoral- α (do inglês: tumor necrosis factor- α)

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema ilustrando as estruturas do olho humano	20
Figura 2	Esquema ilustrando o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos	26
Figura 3	Esquema ilustrando as vias visuais centrais em humanos	28
Figura 4	Resposta do sistema nervoso a lesões	30
Figura 5	Principais vias de sinalização ativadas pela ligação da interleucina-2 (IL-2) ao seu receptor	43
Figura 6	Principais vias de sinalização ativadas pela ligação da interleucina-4 (IL-4) aos seus receptores	47
Figura 7	Principais vias de sinalização ativadas pela ligação das neurotrofinas aos seus receptores	49
Figura 8	Visualização do nervo óptico (ON) após a retirada do tecido adiposo	56
Figura 9	Esquema ilustrando o método de esmagamento de nervo óptico (ONC) e da injeção intravítrea	57
Figura 10	Esquema demonstrando a setorização do tecido retiniano	62
Figura 11	O efeito da IL-4 na sobrevida das células ganglionares da retina (RGC) após 2 e 5 dias <i>in vitro</i> (DIV)	64
Figura 12	A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 é dependente da atividade tirosina cinase	65
Figura 13	A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 é dependente da ativação da via da JAK	66
Figura 14	O efeito neuroprotetor da IL-4 sobre as RGC <i>in vitro</i> depende parcialmente da via da ERK	67
Figura 15	A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende parcialmente das vias da PI3K e da PKA, mas independe das vias da Src e da PKC	68
Figura 16	A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende da liberação de peptídeos	70
Figura 17	A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende da ativação de receptores Trk e da presença de BDNF na cultura	74
Figura 18	A IL-4 induz a expressão de BDNF em células de Müller <i>in vitro</i>	72

Figura 19	O efeito da IL-2 na sobrevida das RGC após 2 e 5 DIV	74
Figura 20	A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é dependente da atividade tirosina cinase	75
Figura 21	A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é dependente da ativação da via da JAK.	76
Figura 22	O efeito neuroprotetor da IL-2 sobre as RGC <i>in vitro</i> depende da via da ERK	77
Figura 23	A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente das vias da Src e da PI3K	78
Figura 24	A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente das vias da PKC e da PKA	79
Figura 25	A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente da liberação de peptídeos ou da ativação de receptores Trk	81
Figura 26	A IL-2 aumenta a expressão de heparan sulfato na retina e o pré-tratamento com heparitinase bloqueia o seu efeito neuroprotetor	82
Figura 27	Fotomicrografia do curso temporal da sobrevida de células na camada de células ganglionares da retina (GCL) após o esmagamento do nervo óptico (ONC)	84
Figura 28	Curso temporal da sobrevida de células na GCL (A) e do número de perfis picnóticos (B) após o ONC	86
Figura 29	Curso temporal da sobrevida de células na GCL e do número de perfis picnóticos após o ONC nas regiões central e periférica da retina	89
Figura 30	A administração intravítrea de BDNF aumenta a sobrevida de células na GCL 5 dias após ONC	90
Figura 31	A administração intravítrea de IL-2 aumenta a sobrevida de células na GCL 5 dias após ONC	92

LISTA DE TABELAS

Pagina

Tabela 1	Variações	da	técnica	de	esmagamento	de	nervo	óptico	
descritas na literatura								37	

SUMÁRIO

1	INTR	rrodução							
	1.1	O OLHO							
	1.2 A RETINA E AS PROJEÇÕES VISUAIS CENTRAIS – U VISÃO GERAL								
		1.2.1	AS VIAS	VISUAIS CENTRAIS	26				
	1.3	LESÃO (CNS)	E REGE	NERAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	28				
	1.4	MORTE (RGC)	E CELULA	R DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA	32				
	1.5	A RETI	NA COMO	MODELO DO CNS	34				
		1.5.1	MODELO	D IN VITRO	34				
		1.5.2	MODELO	D IN VIVO	35				
	1.6	СІТОС	INAS		38				
		1.6.1	A INTER	LEUCINA-2 (IL-2)	40				
		1.6.2	A INTER	LEUCINA-4 (IL-4)	43				
		1.6.3	O FAT CÉREBF	OR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO RO (BDNF)	46				
2	OBJ	ETIVOS			50				
3	МАТ	ERIAIS	E MÉTOD	OS	51				
	3.1	MATEF	ERIAIS						
	3.2	TRATA	MENTO EXPERIMENTAL						
		3.2.1	EXPERIMENTOS IN VITRO						
			3.2.1.1	CULTURA DE EXPLANTES DA RETINA	52				
			3.2.1.2	CULTURA DE MONOCAMADA DE CÉLULAS DE MÜLLER	53				
			3.2.1.3	MARCAÇÃO RETRÓGRADA DAS RGC	54				
		3.2.2	EXPERI	MENTOS IN VIVO	55				
			3.2.2.1	CIRURGIA DE ESMAGAMENTO DE NERVO ÓPTICO (ONC) E INJEÇÕES INTRA- OCULARES DE IL-2	55				
		3.2.3	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS						
			3.2.3.1	CRIOPRESERVAÇÃO E REALIZAÇÃO DOS CORTES DOS EXPLANTES DA RETINA	57				
			3.2.3.2	MONTAGEM PLANA DAS RETINAS	58				
			3.2.3.3	COLORAÇÃO COM VERMELHO NEUTRO	58				

			3.2.3.4	IMUNOHISTO	QUÍMICA		59	
		3.2.4	QUANTI	ICAÇÃO DA S	SOBREVIDA C	ELULAR	60	
			3.2.4.1	EXPERIMEN	TOS IN VITRO)	60	
			3.2.4.2	EXPERIMEN	ros IN VIVO .		61	
	3.3	APRES	SENTAÇÃO) DOS DADOS	E ANALISE E	STATÍSTICA	61	
4	RES	ULTAD	DS				63	
	4.1	EXPE	RIMENTOS	IN VITRO			63	
		4.1.1	A IL-4 A SINALIZ	UMENTA A S \ÇÃO ENVOL\	OBREVIDA D /IDAS	E RGC: VIAS	DE 63	
		4.1.2	O EFEI LIBERAÇ	ΓΟ DA IL-4 ;ÃΟ DE FATOF	É INDIRETO RES TRÓFICO), ATRAVÉS)S	DA 68	
		4.1.3	A IL-2 A SINALIZ	UMENTA A S \ÇÃO ENVOL\	OBREVIDA D /IDAS	E RGC: VIAS	DE 73	
	4.2	EXPE	RIMENTOS	IN VIVO			83	
		4.2.1	o mode Camada	LO DE ONC (DE CÉLULAS	CAUSA MORT GANGLIONA	E CELULAR RES	NA 83	
		4.2.2	A IL-2 MODELC	AUMENTA A	SOBREVID	A CELULAR I	NO 87	
5	DISC	CUSSÃO)				93	
6	CON	ICLUSÕ	ES				109	
7	PER	SPECTI	VAS				110	
8	8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS							

1.1 O OLHO

O olho dos vertebrados é uma estrutura altamente especializada com a função de converter a informação luminosa em atividade elétrica (fototransdução), a qual será codificada e transmitida, através do nervo óptico (ON), a diferentes áreas de processamento presentes no sistema nervoso central (CNS). Sua estrutura assemelha-se a de uma câmera fotográfica, onde suas lentes auto-ajustáveis (córnea e cristalino) focalizam o objeto, e a pupila regula a entrada de luz através de variações em seu diâmetro (de modo semelhante a um diafragma). Assim, a imagem do meio externo é projetada na retina ("filme fotográfico"), localizada na região posterior do olho (figura 1). Esta última estrutura possui uma camada de células fotossensíveis (fotorreceptores) e a capacidade de reconhecimento espectral destas células proporciona a absorção seletiva da energia luminosa local, construindo assim múltiplas representações que codificarão as qualidades visuais de luminosidade e contraste de cores (Patil *et al.*, 2000; Margalit e Sadda, 2003).

Os globos oculares estão localizados anteriormente em cavidades semicirculares denominadas órbitas, delimitadas pelos ossos maxilares, frontal, zigomático, esfenóide, etmóide e lacrimal. Seus movimentos são realizados por 6 músculos extra-oculares: quatro músculos retos (superior, inferior, lateral e medial) e dois oblíquos (superior e inferior). Na região súpero-lateral das órbitas estão localizadas as glândulas lacrimais, cuja secreção (lágrima) tem a função de proteger a superfície anterior do olho, mantendo-a úmida e limpa (Smerdon, 2000; Presland, 2007; figura 1A).



Figura 1 - Esquema ilustrando as estruturas do olho humano. Estruturas externas (A) e internas (B). Retirado em 29/10/2008, de w*orld wide web*: <u>http://www.helenkeller.org.br/anatomia.html</u> e <u>http://eyesareus.org</u>.

A córnea é formada por um tecido transparente, avascularizado, com epitélio não-queratinizado e com as fibras colágenas organizadas de forma paralela (Patil, 2000; Presland, 2007). A transparência desta estrutura é uma característica inerente à sua função uma vez que, juntamente com o cristalino, ela é responsável pela focalização da imagem sobre a retina (acomodação), convergindo os raios luminosos durante sua travessia para o interior do olho. Em continuidade com a córnea, envolvendo externamente o globo ocular, está a esclera ("branco dos olhos"). A composição destas duas estruturas é idêntica, apesar do nítido contraste entre a opacidade da esclera e a transparência da córnea. Essa diferença resulta da organização estrutural das fibras colágenas que na esclera, diferente da córnea, estão dispostas de forma irregular (Presland, 2007; figura 1B).

No interior do globo ocular, posteriormente à córnea, localiza-se a câmara anterior, seguida pela íris, um fino disco contrátil pigmentado (que confere a cor aos olhos), que por sua vez possui um orifício central, a pupila, por onde a luz do meio externo chega ao interior do olho e à retina. A quantidade de luz que atravessa a pupila é regulada através de variações do diâmetro pupilar, geradas pela atividade do sistema nervoso autonômico sobre dois conjuntos de músculos involuntários, o esfíncter pupilar e o dilatador da pupila, que agem de forma antagônica causando a miose (contração) ou midríase (dilatação) da pupila, em resposta à entrada de diferentes níveis de luz durante o ajuste focal (Patil, 2000; Davis-Silberman e Ashery-Padan, 2007). Entre a íris e o cristalino temos a câmara posterior que, assim como a câmara anterior, é preenchida por um líquido transparente, de composição química levemente hipertônica em relação ao plasma sanguíneo e de conteúdo protéico menor que este, o humor aquoso (Davis-Silberman e Ashery-Padan, 2007).

Este líquido é produzido pelo corpo ciliar, que é constituído pelos processos ciliares e músculos ciliares. Secretado pelo corpo ciliar na câmara posterior, o humor aquoso flui para a câmara anterior através da abertura da pupila, onde é drenado pelo canal de Schelman, no sistema trabecular. O equilíbrio entre a produção e a drenagem do humor aquoso resulta na manutenção da pressão intraocular, devendo esta permanecer em torno de 11 a 16 mm de Hg (Patil, 2000; Presland, 2007). Quando a drenagem do humor aquoso é prejudicada a pressão intraocular aumenta, danificando o ON e resultando em uma condição conhecida como Glaucoma (Weber *et al.*, 2008). Duas importantes funções do humor aquoso são a nutrição e remoção de metabólitos da córnea e do cristalino, compensando a ausência de vasos sanguíneos dessas estruturas. O cristalino é uma lente biconvexa e transparente que tem a sua curvatura alterada durante a focalização da imagem na retina (acomodação), através da contração dos músculos ciliares (Davis-Silberman e Ashery-Padan, 2007; Presland, 2007; figura 1B).

Localizado atrás do cristalino e ocupando cerca de 80% do volume do globo ocular encontramos o humor vítreo, um meio fluido composto por uma substância gelatinosa e transparente (Presland, 2007). Na região posterior do olho, temos o tecido neural do globo ocular, a retina, responsável pela detecção e processamento inicial da informação visual. O envio da mensagem visual até os seus alvos superiores é realizado pelo ON, formado pelos axônios das células ganglionares da retina (neurônios de projeção) que emergem de uma região denominada disco óptico (Vergara *et al.*, 2005). Por fim, entre a retina e a esclera, localiza-se a coróide, estrutura ricamente vascularizada que supre as estruturas da câmara anterior e da camada externa da retina com nutrientes e oxigênio (Presland, 2007; figura 1B).

1.2 A RETINA E AS PROJEÇÕES VISUAIS CENTRAIS – UMA VISÃO GERAL

A retina dos vertebrados é derivada da região anterior do tubo neural e origina-se durante a embriogênese através de uma evaginação do diencéfalo, permanecendo ligada ao CNS através do ON (Fisher e Reh, 2003 para revisão). Portanto, apesar de sua localização periférica, o tecido retiniano é uma estrutura do CNS, onde observamos um padrão de organização laminar com três camadas nucleares (onde estão localizados os corpos celulares) e 2 camadas plexiformes (onde se localizam os contatos sinápticos; figura 2). Dentre as células neuronais encontramos neurônios sensoriais especializados (fotorreceptores), interneurônios (células horizontais, amácrinas e bipolares) e neurônios de projeção (células ganglionares), que juntos são responsáveis pela fototransdução, processamento, codificação e transmissão da informação visual ao nível retiniano (Donovan e Dyer, 2005 para revisão).

O epitélio pigmentado da retina (RPE), localizado entre a retina e a coróide, absorve o excesso de luz evitando sua reflexão no interior do olho além de controlar o metabolismo de retinóides. Outra importante função do RPE é a renovação dos segmentos externos dos fotorreceptores, através da fagocitose dessas estruturas, responsáveis pelo processo de fototransdução (Bok, 1993; Boulton e Dayhaw-Barker, 2001; Fain, 2006). A retina dos mamíferos possui dois tipos de fotorreceptores, os bastonete e os cones, sendo o primeiro responsável pela visão em baixas luminosidades (escotópica), enquanto o segundo pela visão em altas luminosidades (fotópicas) em cores e com detalhes espaciais (Sharpe e Stockman,

1999, para revisão). A maioria dos mamíferos possui visão dicromática, com exceção dos primatas, que possuem visão tricromática (Masland, 2001; Lee, 2004).

Os corpos celulares dos fotorreceptores localizam-se na camada nuclear externa (ONL). Segue-se a camada plexiforme externa (OPL), onde estão presentes os contatos sinápticos entre os fotorreceptores, as células bipolares e as células horizontais. Na camada nuclear interna (INL) estão os corpos celulares da glia de Müller, células amácrinas, células horizontais e células bipolares, cujos contatos sinápticos com as células ganglionares estão, por sua vez, localizados na camada plexiforme interna (IPL) (Masland, 2001a, 2001b; Margalit, 2003; Masland, 2004). Por fim, na região mais interna da retina localiza-se a camada de células ganglionares (GCL), formada pelas células ganglionares da retina (RGC; figura 2). Em roedores na idade adulta, aproximadamente 40 a 50% das células da GCL é formada por células amácrinas deslocadas (Perry *et al.*, 1983).

Diferentes populações gliais são observadas na retina, onde se pode destacar a presença da glia de Müller, de astrócitos e da microglia. Este último tipo celular é encontrado predominantemente na porção externa da retina, enquanto os astrócitos estão presentes na camada de fibras do ON, em situações fisiológicas. A glia de Müller, que é o tipo glial predominante na retina, tem seu corpo celular localizado na INL e seus prolongamentos citoplasmáticos se estendem ao longo das camadas celulares e plexiformes da retina formando, nas extremidades externa e interna deste tecido, as membranas limitantes externa (OLM) e interna (ILM), respectivamente (figura 2). Além de um papel estrutural, a glia de Müller está relacionada à nutrição, produção de fatores tróficos, assim como remoção de íons e neurotransmissores do espaço extracelular (Newman e Reichenbach, 1996). Vale

ressaltar ainda que a glia de Müller é um tipo glial de origem astrocítária com localização exclusiva no tecido retiniano (Cepko, 2000). Uma região topográfica da retina que merece destaque é a fóvea, localizada na região mais central da mácula lútea (figura 1B). Esta região possui uma alta densidade de fotorreceptores, sendo o ponto da retina com maior acuidade visual (Kandel *et al.*, 2003, para revisão).

Em ratos neonatos, a retina é composta por apenas duas camadas celulares, separadas pelos primórdios de uma camada plexiforme (Linden et al., 1999). A figura 2 ilustra o desenvolvimento da retina pós-natal de ratos. No dia pósnatal 0 (P0), a camada mais interna é a GCL que, nesta etapa, é formada apenas por células ganglionares. Logo na primeira semana a GCL será ocupada também por células amácrinas deslocadas que migram na fase pós-natal. Na fase adulta, cerca de 50% das células da GCL são células amácrinas (Perry et al., 1983). A camada celular externa é denominada camada neuroblástica (NL), formada por células proliferantes e pós-mitóticas que darão origem às células das outras camadas da retina descritas anteriormente. A NL de ratos P0 já possui algumas células amácrinas se diferenciando e um pequeno número de fotorreceptores, próximos ao RPE. Entre P5 e P6 observa-se a formação da OPL delimitando a ONL, com os fotorreceptores em diferenciação, e separando esta última da NL. O processo de divisão celular nesta camada continua até o fim da primeira semana pós-natal (Linden et al., 1999). Em torno do 14º dia, quando o animal abre os olhos, a retina já está relativamente madura, embora a reorganização dendrítica continue (Yamasaki e Ramoa, 1993).



Figura 2 - Esquema ilustrando o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos. Esquema de cortes transversais da retina de ratos apresentando o desenvolvimento pós-natal das diferentes camadas e organização dos tipos celulares retinianos. P, dia pós-natal; RPE, epitélio pigmentado da retina; OS, segmentos externos de fotorreceptores; OLM, membrana limitante externa; ONL, camada nuclear externa; OPL, camada plexiforme externa; INL, camada nuclear interna; NL, camada neuroblástica; IPL, camada plexiforme interna; GCL, camada de células ganglionares; ILM, membrana limitante interna; OL, camada de fibras do nervo óptico.

1.2.1 AS VIAS VISUAIS CENTRAIS

Como mencionado anteriormente, as RGC são os neurônios de projeção da retina e seus axônios formam a camada de fibras do ON. Desmielinizados em sua porção retiniana, os axônios das RGC convergem em uma região circular na porção nasal da retina denominada disco óptico. Desprovida de fotorreceptores, esta área da retina também é denominada ponto cego. Do disco óptico de ambos os olhos, emergem os nervos ópticos (II par de nervos cranianos) que a partir deste ponto passam a ser mielinizados por oligodendrócitos (Osborne et al., 2004), seguindo em direção à linha média, onde decussam em uma região denominada quiasma óptico para formarem os tratos ópticos (figura 3). Em seres humanos, cerca de 60% das fibras do ON decussam alcançando alvos contralaterais, enquanto 40% permanecem ipsilaterais (Purves et al., 2005). Após o cruzamento no quiasma, o primeiro alvo das fibras do trato óptico é o núcleo supra-quiasmático, que possui um importante papel na regulação do ritmo circadiano (Berson et al., 2002; Hatar et al., 2002). Outros alvos são o núcleo geniculado lateral (tálamo), localizado no diencéfalo e que emite axônios para o córtex visual primário (radiação óptica); os núcleos pré-tectais, que emitem axônios para os núcleos dos nervos cranianos, responsáveis pelos reflexos oculomotores (e.g. acomodação e reflexo pupilar); e o colículo superior, que emite axônios para os núcleos motores do tronco encefálico e medula espinhal, sendo responsável pelos reflexos de orientação dos olhos, cabeça e do corpo em relação aos estímulos visuais (Kandel et al., 2003; Purves et al., 2005 para revisão). Em ratos, 95% das projeções retinofugais decussam no quiasma óptico, enquanto apenas 5% permanecem ipsilaterais (Lund, 1965).



Figura 3 – Esquema ilustrando as vias visuais centrais em humanos. As projeções retinofugais e seus alvos no sistema nervoso central estão indicados (modificado de Purves *et al.*, 2005).

1.3 LESÃO E REGENERAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (CNS)

O sistema nervoso periférico (PNS) e o CNS possuem diferentes mecanismos de resposta a lesões (figura 4). Enquanto no primeiro é comum a regeneração após lesão axonal, no segundo geralmente isto não ocorre de maneira satisfatória. Entre os eventos envolvidos na resposta do PNS está um processo denominado degeneração Walleriana. Primeiro, proteases dependentes de cálcio são ativadas na região distal do axônio lesado resultando em sua degradação.

Macrófagos são recrutados e removem os resíduos do axoplasma e debris de mielina (Hirata *et al.*, 2002).

No CNS de mamíferos o processo regenerativo geralmente não ocorre de maneira eficiente ou apropriada. A remoção dos debris de mielina pela microglia é relativamente baixa e ocorre a produção de moléculas inibitórias que podem bloquear o crescimento axonal (figura 4B). Os axônios em regeneração encontram uma barreira física, a cicatriz glial, formada principalmente por astrócitos reativos que se tornam hipertrofiados e aumentam a expressão de filamentos intermediários, como vimentina e GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (Fawcett e Asher *et al.*,1999). Além disso, astrócitos e células precursoras de oligodendrócitos aumentam também a expressão de moléculas inibitórias do crescimento, como por exemplo, Nogo, MAG (glicoproteína associada a mielina), e Omgp (glicoproteína da mielina de oligodendrócito), além de moléculas de ECM que, neste caso, fornecem um ambiente inibitório para a regeneração axonal (Grandpré e Stritmatter, 2001; Silver e Müller, 2004; Sandvig *et al.*, 2004; Busch e Silver., 2007; Pizzi e Crowe, 2007 para revisão).



Figura 4 - Resposta do sistema nervoso a lesões. A, seqüência de eventos que ocorrem em resposta a lesões no sistema nervoso periférico; B, seqüência de eventos que ocorrem em resposta a lesões no sistema nervoso central (modificado de Purves *et al.*, 2005).

Dentre as moléculas de ECM relacionadas à formação deste ambiente inibitório estão os proteoglicanos. Estas macromoléculas são formadas por uma proteína central, onde se ligam cadeias de glicosaminoglicanos (cadeias polissacarídicas, longas, não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas repetidas). A classificação destas macromoléculas é feita de acordo com o glicosaminolicano presente em sua estrutura que pode ser do tipo heparan sulfato (HS), condroitin sulfato (CS), keratan sulfato (KS), entre outros (Busch e Silver., 2007 para revisão). Os astrócitos produzem quatro classes de proteoglicanos: HS, KS, CS e dermatan sulfato. A expressão de proteoglicanos contendo CS (CSPG) é aumentada quando da formação de cicatrizes gliais no encéfalo e medula espinhal de animais adultos (Pizzi e Crowe, 2007 para revisão). Além disso, a clivagem desta molécula com o uso de condroitinase (enzima que degrada proteoglicanos que contem CS) facilita a regeneração axonal, ou seja, a neutralização de proteoglicanos inibitórios é um facilitador da regeneração axonal no CNS (Rolls et al., 2004). Já foi demonstrado também que os dissacarídeos de HS e de CS podem promover extensão de neuritos in vitro e in vivo (Gorio et al., 1997; Rolls et al., 2004), além de aumentar a sobrevida de RGC em um modelo de glaucoma agudo in vivo (Bakalash et al., 2007). Este fato levou Pizzi e Crowe (2007) a sugerirem que além de degradar o ambiente inibitório a clivagem destes proteoglicanos liberaria também dissacarídeos com possíveis efeitos neurotróficos.

Em modelos experimentais de lesão de ON (esmagamento), observou-se que implantes intravítreos de nervos periféricos (Berry *et al.*, 1999) e lesões de cristalino (Leon *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2003) resultam em regeneração axonal, mesmo sem o pré-tratamento com neutralizantes de moléculas

inibitórias do crescimento. Isso pode ser atribuído à não formação da cicatriz glial no local da lesão, como foi visto por Berry e colaboradores (1999). Além disso, um aumento na expressão de metaloproteases (MMPs) também foi observado no modelo de esmagamento seguido pelo implante intravítreo de nervo periférico ou pela lesão de cristalino (Ahmed *et al.*, 2005). Neste trabalho, o autor sugere que essas proteases seriam secretadas por astrócitos e estariam degradando o ambiente inibitório, permitindo o crescimento axonal além do local da lesão.

As MMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que estão envolvidas na remodelagem da ECM através da degradação de grande parte das proteínas presentes na mesma, incluindo o colágeno, laminina e CSPG (Yong *et al.*, 1998). Os membros da família das MMPS estão classificados em 4 grandes grupos: colagenases intersticiais, estromelisinas, gelatinases e metaloproteases de membrana, de acordo com sua estrutura protéica. A atividade das MMPs pode ser controlada: (i) através da regulação da transcrição, (ii) ativação de zimógenos, ou (iii) inativação pelos inibidores tissulares de MMPs (TIMPs). Juntos, as MMPs e as TIMPs regulam as interações célula-ECM e ECM-ECM que estão associadas com uma variedade de processos fisiológicos. Logo, um desequilíbrio na função dessas proteases pode resultar em disfunções celulares e danos teciduais (Visse e Nagase, 2003 para revisão)

1.4 MORTE CELULAR DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA (RGC)

A morte celular durante o desenvolvimento é um fenômeno comum tanto em vertebrados quanto em invertebrados, ocorrendo virtualmente em todos os tipos

celulares do NS (Linden *et al.*, 1999). A sobrevida e a manutenção de neurônios durante o desenvolvimento dependem de interações com seus alvos e aferências, assim como com as células circunjacentes (*e.g.* células gliais). Durante a neurogênese, ocorre uma superprodução de neurônios e projeções e, principalmente durante o período de sinaptogênese, aqueles neurônios que estabelecem conexões com seus alvos recebem fatores tróficos, enquanto os que não alcançam degeneram, sofrendo morte celular. Dependendo da estrutura do CNS em questão, cerca de 40 a 70% das células neuronais morrem durante o desenvolvimento (Buss *et al.*, 2006 para revisão).

Considerando que a retina é uma estrutura do CNS, este fenômeno não é diferente. Em roedores a morte celular programada (PCD) é um fenômeno comum nas camadas internas e externas do tecido retiniano, ocorrendo no final do período pré-natal e início do período pós-natal. Em camundongos e ratos o número de células ganglionares da retina é reduzido em aproximadamente 50% após o nascimento (Linden *et al.*,1999).

Além da neurogênese, evento onde a morte celular é de extrema importância na determinação do número final de células tanto na retina como em todo o CNS, a morte de RGC também é observada em patologias retinianas como as neuropatias ópticas, que compreendem um grande grupo de doenças caracterizadas pela perda visual resultante de disfunções do ON. Entre as diversas causas que podem levar a essas patologias estão: inflamação (*e.g.* neuroretinite), neoplasias (*e.g.* glioma do ON), lesão (*e.g.* neuropatia óptica traumática), isquemia, glaucoma, entre outros. Apesar da variedade de fatores, uma característica comum

a todas as neuropatias ópticas é a degeneração das RGC (Osborne *et al.*, 2004 para revisão).

1.5 A RETINA COMO MODELO DO CNS

A retina é um tecido de localização periférica amplamente utilizado como modelo de estudos de diferenciação, desenvolvimento e regeneração do CNS. Sua estrutura laminar, fina e relativamente transparente permite a visualização de suas células com o tecido ainda íntegro ou em cortes histológicos. Sua estrutura de fácil acesso permite a sua utilização tanto para estudos *in vitro* quanto para estudos *in vivo* (Cepko *et al.,* 1996).

1.5.1 MODELO IN VITRO

As culturas de células isoladas da retina ou do tecido retiniano são modelos bem estabelecidos em estudos do CNS e possuem como vantagem o controle das condições experimentais, além da redução do número de animais utilizados na pesquisa (Seigel, 1999). Entre os modelos de cultura de retina estão incluídos o de células dissociadas e os explantes de retina. Este último possui, em relação ao primeiro, a vantagem de manter o padrão histológico do tecido íntegro com as interações célula-célula e célula-ECM, sendo uma excelente ferramenta para o estudo de mecanismos dependentes da organização histotípica do tecido nervoso.

O tecido retiniano pós-natal de ratos mantidos em cultura organotípica se desenvolve em um padrão semelhante ao *in vivo*. Durante o desenvolvimento pós-
natal *in vitro* a partir de animais recém-nascidos, a OPL começa a surgir no 4° dia, indicando que grande parte dos eventos que ocorrem *in vivo* são preservados *in vitro*, apesar da falha no desenvolvimento do segmento externo dos fotorreceptores e da morte das células ganglionares (Johansson *et al.*, 2000). Este último evento ocorre devido à secção do ON durante a remoção da retina, o que resulta em degeneração retrógrada das RGC axotomizadas, após 2 a 3 DIV, com um número máximo de células exibindo perfis picnóticos no 1º DIV (Rehen *et al.*, 1993), o que permite o uso deste modelo no estudo de mecanismos de neuroproteção no CNS.

1.5.2 MODELO IN VIVO

A retina e as projeções retinocoliculares em ratos adultos são amplamente utilizados para se estudar o fenômeno de morte secundária de neurônios do CNS após lesão (Panagis *et al.,* 2005; Berkelaar *et al.,* 1994), fornecendo uma excelente ferramenta para testar estratégias que promovam a sobrevida neuronal e a regeneração axonal (Yin *et al.,* 2003, 2006; Pernet e Di Polo., 2006).

Um importante modelo de degeneração do CNS é o obtido pelo esmagamento do nervo óptico (ONC), que resulta em morte celular programada (PCD) das RGC e é utilizado como modelo para o glaucoma, neuropatia óptica isquêmica anterior e danos traumáticos do ON, uma vez que nestas doenças ocorre a lesão do ON e PCD das RGC (Osborne *et al.*, 2004 para revisão). É descrito na literatura que a lesão do ON é seguida de um aumento nas concentrações de óxido nítrico e glutamato no humor aquoso, o que leva à degeneração secundária neste tecido (Schwartz *et al.*, 2004a, 2004b). Entretanto, a seqüência completa de eventos

que resulta na morte progressiva das RGC após o ONC ainda não está bem elucidada. Após a lesão, uma parte das células morre por necrose devido à lesão mecânica, enquanto outras morrem tardiamente, por PCD. Dentre os fatores que podem estar envolvidos neste processo estão o bloqueio do transporte axonal, o que resulta em suprimento inadequado de fatores tróficos, o desequilíbrio na homeostase de cálcio, a excitotoxicidade por glutamato e NO e ativação de caspase-9 (Yoles e Schwartz, 1998; Kreutz *et al.*, 1999; Grosskreutz *et al.*, 2005).

Em camundongos, após o ONC a morte celular ocorre continuamente durante 3 semanas, sendo o pico de morte celular observado no fim da primeira semana. Em duas semanas a perda celular na GCL é de aproximadamente 40% (Li *et al.*, 1999). Em experimentos realizados com ratos, 66% das células ganglionares degeneram em duas semanas e a morte celular é mais acentuada na retina periférica (Yoles e Schwartz, 1998). Vale ressaltar que os dados a respeito dos processos de degeneração das RGC, reatividade glial, expressão de ECM e neuroinflamação não são bem esclarecidos pela literatura, além da metodologia não ser padronizada entre os diferentes modelos utilizados (Yoles e Schwartz, 1998; Klocker *et al.*, 2001; Tezel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2005). Assim, diversos trabalhos utilizam este mesmo modelo apresentando diferenças marcantes quanto à técnica e a duração da compressão, gerando uma grande variação dos resultados em relação ao curso temporal da morte celular, como pode ser observado na tabela 1.

Animal (Idade)	Tempo de esmagamento	Morte celular (GCL x RGC)	Referência
Camundongo (Adulto)	1 x 3 segundos	37% - 47% em duas semanas (GCL)	Li <i>et al</i> ., 1999 <i>,</i> 2007
Camundongo (Adulto)	1x 3-5 segundos	15% em uma semana (RGC) 40% em duas semanas (RGC) 55% em três semanas (RGC)	Tezel <i>et al.,</i> 2004
Rato (Adulto)	1 x 6 minutos	66% em duas semanas (RGC)	Klocker <i>et al.,</i> 2001
Rato (Adulto)	3 x 10 segundos	66% em uma semana (RGC)	Freeman e Grosskreutz, 2000 Huang <i>et al.,</i> 2005
Rato (Adulto)	3 x 15 segundos	66% em duas semanas (RGC)	Zaverucha-do-Valle, 2006
Rato (Adulto)	1 x 30 segundos	35% em uma semana (GCL)	Bien <i>et al.,</i> 1999

Tabela 1 - Variações da técnica de esmagamento de nervo óptico.GCL, camadade células ganglionares; RGC, células ganglionares da retina.

1.6 CITOCINAS

Citocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular (8-30 kDa), sendo particularmente importantes como mediadores da inflamação e reguladores do crescimento e diferenciação celular (Rothwell e Strijbos, 1995). São moléculas produzidas e liberadas por diversos tipos celulares e capazes de induzirem respostas através de sua ligação e associação a receptores de membrana. Geralmente atuam de maneira autócrina ou parácrina porém, algumas citocinas (e.g. a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa - TNF- α) podem entrar na corrente sanguínea e se manterem estáveis o suficiente para atuarem de maneira endócrina (Turrin e Plata-Salamán, 2000; Gibson et al., 2004 para revisão). Atualmente existem mais de 200 citocinas distintas identificadas e muitas vezes agrupadas em famílias, dentre as quais se destacam as interleucinas (IL; e.g. IL-1, IL-2, IL-3 etc), os fatores de crescimento (e.g. fator de crescimento de fibroblastos - FGF), os TNF, e os interferons (e.g. IFN-β), além das neurotrofinas (e.g. fator de crescimento do nervo -NGF, fator de crescimento derivado do cérebro - BDNF). Inicialmente, a nomenclatura das diferentes citocinas era feita de acordo com a ação biológica das mesmas quando de sua identificação. Por exemplo, em sua primeira descrição, os interferons foram identificados como moléculas que atuavam durante a resposta imune a infecções virais, já o TNF, como o nome já diz, causava a necrose de células tumorais. Porém, as citocinas são moléculas de ação pleiotrópica e muitas vezes a primeira atividade identificada não é a mais significativa. Assim, muitas das citocinas descritas após 1980 foram denominadas de interleucinas (IL) e numeradas sequencialmente, sendo, portanto, a IL-1 a primeira a ter sido classificada desta forma (Vilcéck, 2006 para revisão).

Um outro padrão de classificação agrupa as citocinas baseando-se no balanço final dos seus efeitos. De acordo com esse parâmetro, essas moléculas são distribuídas em dois grandes grupos: as citocinas pró-inflamatórias (estimulatórias), secretadas por linfócitos Th1, e as citocinas anti-inflamatórias (inibitórias), secretadas por linfócitos Th2. No primeiro grupo estão incluídas as IL-1, IL-2, IL-6, e o TNF- α , enquanto no segundo grupo estão incluídas as IL-4, IL-10 e o fator de crescimento tumoral (TGF)- β (Szelényi, 2001; Vitkovic *et al.*, 2001). Duas importantes características das citocinas são a pleiotropia e a redundância, ou seja, uma citocina pode ter múltiplas funções e estas funções podem ser mimetizadas por outras citocinas. Além disso, a interação sinérgica também pode ocorrer, resultando em um efeito que é significantemente maior do que o exibido com apenas uma citocina (Turrin e Plata-Salamán, 2000 para revisão).

Apesar de terem sido descritas inicialmente como mediadoras da resposta imune, atualmente sabe-se que as citocinas são produzidas por diversas populações celulares neurais e seus receptores estão amplamente distribuídos tanto no CNS quanto no PNS (Raber *et al.*, 1998; Pollmacher *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; da-Silva *et al.*, 2008; Camacho-Arroyo *et al.*, 2009; Sholl-Franco *et al.*, 2009 para revisão). A presença dessas moléculas e de seus receptores no CNS deve-se principalmente à síntese local por células gliais, endoteliais ou de origem hematopoiética, apesar do transporte através da barreira hemato-encefálica já ter sido descrito para algumas destas moléculas (Waguespack *et al.*, 1994; Turrin e Plata-Salamán, 2000). A expressão constitutiva das citocinas e seus receptores reforça a idéia de que estas moléculas contribuam para o desenvolvimento normal do CNS (Beck Jr. *et al.*, 2002; Beck Jr. *et al.*, 2005; da-Silva *et al.*, 2008), enquanto

vários trabalhos têm demonstrado a importância dessas moléculas no CNS e no PNS durante eventos patológicos e degenerativos (Rothwell e Strijbos, 1994; Mizuno *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1997; Jankowsky e Patterson, 2001; Lucas *et al.*, 2006; Minami *et al.*, 2006; Nakazawa *et al.*, 2006; Camacho-Arroyo *et al.*, 2009 para revisão). Além disso, as ações neurotróficas de citocinas têm sido descritas na literatura, tanto em modelos *in vitro*, como a neuroproteção mediada por IL-6 em células granulares do cerebelo submetidas a excitotoxicidade mediada por glutamato (Peng *et al.*, 2005), quanto em modelos *in vivo*, onde a transfecção viral de CNTF (MacLaren *et al.*, 2006) aumenta a sobrevida de RGC em um modelo de lesão de retina. Neste trabalho, daremos ênfase às seguintes citocinas: IL-2, IL-4 e BDNF.

1.6.1 A INTERLEUCINA-2 (IL-2)

Descrita em 1976, a IL-2 é uma citocina expressa como uma glicoproteína variavelmente glicosilada de aproximadamente 15.5 kDa contendo 133 aminoácidos. Inicialmente ela foi descrita como um fator de crescimento de linfócitos T e células NK, além de induzir a proliferação de linfócitos B e secreção de imunoglobulina (Janeway *et al.*, 2007 para revisão). Apesar de ter sido identificada como um potente regulador da resposta imune, o papel desta citocina não é restrito apenas ao sistema imunológico. Além da ampla distribuição desta molécula e de seu receptor no CNS (*e.g.* córtex frontal, estriado, hipotálamo, cerebelo, hipocampo), suas ações na sobrevida e modulação das atividades neuronais têm sido bem documentadas, reforçando a idéia desta citocina como um fator neuro-regulatório (Hanisch e Quirion, 1996; Beck Jr., 2002; Goncharova e Tarakanov, 2007). A IL-2 apresenta importantes

papéis no CNS e sua produção por células neuronais (Hanisch e Quirion, 1996 para revisão) e gliais (Araújo *et al.,* 1989; Araújo e Cotman, 1995; Hanisch e Quirion, 1996 para revisão) já foi descrita, apesar de sua origem também poder ser periférica (Waguespack *et al.,* 1994), sugerindo que esta citocina possa regular as interações entre os tecidos periféricos e o CNS (Goncharova e Tarakanov, 2007).

Em 1999, Petitto e colaboradores descreveram alterações cognitivas com déficit de aprendizado e de memória em camundongos nocautes para IL-2, enquanto Beck Jr. e colaboradores (2002) descreveram alterações hipocampais exibidas neste mesmo modelo, o que evidencia a importância desta citocina durante o processo de neurogênese no CNS. Além disso, a IL-2 também modula a atividade de receptores para glutamato do tipo NMDA e, conseqüentemente, a excitabilidade neuronal em neurônios mesolímbicos (Ye *et al.*, 2001).

A expressão da IL-2 e de seus receptores também já foi descrita no bulbo olfatório de ratos (Wang *et al.,* 2001), indicando ações neurotróficas autócrinas e parácrinas durante o processo de regeneração do nervo e bulbo olfatórios. Neste mesmo ano, Sholl-Franco e colaboradores (2001a) descreveram o aumento na sobrevida de neurônios retinianos *in vitro* (RGC), quando da administração da IL-2, assim como observado por Awatsuji e colaboradores (1993) para neurônios corticais (piramidais).

O receptor da IL-2 (IL-2R) é composto por três subunidades, as cadeias α (IL-2R α), β (IL-2R β), e γ (IL-2R γ), sendo a última frequentemente referida como a cadeia γ comum (γ c), que por sua vez também está presente nos receptores das IL-4, IL-7, IL-9, e IL-15. Além da subunidade γ , a subunidade β também está presente como constituinte do receptor de pelo menos uma outra citocina, a IL-15, o que pode

estar relacionado à grande redundância nos mecanismos de ação destas duas interleucinas (IL-2 e IL-15) em diferentes tipos celulares (Ellery e Nicholls, 2002 para revisão). A IL-2Rα é crucial para a atividade do receptor, pois é o componente de maior afinidade para a IL-2 (Ihle, 1995; Liu et al., 1996; Lin e Leonard, 1997), sendo portanto descrita como a que confere a especificidade do complexo receptor. O IL-2R não possui atividade catalítica intrínseca e a transdução do sinal após sua ativação ocorre através do recrutamento de membros da família das janus cinases (JAK1 e JAK3), que são proteínas tirosina cinases citoplasmáticas. JAK1 associa-se ao IL-2R β , enquanto JAK3 associa-se ao IL-2R γ . A ligação da IL-2 ao IL-2R α resulta na heterodimerização ou heterotrimerização do mesmo, levando à formação de um complexo com JAK1/3 e a fosforilação de resíduos tirosina de várias proteínas intracelulares, incluindo o próprio complexo IL-2Rβγ. Consequentemente, várias vias de sinalização podem ser ativadas, incluindo as proteínas de transdução de sinal e ativadoras transcricionais (STATs), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como ilustrado na figura 5 (Kono, et al., 1993; Minami e Taniguchi, 1995; Ellery e Nicholls, 2002). Em uma das vias de sinalização, as STAT5 α e β pode se associar com o complexo receptor da IL-2 fosforilado e sua fosforilação leva à dimerização e translocação das STATs para o núcleo, onde estes fatores de transcrição irão agir regulando a ativação de genes específicos (Delespine-Carmagnat et al., 2000).



Figura 5 - Principais vias de sinalização ativadas pela ligação da interleucina-2 (IL-2) ao seu receptor. Retirado em 29/10/2008, de world wide web: www.biocarta.com/pathfiles/h IL2PATHWAY.asp.

1.6.2 A INTERLEUCINA-4 (IL-4)

A interleucina-4 é um membro protótipo da família de citocinas antiinflamatórias, sendo composta por 129 aminoácidos e apresentando peso molecular de 20kDa. Entre outras funções esta citocina desempenha o papel de regular a proliferação e diferenciação de uma variedade de células hematopoiéticas (Nelms *et al.*, 1999 para revisão). Primeiramente esta citocina foi descrita como uma molécula produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺, durante a resposta imune, e que desempenha um importante papel durante respostas alérgicas, regulando a diferenciação e proliferação de células T helper 2 (Th2), a síntese de imunoglobulina E (IgE) por linfócitos B, além de aumentar as respostas mediadas por esta Ig em linfócitos B, mastócitos e basófilos (Wills-Karp e Finkelman, 2008). A apoptose de eosinófilos também é inibida por IL-4, tendo sido demonstrado que a neuroproteção mediada por linfócitos Th2 em nervos faciais axotomizados é dependente da ação desta citocina sobre populações hematopoéticas (DeBoy *et al.,* 2006).

Além de suas funções classicamente descritas durante as respostas imunológicas, a IL-4 apresenta uma ampla gama de ações no organismo, assim como seus receptores são expressos por diversas populações celulares (Sholl-Franco *et al.*, 2009 para revisão). Park e colaboradores (2005) descreveram a ação modulatória da IL-4 na produção de NO e na expressão da óxido nítrico sintetase do tipo induzida (iNOS) pela microglia durante a resposta inflamatória no CNS. Além disso, essa citocina é capaz de estimular a produção de NGF por estas células. Este mesmo grupo demonstrou também a regulação da proliferação glial pela IL-4 (Brodie e Goldreich, 1994).

Os efeitos neurotróficos da IL-4 foram mostrados em cultura de células hipocampais (Araújo e Cottman, 1993) e em neurônios retinianos *in vitro* (Sholl-Franco *et al.*, 2001a, 2001b). A morte de células fotorreceptoras *in vitro* induzida por tapsigargina também foi inibida quando do tratamento com a IL-4 (Adão-Novaes *et al.*, 2009). Experimentos *in vivo* utilizando a axotomia do ON demonstraram que a transfecção viral da IL-4 resulta em aumento da sobrevida das RGC. Além da neuroproteção, outros papéis também são atribuídos à IL-4, como a proliferação, diferenciação e modulação do fenótipo neuronal. Culturas de células retinianas

tratadas com a IL-4 aumentaram o fenótipo GABAérgico (Sholl-Franco *et al.*, 2002) e a diferenciação de bastonetes de maneira dose-dependente (da-Silva *et al.*, 2008).

A IL-4 exerce suas atividades através de sua ligação a receptores heterodiméricos de superfície celular (figura 6) que podem ser do tipo I, composto pelas subunidades IL-4R α e IL-2R γ c e encontrado em células hematopoiéticas, ou do tipo II, composto pelas subunidades IL-4R α e IL-13R α 1 e encontrado em células não hematopoiéticas (Kirken *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 2002). A dimerização do receptor ocorre através da ligação da IL-4 à subunidade IL-4R α , que é a específica para os dois tipos de receptores. A ligação da IL-13 à subunidade IL-13R α 1 também pode ativar o receptor do tipo II, o que explica a existência de ações semelhantes para estas citocinas no sistema imune (Gadina *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2006; Kelly-Welch *et al.*, 2003 para revisão).

As principais vias de sinalização ativadas pela ligação da IL-4 ao seu receptor estão representadas na figura 6. As caudas citoplasmáticas das subunidades dos receptores da IL-4 não possuem atividade catalítica intrínseca e estão associadas a proteínas tirosina cinases do tipo JAK. A subunidade IL-4Rα associa-se com JAK1 e o IL-2Rγc com a JAK3, enquanto IL-13Rα1 interage tanto com JAK2 ou TYK2. A dimerização das subunidades do receptor aumenta a atividade da JAK, que fosforila diferentes resíduos citoplasmáticos de tirosina do receptor. As principais vias de sinalização ativadas pela IL-4 são JAK/STAT, Raf/MEK/MAPK e PI3K/proteína cinase B (PKB/Akt). Dentre as vias de sinalização descritas, a via da JAK/STAT6 é a mais comumente recrutada pelo IL-4Rα. A STAT6 se liga ao receptor fosforilado, em resíduos de tirosina, através do domínio SH2. Quando fosforilada, a STAT6 desliga-se do receptor, formando um homodímero com

uma segunda molécula de STAT6 fosforilada. O dímero de STAT6 transloca-se então para o núcleo, onde irá promover a transcrição de genes responsivos a IL-4 (Kirken *et al.*,1998; Nelms, 1999; Wick e Berton, 2000; Wang *et al.*, 2004; Kelly-Welch *et al.*, 2003; Wills-Karp e Finkelman, 2008 para revisão).

1.6.3 FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

O BNDF é uma citocina pertencente à família das neurotrofinas, um grupo de proteínas altamente conservadas onde estão incluídos também o NGF e as neurotrofinas-3, -4/5, -6 e -7 (NT-3, NT4/5, NT-6 e NT-7) (Huang e Reichardt, 2001; Manadas *et al.*, 2007 para revisão). Estas moléculas desempenham importantes papéis durante o desenvolvimento, plasticidade e manutenção do CNS (Cusato *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2005; Marshak *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008 para revisão).

O papel neuroprotetor do BDNF tem sido amplamente descrito na literatura. Em 2005, Almeida e colaboradores descreveram a sobrevida de neurônios hipocampais submetidos a excitotoxicidade por glutamato *in vitro,* através da ativação de receptores TrkB por BDNF. Neste mesmo ano, Bifrare e colaboradores demonstraram o papel protetor desta citocina em neurônios hipocampais *in vivo* onde tanto a morte neuronal necrótica quanto a apoptótica, causadas por meningite bacteriana em camundongos, foi reduzida através de injeções intraventriculares de BDNF.

O desenvolvimento e a plasticidade do SN também são modulados por esta citocina. A super expressão de BDNF acelera o refinamento dendrítico de RGC (Liu,

et al., 2007) e a expressão de receptores TrkB na retina é regulada durante o desenvolvimento retiniano em ratos (Ugolini *et al.*, 1995). Além disso, já foi demonstrado que durante este período a PCD na retina também é regulada pela disponibilidade diferencial de BDNF (Cusato *et al.* 2002).



Figura 6 - Principais vias de sinalização ativadas pela ligação da interleucina-4 (IL-4) aos seus receptores. Modificado de Sholl-Franco e colaboradores, 2009.

O papel trófico de BDNF em modelos de degeneração no CNS é amplamente descrito na literatura tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. A

regeneração de neuritos de RGC de porcos em cultura, assim como o aumento na sobrevida desse mesmo tipo celular em roedores e gatos após axotomia também foram descritos após a injeção intravítrea desta neurotrofina (Chen e Weber, 2001; Garcia *et al.*, 2002; Nakazawa *et al.*, 2002).

As neurotrofinas exercem suas ações biológicas através da sua ligação a duas classes de receptores: a família Trk (cinase relacionada a tropomiosina), que inclui os receptores TrkA, TrkB e TrkC, e o receptor p75 de neurotrofinas (p75^{ntr}), que pertence à família de receptores do TNF. O receptor p75^{ntr} é um receptor de baixa afinidade e liga-se a todas as neurotrofinas. Já a ligação das neurotrofinas aos receptores Trk é mais específica. O NGF se liga ao receptor TrkA, o BDNF e as NT-4/5 ligam-se ao receptor TrkB, enquanto que a NT-3 se liga ao receptor TrkC (Dechant, 2001; Huang e Reichardt, 2003; Manadas *et al.*, 2007;). Classicamente, os receptores Trk foram descritos como responsáveis pelos efeitos tróficos das neurotrofinas. Por outro lado, o receptor p75^{ntr} pode exercer efeitos neurotróficos ou desencadear a PCD em diferentes tipos celulares (Dechant, 2001; Huang e Reichardt, 2003).

As neurotrofinas ligam-se aos receptores Trk promovendo sua dimerização e transfosforilação em resíduos de tirosina localizados em domínios intracelulares do receptor, o que possibilita a ancoragem de proteínas adaptadoras e a ativação de vias de sinalização intracelulares (figura 7). As principais vias descritas são as da proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), da PI3K e da fosfolipase-Cγ1 (PLCγ1) que, uma vez ativadas, podem regular a transcrição gênica (Huang e Reichardt, 2003).



Figura 7 - Principais vias de sinalização ativadas pela ligação das neurotrofinas aos seus receptores. (Reichardt, 2006).

OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel das IL-4 e IL-2 na sobrevida de RGC in vitro e in vivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- > Analisar in vitro, no modelo de degeneração de RGC induzido por axotomia:
- O papel neuroprotetor da IL-4.
- As vias de sinalização envolvidas na neuroproteção mediada por IL-4.
- O papel neuroprotetor da IL-2.
- As vias de sinalização envolvidas na neuroproteção mediada por IL-2.
- > Analisar *in vivo*, no modelo de degeneração de RGC induzido pelo ONC:
- O curso temporal da morte celular na GCL da retina.
- O papel neuroprotetor da IL-2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos (*Ratus novergicus*) da linhagem Lister Hooded. Todos os animais foram tratados segundo as normas estabelecidas pela ARVO (*Statement for the use of animals in ophtalmic and vision resarch*) e pela Comissão de Ética com Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (CEUA-CCS).

3.1 MATERIAIS

IL-4 recombinante humana (atividade específica, 5,0 x 10⁶ U/mg) e IL-2 recombinante humana (atividade específica, 2,0 x 10⁸ U/mg) foram obtidos da Peprotech (USA). Os anticorpos primários anti-fosfo-ERK1/2 e anti-BDNF foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (USA). O meio de inclusão (OCT) foi obtido da Tissue-Tek, Sakura Finetek U.S.A Inc. (USA). A poli-L-lisina (p-L-l), o PP1, o HEPES, a penicillina G, o sulfato de estreptomicina e a glutamina L foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Luis, USA). O H89 (inibidor de PKA), o PD98059 e o U0126 (inibidores de MAPK), o LY294002 (inibidor de PI3K), o inibidor tipo I de Jak (inibidor da via JAK-STAT) foram obtidos da Calbiochem (USA). A tripsina foi obtida da Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, USA). Os anticorpos secundários foram obtidos da Cell Signalling (USA). A genisteína foi obtida da RBI (Research Biochemicals Int. Natick, MA, USA). O K-252a, a brefeldina A e o cloreto de queleritrina (ChCI) foram obtidos da Biomol (PA, USA). O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e o soro fetal bovino (FCS) foram obtidos da GIBCO (BRL). As placas de Petri (35mm) foram obtidas de Corning (NY, USA). O entelan foi obtido

da Merck. Todos os outros reagentes utilizados foram obtidos a partir de fornecedores de escala analítica.

3.2 TRATAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 EXPERIMENTOS IN VITRO

O tratamento com as drogas, inibidores farmacológicos ou anticorpos bloqueadores foram iniciados 1 hora antes do início do período de incubação. As culturas foram mantidas por 2 ou 5 dias *in vitro* (DIV), a 37°C, em uma atmosfera de 5% CO_2 e 95% de ar.

3.2.1.1 CULTURA DE EXPLANTES DE RETINA

Os animais no, 2º dia pós-natal (P2), foram mortos por anestesia profunda com uma mistura éter/água (1:1). Em seguida, seus olhos foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução salina sem cálcio e magnésio (CMF), onde as retinas foram dissecadas e cortadas, com auxílio de bisturi (lâmina nº 15), em explantes de aproximadamente 1 mm² (Rehen *et al.*, 1996). Estes foram transferidos para Erlenmeyers contendo 3 mL de meio de cultura completo (DMEM; 5 % de FCS; glutamina 2mM, penicilina G 100U/mL e sulfato de estreptomicina 100µg/mL). Após um período de 4 horas, alguns explantes foram fixados para serem utilizados como controle e outros receberam meio de cultura completo com as drogas a serem testadas. A incubação foi realizada em dois períodos de tempo (2 e 5 dias). Nas culturas de 5 dias o meio foi trocado no terceiro dia. Durante o período da cultura, não houve mudanças na estrutura geral ou padrão laminar do tecido retiniano quando comparado com a retina *in situ* e analisado em cortes histológicos utilizando a marcação por vermelho neutro.

3.2.1.2 CULTURA DE MONOCAMADA DE CÉLULAS DE MÜLLER

Ratos neonatos (P0) foram sacrificados por decaptação. Em seguida, seus olhos foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução CMF, onde as retinas foram dissecadas. Os tecidos foram incubados em CMF contendo 0,05% de tripsina por aproximadamente 20 minutos, a 37°C. Após esse período foi realizada uma lavagem do tecido com meio de cultura contendo 5% de FCS para inativar a enzima. As retinas foram então dissociadas mecanicamente por inúmeras passagens através de uma pipeta Pasteur de ponta afilada. As células foram transferidas para placas de Petri plásticas (35mm) contendo lamínulas de vidro, na densidade final de 5,0 x 10⁵ células/cm² em meio de cultura completo (DMEM) com 2mM de Glutamina-L, 100µg/mL de sulfato de Streptomicina, 100U/mL de penicilina G, 20 mM de HEPES e 10 % de FCS. As culturas foram mantidas por 21-28 dias, a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar, para promover a morte neuronal e a proliferação da glia de Müller. A troca de 50% do meio de cultura foi realizada a cada três dias para a obtenção de confluência e, após este período, as culturas foram mantidas durante 2 DIV em meio controle ou em meio contendo IL-4 (5U/mL).

3.2.1.3 – MARCAÇÃO RETRÓGRADA DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA (RGC)

Como aproximadamente 40-50% das células presentes na GCL é formada por células amácrinas deslocadas (Perry *et al.*, 1983), se faz necessária a marcação específica das RGC para se determinar com exatidão o número desta população. Para tanto, foi utilizada a marcação retrógrada das RGC com o corante fluorescente rodamina dextran (DR), diluído em água esterilizada na proporção de 100mg/mL.

Considerando-se que 95% dos axônios das células ganglionares da retina de rato têm suas projeções no colículo superior contralateral (Lund, 1965) a marcação destas células pôde ser realizada através da injeção do corante nos colículos superiores. Uma vez injetado, o corante é transportado retrogradamente até os corpos das RGC, permitindo a visualização desta população específica.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais, em P0, foram anestesiados por hipotermia e, após uma incisão na pele e afastamento do tecido adjacente, sofreram uma craniotomia para exposição do tecido encefálico em desenvolvimento. Neste estágio, os colículos superiores ainda estão expostos, o que possibilita a aplicação de múltiplas injeções (seringa Hamilton 5µL), compreendendo um volume final de 2 µL aplicados bilateralmente nos colículos superiores. Após o procedimento, a craniotomia foi fechada com o tecido cartilaginoso retirado e a pele reparada com solução de éster de cianoacrilato. Os animais foram mantidos durante 48 horas, até a realização dos experimentos de cultura descritos anteriormente.

3.2.2 – EXPERIMENTOS IN VIVO

3.2.2.1 – CIRURGIA DE ESMAGAMENTO DE NERVO ÓPTICO (ONC) E INJEÇÕES INTRAOCULARES DE INTERLEUCINAS

Para este procedimento cirúrgico os animais (ratos com idade entre 21 e 28 dias) foram anestesiados com uma solução de quetamina (40mg/Kg) e xilazina (4mg/Kg) injetada intraperitonealmente. Além disso, foi utilizado o uso tópico de lidocaína (5%) na região da incisão cirúrgica. Para a exposição do ON foi realizada uma incisão de 0,5 a 1,0 cm na região peri-orbicular temporal do olho esquerdo. Os músculos extraoculares foram afastados com o auxílio de uma pinça curva e o tecido adiposo retirado para possibilitar a visualização do ON (figura 8).

O local exato a ser esmagado foi delimitado pelo uso de um pequeno anel de polietileno (1mm de comprimento) posicionado junto ao ON, próximo ao disco óptico. Assim, o esmagamento foi realizado a uma distância de aproximadamente 1mm do disco óptico. Utilizando-se uma pinça córnea previamente mergulhada em nitrogênio líquido, o ON foi pressionado 3 vezes durante cerca de 10s, sempre com a precaução de não lesar a artéria oftálmica conforme já descrito na literatura (Freeman e Grosskreutz, 2000; Zaverucha-do-Vale, 2006). A lesão pôde ser visualizada através do clareamento da região e uma redução na espessura do nervo.



Figura 8 – Visualização do nervo óptico (ON) após a retirada do tecido adiposo. A seta branca indica o ON. Barra de calibração = 1 cm.

Imediatamente após a lesão os animais receberam, no mesmo olho, a injeção intravítrea da citocina de escolha ou de PBS através de uma seringa Hamilton (5µL, 25S Gauge; figura 9). A IL-2 e o BDNF foram diluídos em PBS acrescido de corante oftálmico, o que tornou possível a visualização do líquido injetado e de seu correto espalhamento para câmara posterior. O olho direito foi utilizado como controle para quantificação de morte celular, realizada após a montagem plana do tecido e a coloração dos núcleos com o intercalante de DNA Sytox Green (500nM).

Injeção intravítrea



Figura 9 - Esquema ilustrando o método de esmagamento de nervo óptico (ONC) e da injeção intravítrea.

3.2.3 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

3.2.3.1 CRIOPRESERVAÇÃO E REALIZAÇÃO DOS CORTES DOS EXPLANTES DA RETINA

Os explantes de retina foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% (PF 4%) diluído em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,4, por 1h. Em seguida foi realizada lavagem dos mesmos em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,4 e armazenagem a 4°C. Vinte e quatro horas antes da realização dos cortes, o tecido foi imerso em solução de sacarose 30% no mesmo tampão, a fim de conferir ao tecido crioproteção, impedindo sua destruição pelo congelamento. Os explantes foram orientados transversalmente em orientadores de explantes (Rehen *et al.*, 1996), os quais já

estavam preenchidos com OCT. Posteriormente os mesmos foram congelados em nitrogênio líquido e cortados na espessura de 10μm. Os cortes obtidos foram recolhidos em lâminas previamente tratadas com p-L-I (200μg/mL), com o objetivo de facilitar a aderência dos mesmos e conservados a -20 °C até seu uso.

3.2.3.2 MONTAGEM PLANA DAS RETINAS

Os animais foram sacrificados por anestesia profunda com uma mistura de eter/água (1:1) e seus olhos retirados e fixados por imersão em PF 4% por 24 horas. Após este período as retinas foram dissecadas, livres da esclera e do epitélio pigmentado e cortadas em quatro pontos nas extremidades para facilitar a acomodação na forma plana. Cada amostra do tecido retiniano foi esticada, com o auxílio de pincéis, sobre uma lâmina embebida em PF 4% e mantida durante duas horas coberta com uma lamínula. Após esse período o material foi lavado três vezes com tampão fosfato e incubado durante 3 minutos com Sytox Green (intercalante de DNA; Sytox Green 500nM) por três minutos para a visualização dos núcleos. Após o período de incubação, as retinas foram lavadas três vezes com tampão fosfato e muma as foram lavadas três vezes com tampão fosfato e muma aumento de 1000x e fotografados digitalmente (Câmera Nikkon) em microscopia óptica convencional de fluorescência.

3.2.3.3 COLORAÇÃO COM VERMELHO NEUTRO

As lâminas contendo os cortes foram inicialmente lavadas, por 2 min, em uma solução de tampão acetato 5 %, pH 3,3. A etapa seguinte consistiu em incubar

as lâminas em solução de vermelho neutro 1% por aproximadamente 10s. Ao final desse período as lâminas foram lavadas, com o mesmo tampão inicialmente utilizado, por duas vezes. A seguir, as preparações passaram por um processo de secagem à temperatura ambiente por um dia. Para a montagem, as lâminas foram seqüencialmente incubadas em álcool absoluto, por 5 s, e em Xilol, por 5 min. As preparações foram montadas com lamínulas utilizando-se entelan como meio de montagem.

3.2.3.4 – IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunodetecção de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2), BDNF ou heparan sulfato as lâminas, ou lamínulas, foram lavadas por 3 vezes durante 5min em PBS, 0,1M, pH 7,4. As preparações foram submetidas ao tratamento com Triton 5% (menos para a imunodetecção de HS) diluído em PBS durante 1 minuto. Em seguida, os sítios de ligação não específicos foram bloqueados pela incubação com albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS (PBS-BSA 1%), por 30min. Após esse período, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policional anti-pERK1/2 (1:200), anti-BDNF (1:200) ou anti-HS (1:200) diluído em PBS-BSA 1%, a 4°C, em câmara úmida *overnight*. Após esta incubação, as preparações foram lavadas três vezes durante 5 min em PBS e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário fluorescente Alexa 488 verde (1:200), ou Alexa 555 vermelho (1:200) diluído em PBS-BSA 1%, por 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente, protegidas da luz. Ao final do período de incubação com 1µg/mL de DAPI (intercalante de DNA; cor azul), por 30 segundos, à temperatura ambiente, seguida por 3 lavagens

consecutivas de PBS. Finalmente, as lâminas foram montadas em meio de montagem para fluorescência (n-propilgalato em glicerol 80%) e conservadas a 4 °C, protegidas da luz.

Controles negativos para a reação de imunohistoquímica foram obtidos pela substituição do anticorpo primário pela incubação apenas com PBS-BSA 1%. Os cortes foram analisados (Microscópio Axiophot, Nikkon) em um aumento de 1000x e fotografados digitalmente (Câmera Nikkon) em microscopia óptica convencional de fluorescência.

3.2.4 QUANTIFICAÇÃO DA SOBREVIDA CELULAR

3.2.4.1 – EXPERIMENTOS IN VITRO

A quantificação do número total de RGC em cortes de explantes de retina foi realizada através da visualização das células marcadas retrogradamente com DR, enquanto para o número total de núcleos na GCL utilizamos a marcação com DAPI. Foram contados três campos distintos por corte, aleatoriamente selecionados e delimitados pela gratícula ocular (área de 0,01482mm), na região da GCL. O número final de células foi obtido através da razão entre o número de RGC e o número total de núcleos marcados com DAPI. Em todos os experimentos, pelo menos três explantes distintos em cada grupo foram analisados e os dados quantificados, expressos como a média ± erro padrão da média (SEM) de três ou mais experimentos independentes, especificados em cada caso nas legendas das figuras.

3.2.4.2 – EXPERIMENTOS IN VIVO

A densidade celular na GCL da região central da retina de ratos é maior do que na região periférica (Danias *et al.,* 2002). Portanto, para a quantificação das células na GCL das retinas em montagem plana, fez-se necessária a divisão da retina em duas regiões: central e periférica, a fim de tornar os dados mais confiáveis e menos variáveis. A região central foi delimitada por uma circunferência de aproximadamente 2,5mm² de diâmetro mensurados com a gratícula. A região periférica compreendeu o restante da retina (figura 10).

Pelo menos 16 campos aleatórios (área de 0,01482mm para cada campo) em cada região foram visualizados e fotografados em microscopia convencional de fluorescência (aumento de 1000X). Todos os núcleos que apresentaram a forma alongada foram excluídos da contagem pois essa é a morfologia comumente apresentada por células endoteliais. Todos os núcleos marcados com Sytox Green na GCL foram quantificados, portanto, como não realizamos a marcação retrógrada das RGC, nossas quantificações representam tanto RGC quanto células amácrinas deslocadas (Perry *et al.,* 1983). Durante as quantificações, os núcleos que apresentaram perfis picnóticos foram diferenciados dos núcleos morfologicamente normais.

3.3 APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados *in vitro* foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) de um mínimo de três experimentos realizados, pelo menos, em triplicata. A significância estatística foi inicialmente obtida pela análise de variância

em uma via (*one-way ANOVA*) e a comparação dos múltiplos grupos foi obtida pelo teste de comparação Newman–Keuls (Programa GraphPad Prism 5.00 for Windows GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores estatísticos considerados foram aqueles com valores de p inferiores a 0,05 (p<0,05).



Figura 10 - Esquema demonstrando a setorização do tecido retiniano. Montagens planas, como ilustrado na figura e no inset no canto inferior direto, foram divididas em região central x região periférica, onde campos aleatórios foram escolhidos para obtenção das fotos e posterior contagem dos núcleos marcados com Sytox Green (fotomicrografia no detalhe à direita). Barra de escala da fotomicrografia = $10\mu m$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS IN VITRO

4.1.1 A IL-4 AUMENTA A SOBREVIDA DE RGC: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS

Sholl-Franco e colaboradores (2001a) fizeram a primeira descrição de um efeito neuroprotetor da IL-4 sobre RGC axotomizadas. Neste trabalho eles mantiveram culturas mistas, em monocamada por 2 DIV. Entretanto, os mecanismos pelos quais esta citocina aumentava a sobrevida de RGC não estavam esclarecidos. Outro efeito neuroprotetor sobre células retinianas, neste caso células fotorreceptoras do tipo bastonete, foi observado para a IL-4 quando da utilização do modelo de morte celular induzida por tapsigargina em culturas de explantes retinianos de ratos em P7 (Adão-Novaes *et al.*, 2009). A fim de verificar o efeito desta citocina em RGC axotomizadas em um sistema *in vitro* que mantivesse a estrutura organotípica do tecido retiniano, realizamos culturas de explantes de retina de ratos P2, que foram submetidas ao tratamento com IL-4 (5U/mL) durante 2 e 5 dias.

As RGC marcadas com DR foram quantificadas através da observação dos cortes histológicos retinianos em microscopia de fluorescência. Como controle foi utilizado o número de RGC de retinas mantidas em cultura durante 4 horas e a esta quantidade foi atribuído o valor de 100%. Na figura 11 pode-se observar, nas culturas sem IL-4, uma redução de aproximadamente 80 e 90 % no número de células ganglionares após 2 e 5 dias *in vitro*, respectivamente, e o aumento significativo da sobrevida celular nos grupos experimentais que receberam o

tratamento com IL-4 nos dois períodos de tempo estudados (2 DIV, 90,03% \pm 6,43%; 5 DIV, 80,83%0 \pm 8,32%)



Figura 11 - O efeito da IL-4 na sobrevida das células ganglionares da retina (RGC) após 2 e 5 dias *in vitro* (DIV). Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 2 e 5 DIV na presença ou ausência de 5 U/mL de IL-4. O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados, realizados em triplicata. * = p < 0.001 em relação aos controles de 2 ou 5 DIV, respectivamente. # = p < 0.001 em relação ao controle de 2 DIV.

A fim de verificar as possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito neuroprotetor da IL-4, foi realizado o co-tratamento das culturas com IL-4 (5 U/mL) e inibidores farmacológicos específicos durante 5 dias. As figuras 12 e 13 ilustram, respectivamente, os resultados obtidos após o tratamento com 30µM de Genisteína (inibidor da atividade tirosina cinase) ou com o inibidor tipo I de JaK (5nM). O bloqueio total da ação neurotrófica da IL-4 demonstra que o efeito desta interleucina depende tanto da atividade tirosino cinase quanto da JAK.



Figura 12 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 é dependente da atividade tirosina cinase. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 dias com IL-4 (5 U/mL), genisteína (30 μ M) ou IL-4 + genisteína. O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p<0,001 vs controle.

O uso de inibidores da via da ERK (50µL PD98059 ou 20 µL U0126) também bloqueou significativamente o efeito da IL-4 (figura 14A). Entretanto, diferente dos resultados apresentados anteriormente com os inibidores da atividade JAK, bloqueio da neuroproteção cinase ou da 0 foi apenas parcial (aproximadamente 50%), embora os bloqueadores utilizados, nas concentrações indicadas, serem capazes de inibirem completamente a atividade desta via nas condições estudadas (dados do laboratório). A ativação da via das MAPK pela IL-4 é corroborada pela análise da marcação imunohistoquímica para pERK em explantes retinianos tratados com IL-4 pelo mesmo período de tempo (figura 14B-E), onde o tratamento com a IL-4 aumentou significativamente a expressão da pERK em todas as camadas da retina, destacando-se uma marcação mais intensa nas GCL, IPL, NL e OPL.



Figura 13 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 é dependente da ativação da via da JAK. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 dias com IL-4 (5 U/mL), o inibidor do tipo I para JAK (5 nM) ou IL-4 + inibidor do tipo I para JAK. O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p<0,001 vs controle.

Como demonstrado na figura 15, o bloqueio parcial da ação neuroprotetora da IL-4 também foi observado com a administração dos inibidores da PI3K (25µM LY294002) e da PKA (1µM H-89), não obstante esses agentes farmacológicos bloquearem completamente as vias citadas (dados do laboratório).

Os experimentos realizados com os inibidores das vias da Src (1µM PP1) e da PKC (1,25µM ChCl) não mostraram qualquer bloqueio do efeito neuroprotetor da IL-4 sobre as RGC, demonstrando, assim, que a ação desta citocina nas condições estudadas independe da ativação destas vias de sinalização intracelulares.



Figura 14 - O efeito neuroprotetor da IL-4 sobre as RGC *in vitro* depende parcialmente da via da ERK. (A) Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 DIV com IL-4 (5 U/mL) e/ou com inibidores de MAPK/ERK (50µL PD8059 e 20µL U0126). (B-E) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de explantes de retina corados com DAPI (B e C) ou imunorreagidos para pERK (D e E). B e D, explantes controles; C e E, explantes tratados com IL-4 por 5DIV. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 4 experimentos isolados realizados em triplicata.* = p < 0.001 em relação ao controle de 5 DIV. # = p < 0.01 em relação ao tratamento com IL-4. Barra de calibração = 20µm. onl, camada nuclear externa; opl, camada plexiforme externa; nl, camada neuroblástica; ipl, camada plexiforme interna; gcl, camada de células ganglionares.



Figura 15 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende parcialmente das vias da PI3K e da PKA, mas independe das vias da Src e da PKC. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 DIV com IL-4 (5 U/mL) e/ou com os inibidores da Src (1 μ M PP1), PI3K (25 μ M LY294002), PKA (1 μ M H-89) ou PKC (1,25 μ M ChCl). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p < 0.001 em relação ao controle de 5 DIV.# = p < 0.01 em relação ao tratamento com IL-4.

4.1.2 O EFEITO DA IL-4 É INDIRETO, ATRAVÉS DA LIBERAÇÃO DE FATORES TRÓFICOS

O efeito neuroprotetor da IL-4 através da produção de fatores tróficos por células gliais é descrito na literatura em outros modelos de morte celular no CNS (Brodie e Goldreich, 1994; Park *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Para verificar se esse mesmo padrão era reproduzido em nosso modelo, ou seja, se o efeito

neurotrófico observado para a IL-4 na população de RGC em explantes de retina seria mediado pela liberação de fatores tróficos por células gliais, realizamos o cotratamento das culturas com IL-4 (5U/mL) e brefeldina A (BFA; 30ng/mL), uma droga inibidora do transporte vesicular entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Fujiwara *et al.,* 1988). Como demonstrado na figura 16, o efeito da IL-4 foi totalmente bloqueado pela BFA, indicando ser indireta a neuroproteção mediada por esta citocina, uma vez que depende da liberação de peptídeos, o que sugere o envolvimento de fatores tróficos.

A ação neurotrófica do BDNF tanto em células da retina como em outras áreas do CNS tem sido amplamente descrita na literatura (Chen e Weber, 2001; Nakazawa, 2002; Fan *et al.*, 2006). Após confirmar o efeito indireto da IL-4 e, a fim de investigar a possível participação do BDNF no aumento da sobrevida das RGC induzido pela IL-4 em nosso modelo, realizamos o pré-tratamento dos explantes com K252a (50nM), um inibidor específico de receptores Trk ou com um anticorpo de bloqueio anti-BDNF (100µM), antes de mantermos os explantes na presença da IL-4. Tanto a inibição do receptor quanto do próprio BDNF bloquearam totalmente o efeito da IL-4, sugerindo que o mesmo seja mediado pela presença de BDNF e sua ligação aos receptores Trk. Além disso, observamos uma diminuição de aproximadamente 50% no número de RGC quando do tratamento apenas com o anticorpo anti-BDNF ou do bloqueio dos receptores Trk, sugerindo um papel para o BDNF liberado na cultura na manutenção das RGC na situação controle.



Figura 16- A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende da liberação de peptídeos. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidas por 5 DIV com IL-4 (5 U/mL) e/ou brefeldina A (BFA; 30 ng/mL). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 4 experimentos isolados realizados em triplicata. * p<0,001 vs controle de 5 DIV.


Figura 17 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-4 depende da ativação de receptores Trk e da presença de BDNF na cultura. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidas por 5 DIV com IL-4 (5 U/mL) e/ou K252a (5 nM) e/ou anticorpos anti-BDNF (100 μ M). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * p<0,001 vs controle de 5 DIV.

Com o intuito de verificar se a glia de Müller poderia estar envolvida na liberação de BDNF quando da adição de IL-4 às culturas, realizamos culturas primárias em monocamada deste tipo celular. As culturas foram submetidas ao tratamento com a IL-4 (5 U/mL) durante 2 dias e a expressão de BDNF analisada por imunohistoquímica. Os resultados presentes na figura 18 mostram um aumento significativo na expressão de BDNF após a administração da IL-4. Esses dados sugerem que o tratamento com esta citocina estimula a produção de BDNF pela glia

de Muller. Uma vez secretada, esta neurotrofina, seria a responsável direta pelo aumento na sobrevida das RGCs através da ativação dos receptores Trk.



Figura 18 – A IL-4 induz a expressão de BDNF em células de Müller *in vitro.* Fotomicrografias de células de Muller em cultura de monocamada mantidas por 2 dias na situação controle (A, C e E) ou estimuladas por 5 U/mL de IL-4 (B, D e F). A e B: núcleos marcados com DAPI; C e D: imunohistoquímica para BDNF; E e F representam a sobreposição de A+C e B+D, respectivamente. Barra de calibração = $10\mu m$.

4.1.3 IL-2 AUMENTA A SOBREVIDA DE RGC: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS.

Após caracterizar a neuroproteção das RGC *in vitro* pela administração da IL4 buscamos analisar e comparar o potencial neurotrófico da IL-2 utilizando para tanto o mesmo modelo in vitro utilizado para a IL-4. Apesar de Sholl-Franco e colaboradores (2001a) terem mostrado a neuroproteção de RGC mantidas em monocamada pela IL-2, até o presente momento não se sabia se este efeito seria mantido em modelos mais complexos de cultura, ou mesmo quais seriam os mecanismos relacionados a esse efeito neuroprotetor. Assim, explantes retinianos de ratos (P2) foram tratados com IL-2 (50 U/mL) durante 2 e 5 DIV e as RGC marcadas com DR quantificadas nos cortes. Podemos observar, na figura 19, que o tratamento com a IL-2 aumentou significativamente a sobrevida das RGC após 2 DIV ($85.43\% \pm 5.43\%$). Após 5 DIV este efeito neuroprotetor também foi significativo, mas não mantido na mesma proporção do efeito em 2 DIV (5 DIV, $50.23\% \pm 5.32\%$).

Após verificarmos o efeito neuroprotetor da IL-2 fomos em busca da caracterização farmacológica das possíveis vias de sinalização envolvidas. A atividade tirosina cinase na cultura foi bloqueada com 30 µM de Genisteína, enquanto que a atividade das JAK foi bloqueada com o inibidor do tipo I para JAK (5 nM). A figura 20 mostra que a ação da IL-2 foi totalmente bloqueada pela genisteína, indicando a dependência desta via de sinalização. O mesmo pôde ser observado quando do co-tratamento dos explantes com IL-2 e o inibidor da JAK (figura 21), visto que o inibidor utilizado reverteu completamente a neuroproteção mediada pela citocina.



Figura 19 - O efeito da IL-2 na sobrevida das RGC após 2 e 5 DIV. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 2 e 5 DIV na presença ou ausência de 50 U/mL de IL-2. O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados, realizados em triplicata. * = p < 0.001 em relação aos controles de 2 ou 5 DIV, respectivamente. # = p < 0.001 em relação ao controle de 2 DIV.

O envolvimento da via da ERK no efeito da IL-2 foi examinado em explantes de retina tratados durante 5 DIV com 50 U/mL de IL-2 na presença ou ausência de PD98059 (50 μM) ou de U0126 (20 μM), inibidores farmacológicos da via de sinalização da MAPK/ERK (figura 22). Nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos explantes com os inibidores, seguido pelo co-tratamento com a IL-2, bloqueou completamente a ação neuroprotetora desta citocina sobre a população de RGC, demonstrando, assim, o envolvimento desta via neste modelo de neuroproteção. A marcação imunohistoquímica para pERK (figura 22B-E) em explantes tratados por 5 DIV com a IL-2 mostra que esta citocina aumenta de maneira clara e ampla a expressão da pERK em todas as camadas celulares e

plexiformes da retina, com destaque para uma marcação intensa na GCL e na borda mais interna do explante. Assim, nossos dados sugerem que a IL-2 seja capaz de estimular (direta ou indiretamente) a atividade da via da ERK e que esta via seja essencial para a IL-2 proteger as RGC do processo degenerativo.



Figura 20 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é dependente da atividade tirosina cinase. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 dias com IL-2 (50 U/mL), genisteína (30 μ M) ou IL-2 + genisteína. O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p<0,001 vs controle

Após constatar que o efeito a IL-2 era mediado pela via da ERK a participação de outras vias de sinalização também foram investigadas. Os resultados obtidos com os inibidores da PI3K (25 μM LY294002) e da Src (1 μM PP1) demonstram que essas vias não estão relacionadas com o aumento da sobrevida das RGC mediada pela IL-2 (figura 23). Resultados semelhantes foram

obtidos com o co-tratamento dos explantes com IL-2 (50 U/mL) e inibidores da PKA (1 μM H-89) ou da PKC (1,25 μM ChCl), como pode ser observado na figura 24. Portanto, nossos resultados sugerem que a neuroproteção mediada pela IL-2 seja independente da ativação dessas vias de sinalização.

Além disso, o tratamento das culturas com IL-2 e BFA (30 ng/mL) ou K252a (5 nM) também não inibiu o efeito neuroprotetor desta citocina (figura 25), o que indica ser o mesmo direto e independente da liberação de peptídeos (*e.g.* fatores tróficos) ou da ativação de receptores Trk.











Vale ressaltar que o uso da BFA ou do K252a diminuiu também a sobrevida das RGC em relação ao controle após 5 DIV em cerca de 50%, demonstrando que na situação controle o bloqueio da liberação de fatores tróficos também interfere na manutenção desta população celular. No entanto, o efeito da IL-2 não apresentou redução significativa quando do tratamento com essas drogas.



Figura 23 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente das vias da Src e da PI3K. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 DIV com IL-2 (50 U/mL) e/ou com os inibidores da Src (1µM PP1) ou PI3K (25µM LY294002). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p < 0.001 em relação ao controle de 5 DIV.



Figura 24 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente das vias da PKC e da PKA. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidos por 5 DIV com IL-2 (50 U/mL) e/ou com os inibidores da PKC (1,25 μ M ChCl) ou PKA (1 μ M H-89). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * = p < 0.001 em relação ao controle de 5 DIV.

Considerando que o efeito neuroprotetor da IL-2 não depende da liberação, pelo tecido retiniano, de peptídeos na cultura, ao contrário do observado para a ação da IL-4 (figuras 16, 17 e 18), averiguamos se esta citocina poderia estar interagindo com moléculas da ECM. Dentre as moléculas da ECM, os proteoglicanos que possuem condroitin sulfato (CSPG) ou heparan sulfato (HSPG) são os mais predominantes no tecido retiniano (Inatani e Tanihara, 2002 para revisão). A interação da IL-2 com diferentes HSPG é descrita na literatura (Najjam *et al.,* 1997),

sendo os proteoglicanos que possuem HS reconhecidamente permissivos à regeneração no NS (Nagy e Reh, 1994). Assim, fomos averiguar se a IL-2 poderia estar modulando a expressão da HS na retina e, deste modo, aumentando a sobrevida das RGC. Através de análises imunohistoquímicas, nossos resultados mostram que a expressão de HS é aumentada em todas as camadas celulares da retina (ONL, NL e GCL) quando do tratamento dos explantes de retina P2 com a IL-2 por 5 DIV (figura 26A-D). Um resultado interessante foi obtido quando do pré-tratamento das culturas com heparitinase, uma enzima capaz de retirar os resíduos de HS, e posterior incubação com a IL-2. Nestes experimentos constatamos que a IL-2 não apresentava mais a sua ação neuroprotetora sobre a população de RGC, o que demonstrou a necessidade da presença inicial desde glicosaminoglicano para que a IL-2 pudesse efetivar sua ação neste tipo celular (figura 26E). Experimentos em paralelo foram realizados para se verificar a expressão de CS. Entretanto, nenhuma alteração foi encontrada na expressão deste outro componente da ECM.



Figura 25 - A sobrevida das RGC induzida pela IL-2 é independente da liberação de peptídeos ou da ativação de receptores Trk. Explantes da retina de ratos P2 foram mantidas por 5 DIV com IL-2 (5 U/mL) e/ou Brefeldina (BFA; 30 ng/mL) ou K252a (5 nM). O número de RGC obtido após 4 horas corresponde a 100% do controle. Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em triplicata. * p<0,001 vs controle de 5 DIV.







Figura 26 - A IL-2 aumenta a expressão de heparan sulfato na retina préе Ο tratamento com heparitinase bloqueia 0 seu efeito neuroprotetor. Fotomicrografias de cortes de explantes da retina de ratos P2 mantidos por 5 DIV na situação controle (A e C) ou tratados com 50 U/mL de IL-2 (B e D). Cortes corados com

DAPI (A e B) ou imunorreagidos para heparan sulfato (C e D). E, explantes da retina de ratos P2 foram pré-tratados com heparitinase (10 mU) e mantidos por 5 DIV com IL-2 (50 U/mL). Os dados foram expressos como média \pm SEM de 3 experimentos isolados realizados em quadruplicada. * = p < 0.001 em relação ao controle de 5 DIV. Barra de calibração = 20µm. onl, camada nuclear externa; opl, camada plexiforme externa; nl, camada neuroblástica; ipl, camada plexiforme interna; gcl, camada de células ganglionares.

4.2 EXPERIMENTOS IN VIVO

4.2.1 O MODELO DE ESMAGAMENTO DE NERVO ÓPTICO (ONC) CAUSA MORTE CELULAR NA CAMADA DE CÉLULAS GANGLIONARES

Os resultados obtidos com os experimentos *in vitro* estimularam a busca por um modelo *in vivo* a fim de expandir o estudo sobre a ação das citocinas na sobrevida de RGC, com particular ênfase para a ação neuroprotetora da IL-2, ainda não descrita *in vivo* para esta população celular. Optamos pelo método de ONC, descrito na literatura em estudos de degeneração retrógrada das RGC (Kreutz *et al.*, 1999; Freeman e Grosskreutz., 2000; Zaverucha-do-Valle, 2006). Desta forma, nosso primeiro passo foi o de estabelecer o grau de eficiência da técnica de ONC utilizada neste estudo, comparando-o com os dados obtidos com o uso da mesma técnica por Zaverucha-do-Valle (2006). De modo a estabelecer o melhor período de estudo, realizamos, a princípio, um curso temporal da sobrevida de células na GCL após o ONC. As lesões foram realizadas no olho esquerdo (OE) e o olho direito (OD) foi sempre utilizado como um controle interno.

É importante ressaltar que os resultados apresentados nesta seção da dissertação são preliminares e representam a busca pela transposição de dados bem fundamentados sobre a ação da IL-2 na sobrevida de RGC *in vitro* para um modelo *in vivo* de estudo. Nesta primeira etapa, realizamos a quantificação do número total de células na GCL, uma vez que não utilizamos ainda um marcador retrógrado para as RGC. Na figura 27 podemos observar a redução progressiva do número de células na GCL do OE após o ONC (figura 27B, D, F e H), e a presença de núcleos com perfis picnóticos no 5º e no 7º dias após a lesão (setas presentes na

figura 27D e F), indicando ser a degeneração das RGC, pelo menos em parte do tipo PCD.



Figura 27 - Fotomicrografia do curso temporal da sobrevida de células na camada de células ganglionares (GCL) da retina após o esmagamento do nervo óptico (ONC). Fotomicrografias foram obtidas com o foco ajustado no plano focal da GCL, de campos representativos de localização central de montagens planas das retinas de ratos P21-28 submetidos ao ONC e mantidos vivos por 1 (A e B), 5 (C e D), 7 (E e F) e 14 (G e H) dias. A, C, E e G ilustram os controles internos, obtidos dos olhos não operados (OD). B, D, F e H ilustram a perda progressiva de células na GCL presente nas montagens planas realizadas a partir das retinas de olhos submetidos ao ONC (OE). Perfis picnóticos estão indicados por setas. Núcleos marcados com Sytox Green. Barra de calibração = $10\mu m$.

A figura 28 ilustra os dados referentes à diminuição no número de núcleos marcados na GCL (figura 28A) e ao aumento no número de perfis picnóticos (figura 28B) obtidos a partir de animais submetidos ao ONC e analisados após 1 (n=2), 3 (n=4), 4 (n=4), 5 (n=4); 7 (n=2) e 14 (n=2) dias de sobrevida. Os valores expressos nestes gráficos expressam a média obtida a partir da quantificação de campos aleatórios provenientes de todas as áreas da retina. Esses dados mostram claramente uma redução significativa do número total núcleos na GCL das retinas provenientes do OE, submetido ao ONC, o que reflete a diminuição progressiva e acentuada do número de células nesta camada. Fica evidente a existência de uma janela temporal para a perda celular na GCL (figura 28A). Embora estes dados não tenham sido ainda submetidos a testes estatísticos, devido ao baixo número de amostras, é possível determinarmos o período entre o 3º e o 5º dias após o ONC como sendo o de maior perda de núcleos (células)na GCL. A partir deste período a diminuição no número total de células na GCL é mais lenta (7º e 14º dias).

Um padrão complementar ao da diminuição do número de núcleos na GCL pode ser observado quando analisamos o aumento no número de perfis picnóticos presentes nas retinas do olho ipsilateral à lesão (figura 28B). Entretanto, devemos destacar aqui a presença de um discreto aumento (que ainda não podemos afirmar ser significativo) no número de perfis picnóticos encontrados nas retinas provenientes do controle interno (OD), cujo padrão temporal do aumento de perfis picnóticos parece ser um pouco mais lento do que aquele observado para o olho contralateral (OE).



Figura 28 - Curso temporal da sobrevida de células na GCL (A) e do número de perfis picnóticos (B) após o ONC. Quantificação baseada em fotomicrografias, com o foco ajustado no plano focal da GCL, das montagens planas de retinas de ratos P21-28 submetidos ao ONC e mantidos vivos por 1 (n=2), 3 (n=4), 4 (n=4), 5 (n=4); 7 (n=2) e 14 (n=2) dias. O gráfico A representa inclusive o número de perfis picnóticos. Os controles internos foram obtidos pela quantificação nas retinas provenientes de olhos não operados (olho direito). Os dados foram expressos como média \pm SEM.

Α

В

A densidade das RGC não é homogênea ao longo de todo o tecido retiniano, já tendo sido demonstrado que esta é maior na região central da retina, em comparação com as porções mais periféricas deste tecido (Danias *et al.*, 2002). Desta forma, optamos por dividir nossas análises de modo a que elas expressassem os dados referentes às porções central ou periférica da retina, como pode ser constatado na figura 29. O mesmo padrão temporal da diminuição no número de núcleos presentes na GCL ou do número de perfis picnóticos pode ser observado, quando da realização desta nova análise. Entretanto, fica evidente a diferença no número absoluto de núcleos quantificados na GCL (cerca de 1.000 a mais na retina central), assim como a tendência para uma diminuição maior no número de núcleos na GCL de retina periférica a partir do 7º dia. Outrossim, não se pode afirmar que haja alguma alteração significativa no padrão de distribuição temporal ou do número total de perfis picnóticos, o que pode indicar uma maior porcentagem destes para a retina periférica.

4.2.2 A IL-2 AUMENTA A SOBREVIDA CELULAR NO MODELO DE ONC

Após estabelecer no laboratório de neurogênese a técnica de ONC como um modelo de degeneração de RGC *in vivo*, decidimos avaliar o potencial neuroprotetor da IL-2 através da administração deste fator via injeção intravítrea.

Escolhemos o período de 5 dias de sobrevida dos animais após o ONC, uma vez que ao final deste tempo constatamos uma perda celular significativa na GCL (cerca de 40%; figuras 27, 28 e 29). Outro fator que influenciou essa escolha foi o de termos optado por uma administração única da citocina, a fim de se evitar, nestes experimentos iniciais uma possível interferência causada por lesões teciduais resultantes da manipulação excessiva do tecido ocular. Desta forma, a injeção intravítrea se deu sempre após o procedimento cirúrgico para o ONC, sem necessidade de se re-anestesiar o animal.

Primeiramente, testamos a eficiência da injeção intravítrea como veículo de administração de citocinas em nosso modelo, utilizando como controle positivo o BDNF. Assim, 2,5 µL de BDNF (1 µg/µL) foram administrados intravitreamente, como descrito previamente por Pernet e Di Pólo (2006). Nossos resultados preliminares (n = 1), presentes na figura 30, mostram a quantificação do número de núcleos presentes na GCL e de perfis picnóticos, nas regiões central e periférica das retinas expostas ou não ao BDNF. Nossos dados indicam um bloqueio completo da diminuição no número de núcleos na GCL quando do tratamento com BDNF. Apesar de ainda não ter sido realizada qualquer analise estatística, é marcante a diferença no número de núcleos quantificados na GCL entre os animais que sofreram apenas o ONC e aqueles que também foram tratados com a neurotrofina. Houve um aumento de cerca de 100% no número de núcleos da GCL (figura 30A e B). Entretanto, mesmo com esse aumento no número total de núcleos na GCL, ainda encontramos uma quantidade expressiva de perfis picnóticos, muito semelhante àquela quantificada na situação controle (figura 30C e D).

CENTRO

PERIFERIA



Figura 29 - Curso temporal da sobrevida de células na GCL e do número de perfis picnóticos após o ONC nas regiões central e periférica da retina. Quantificação baseada em fotomicrografias, com o foco ajustado no plano focal da GCL, de montagens planas das retinas de ratos P21-28 submetidos ao ONC e mantidos vivos por 1 (n=2), 3 (n=4), 4 (n=4), 5 (n=4); 7 (n=2) e 14 (n=2) dias. A e C, retina central. B e D, retina periférica. A e B expressam o número total de núcleos na GCL. C e D expressam o número de núcleos apresentando perfis picnóticos. Os controles internos foram obtidos pela quantificação nas retinas provenientes de olhos não operados (olho direito). Os dados foram expressos como média ± SEM.



Figura 30 - A administração intravítrea de BDNF aumenta a sobrevida de células na GCL 5 dias após ONC.. Quantificação baseada em fotomicrografias, com o foco ajustado no plano focal da GCL, de montagens planas das retinas de ratos P21-28 submetidos ao ONC e mantidos vivos por 5 dias. A e C, retina central. B e D, retina periférica. A e B expressam o número total de núcleos na GCL. C e D expressam o número de núcleos apresentando perfis picnóticos. Os controles internos foram obtidos pela quantificação nas retinas provenientes de olhos não operados (olho direito). Os animais não injetados foram submetidos apenas ao ONC (n = 4) e os injetados receberam também a injeção intravítrea de BDNF (1µg/µL; n = 1) no olho esquerdo. Os dados foram expressos como média \pm SEM para os dados referentes aos animais não injetados intravitreamente.

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito da administração intravítrea da IL-2 na sobrevida de RGC. Após os primeiros resultados obtidos com o controle positivo (BNDF), iniciamos os experimentos com a IL-2. Utilizamos uma concentração inicial de 2.500 U/µL em injeções intravítreas únicas com um volume final administrado de 2,5 µL. A escolha desta concentração para a IL-2 foi baseada na relação existente entre as concentrações de BDNF utilizadas *in vitro* (20 ng/mL) e *in vivo* (1µg/µL). A figura 31 ilustra nossos resultados preliminares, onde o tratamento com a IL-2 (n=2) aumentou significativamente (cerca de 50%) o número total de núcleos na GCL, tanto na região central quanto na região periférica da retina, demonstrando um efeito neuroprotetor sobre células da GCL no modelo de degeneração de RGC *in vivo*. É importante ressaltar que o aumento no número total de núcleos obtido pelo tratamento *in vivo* (figura 31) com esta citocina está muito próximo dos valores obtidos nos experimentos in vitro (figura 19), lembrando que avaliamos o resultado da administração única de apenas uma concentração da IL-2.

Nossos resultados mostram ainda que apesar do tratamento *in vivo* com a IL-2 aumentar o número total de núcleos na GCL, o número de perfis picnóticos também apresentou um aumento, podendo indicar que a IL-2 pode estar retardando o processo de morte, o que seria representado por este aumento na quantidade de perfis picnóticos.





injetados receberam também a injeção intravítrea de IL-2 (2.500 U/µL; n = 2) no olho esquerdo. Os dados foram expressos como média ± SEM.

5 DISCUSSÃO

Um número crescente de estudos tem abordado o papel de diferentes interleucinas durante o desenvolvimento, plasticidade e patologias do SN (Hanisch e Quirion, 1996; Jankowsky e Patterson, 2001; John *et al.*, 2003; Gibson et al., 2004; Lucas *et al.*, 2006; Camacho-Arroyo *et al.*, 2009; Sholl-Franco *et al.*, 2009 para revisão). Além disso, nos últimos anos vários modelos *in vitro* e *in vivo* de neurodegeneração tem sido usados para se estudar o potencial terapêutico de citocinas e, em particular das interleucinas (Broberg *et al.*, 2004; Martino *et al.*, 2000; Cafferty *et al.*, 2004; Hakkoum *et al.*, 2007; Adão-Novaes *et al*, 2009), onde podemos destacar aqueles referentes à degeneração das RGC (Mendonça-Torres e Araújo, 2001; Sholl-Franco et al., 2001a; Boyd *et al.*, 2003; Koeberle *et al.*, 2004).

A sobrevida de diferentes populações neuronais mediada pela IL-4 já foi demonstrada tanto pela administração exógena (Sholl-Franco *et al.*, 2001a; Koeberle *et al.*, 2004; Adão-Novaes *et al.*, 2009) quanto pela expressão endógena induzida (Koeberle *et al.*, 2004) ou constitutiva (Park *et al.*, 2005) desta citocina. Utilizando um modelo de neuroinflamação provocado por injeções intracorticais de LPS, Park e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão da IL-4 pela microglia ativada diminui a perda de neurônios corticais através da modulação da resposta inflamatória em ratos. Quando as injeções de LPS foram acompanhadas de anticorpos neutralizantes para IL-4, a expressão de mediadores de toxicidade (*eg.* iNOS, TNF- α) foi aumentada e, conseqüentemente, a morte neuronal foi mais significativa. Neste trabalho, sugeriu-se que a IL-4, através da indução da morte da microglia ativada, reduziria a secreção de mediadores de toxicidade, aumentando a sobrevida neuronal.

Durante a preparação dos modelos in vitro (e.g. células dissociadas ou explantes retinianos), o axônio das RGC é seccionado, resultando em degeneração retrógrada por mecanismos de PCD, o que torna essa população celular uma excelente ferramenta para testar o potencial neurotrófico destas moléculas. Os dados apresentados nesta dissertação demonstram que o tratamento com IL-4 bloqueia a morte de RGC axotomizadas em explantes de tecido retiniano mantidos por 2 ou 5 DIV, os quais mantêm o padrão histológico do tecido e permitem a manutenção e o desenvolvimento de padrões específicos de interações célula-célula e célula-ECM (Seigel, 1999; Johansson et al., 2000; Erlich et al., 2003), diretamente envolvidos com a regulação da proliferação e diferenciação celular mediada por moléculas solúveis sinalizadoras, como as citocinas. Em 2001, Sholl-Franco e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, o potencial neuroprotetor da IL-4 sobre RGC axotomizadas, proveniente de ratos P0 e mantidas em cultura de monocamada por 48 horas. Foi demonstrado que esse efeito era apenas dependente da proliferação celular (e.g. de precursores retinianos ou células gliais) e da ativação de receptores muscarínicos (Sholl-Franco et al., 2001a). A ativação dos receptores muscarínicos poderia ser o mecanismo responsável pela liberação de fatores tróficos capazes de aumentar a sobrevida das RGC, uma vez que a IL-4 também aumenta a diferenciação colinérgica neste mesmo modelo de cultura (Sholl-Franco et al., 2001b), mas ainda não estavam claros quais fatores tróficos, tipos celulares ou vias de sinalização estariam envolvidos neste fenômeno.

A IL-4 exerce seus efeitos biológicos através da ligação a receptores diméricos, do tipo I ou do tipo II, que têm em comum a presença da subunidade IL4Rα. A ativação do receptor resulta na mudança conformacional alostérica dos complexos, que leva a fosforilação da cauda citoplasmática dos mesmos após o

recrutamento de proteínas cinase da família JAK (JAK 1, JAK 2, JAK 3 e TYK2) e pelo acoplamento de proteínas acessórias, capazes de recrutar outras vias de sinalização (Nelms, 1999; Kelly-Welch et al., 2003; Wills-Karp e Finkelman, 2008), como as mediadas por MAPK, PKB, PKA e PKC (figura 6). Nossos resultados mostraram que o efeito da IL-4, como esperado, depende completamente da ativação de proteínas tirosina cinases e da JAK. Outrossim, ao utilizarmos inibidores farmacológicos das vias da ERK, PI3K e PKA obtivemos um blogueio parcial do efeito neuroprotetor da IL-4. Este resultado pode estar relacionado ao efeito indireto desta interleucina via liberação de fatores na cultura. Além disso, as análises imunohistoquímicas para pERK revelaram um aspecto radial na marcação, o que sugere que a ativação da via da ERK pode estar ocorrendo na glia de Müller, uma vez que, na retina, este padrão morfológico é típico deste tipo celular (Newman e Reichenbach, 1996). Entretanto, não podemos descartar o envolvimento destas vias de sinalização como resultado direto da ativação do receptor para IL-4 em outros tipos celulares retinianos, uma vez que o recrutamento destas outras vias de sinalização já foi descrito em outros tecidos (Mckay et al., 2000; Gálea et al., 1993).

Em nossos resultados observamos ainda que a inibição da PKA bloqueou parcialmente o efeito neuroprotetor da IL-4. Entretanto, não podemos afirmar qual tipo celular presente no tecido estaria aumentando os níveis de cAMP e ativando a via da PKA, visto que Adão-Novaes e colaboradores (2009) demonstraram que a IL-4 bloqueia a morte de fotorreceptores induzida por tapsigargina *in vitro* através do aumento nos níveis de cAMP e da ativação da PKA. Vale ressaltar que a presença da subunidade IL4Rα do receptor da IL-4 já foi descrita em todas camadas da retina de ratos P7 (Adão-Novaes *et al.*, 2009) e em camundongo nos estágios iniciais do seu desenvolvimento pós-natal (da-Silva *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos com o co-tratamento dos explantes com BFA mostram que o bloqueio do transporte vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (Fujiwara et al., 1988) reverteu totalmente o efeito neuroprotetor da IL-4, indicando que o mesmo depende da liberação de peptídeos. Realmente, a ação da IL-4 na liberação de moléculas tróficas in vitro já foi descrita em diferentes tipos celulares (Araújo e Cottman, 1993; Brodie, 1996; Brodie et al., 1998; Zhao et al., 2006). Araújo e Cottman (1993) demonstraram que o tratamento com IL-4 de culturas mistas de hipocampo aumenta a proliferação e a expressão de fatores tróficos por células gliais, contribuindo significativamente para a sobrevida dos neurônios hipocampais, o que está de acordo com os resultados de Brodie e Goldreich (1994) que mostraram a regulação da proliferação astrocitária por IL-4. Além disso, outros trabalhos deste mesmo grupo mostraram ser a IL-4 responsável pela expressão e secreção de NGF por astrócitos corticais mantidos in vitro (Brodie, 1996; Brodie et al., 1998). Além disso, recentemente, Zhao e colaboradores (2006) mostraram que a IL-4 regula a produção e liberação de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina 1) pela microglia. Nossos resultados demonstram que a IL-4 induz seu efeito neuroprotetor de modo dependente da ativação de receptores Trk e da presença de BDNF na cultura.

Considerando que o efeito da IL-4 em nosso modelo seja indireto, podemos sugerir que esta interleucina, através da ativação de receptores na glia de Müller, aumentaria a expressão de BDNF na retina, que seria o responsável direto pelo aumento na sobrevida observado. No tecido retiniano mantido *in vitro*, a secreção de BDNF pela glia de Müller, principal tipo glial da retina, reforça a hipótese de que este tipo celular é uma fonte endógena deste fator (Seki, 2005) e nossos resultados *in vitro* mostraram que a IL-4 aumenta significativamente a expressão deste fator

neurotrófico. Além disso, no modelo de células dissociadas, as RGC apresentam aumento da sobrevida e da neuritogênese quando mantidas em meio condicionado obtido da glia de Müller (Garcia *et al.,* 2002).

Além da glia de Müller, outros tipos celulares retinianos expressam tanto o BDNF quanto o seu receptor (Ugolini *et al.,* 1995; Vecino e Caminos, 1998; Vecino *et al.,* 2002). Desta forma, não podemos descartar a hipótese de que as próprias RGC ou células amácrinas teriam a expressão endógena de BDNF aumentada em resposta à administração de IL-4 *in vitro,* contribuindo para os níveis elevados desta neurotrofina em nosso modelo.

Diversas populações neuronais têm a sobrevida aumentada quando da administração do BDNF (Ma *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2005; Hennigan *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2008), sendo as ações biológicas desta neurotrofina mediadas pela ativação do receptor p75^{ntr} e TrkB (Reichardt, 2006 para revisão). Quando ativados, os receptores Trk se autofosforilam em resíduos específicos de tirosina presentes nas porções citoplasmáticas do receptor, levando ao recrutamento e à ativação de diferentes proteínas adaptadoras e sinalizadoras, como por exemplo a proteína Ras, o que pode resultar dentre outras coisas na ativação da ERK e/ou da PI3K e subseqüente fosforilação da PKB, vias classicamente relacionadas à sobrevida e proliferação celular (Huang e Reichardt, 2003; Manadas *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram o envolvimento parcial das vias da ERK e da PI3K no efeito neuroprotetor da IL-4. Entretanto, como a IL-4 está exercendo seu efeito de modo dependente da presença de BDNF e da ativação de receptores Trk, o recrutamento destas vias de sinalização pode ser o resultado da ativação do BDNF e não necessariamente da própria IL-4. Estas mesmas vias já foram

relacionadas ao efeito neurotrófico do BDNF sobre células hipocampais submetidas a excitotoxicidade por glutamato *in vitro* (Almeida *et al.*, 2005). Em um modelo *in vivo* de degeneração *de* RGC por axotomia, a redução da morte neuronal após a injeção intravítrea desta neurotrofina também se mostrou dependente destas vias de sinalização (Nakazawa *et al.*, 2002). É importante salientarmos aqui que ao utilizarmos a BFA, o K252a e o anticorpo de bloqueio para o BDNF verificamos uma diminuição significativa na sobrevida das RGC nos explantes controle, o que poderia estar relacionada a um efeito de fatores tróficos endógenos sobre as RGC, que podem estar em baixas concentrações, mas que já mostraram serem eficientes em aumentar a sobrevida de RGC *in vitro* (Araújo e Linden, 1993; Ary-Pires *et al.*, 1997). Aqui, neste trabalho, estamos enfatizando o potencial do BDNF como mediador intermediário do efeito neuroprotetor da IL-4 sobre a população de RGC, uma vez que a expressão desta neurotrofina e de seu receptor já foi descrita na retina de ratos, inclusive na GCL e INL (Ugolini *et al.*, 1995; Vecino e Caminos, 1998; Vecino *et al.*, 2002).

A IL-2, assim como a IL-4, é uma citocina neuroregulatória com diversas funções descritas no CNS, como, por exemplo, na regulação da atividade neuronal (Hanisch e Quirion, 1996; Ye *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 1989), crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevida celular (Hanisch e Quirion, 1996; Sarder *et al.*, 1993; Awatsuji *et al.*, 1993; Araujo e Cottman, 1995; Sarder *et al.*, 1996; Sholl-Franco *et al.*, 2001a, 2001b, 2002).

Na retina de ratos, a IL-2 aumenta a sobrevida de RGC mantidas em culturas mistas por 2DIV, de maneira dose-dependente (Sholl-Franco *et al.,* 2001a). Os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que após 2 ou 5 DIV a IL-2 aumentou a sobrevida das RGC axotomizadas, no modelo de explantes

retinianos, em 85.43% \pm 5.43% (2DIV) e 50.23% \pm 5.32% (5DIV). Estes dados ampliam aqueles descritos por Sholl-Franco e colaboradores (2001a), uma vez que agora estamos lidando com um modelo de cultura que procura manter a estrutura tecidual, assim como a integridade das interações célula-célula e célula-ECM do tecido retiniano (Rehen *et al.*, 1996, Seigel, 1999). Além disso, pudemos manter o tecido por mais tempo permitindo uma análise temporal do efeito neuroprotetor da IL-2.

As diferentes subunidades do IL-2R podem ser compartilhadas por outros receptores para citocinas, o que pode levar a redundância, antagonismo ou sinergismo de efeitos biológicos (Ellery e Nicholls, 2002 para revisão), exceto no que se refere a subunidade IL-2Ra, dita como específica para a IL-2 (Ihle, 1995; Liu et al., 1996; Lin e Leonard, 1997). A produção e secreção de IL-2 e a ação desta molécula sobre seus receptores já foi descrita em astrócitos e oligodendrócitos (Araujo e Cotman, 1995; Chakraborty et al., 2003). Além disso, a expressão da IL-2 e do IL-2Rα em células gliais do bulbo olfatório de ratos também já foi documentada (Wang et al., 2001), sendo a presença desta molécula relacionada na população de precursores, de forma autócrina ou parácrina, no processo de renovação celular constantemente presente nesta região do SN. Dados do nosso laboratório demonstraram, inicialmente, a presença das três subunidades do receptor para IL-2 (IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ) durante o desenvolvimento da retina neural e do RPE de ratos. A localização da subunidade IL-2R α é mais restrita à GCL, com pouca dispersão pela IPL, pelo menos na primeira semana pós-natal o que poderia sugerir um efeito mais direto da IL-2 sobre a população de RGC em nosso modelo de neuroproteção mediado por esta citocina (dados não publicados).

Ao utilizarmos os bloqueadores da atividade tirosina cinase e da JAK, observamos uma reversão total da sobrevida neuronal mediada pela IL-2 em nossas preparações, indicando que de modo semelhante ao observado para o efeito da IL-4 a IL-2 depende totalmente da atividade de proteínas tirosina cinases, assim como da ativação da via da JAK para exercer seu efeito. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que o IL-2R não possui atividade catalítica intrínseca e a transdução do sinal ocorre principalmente através da ativação das tirosinas cinases JAK1 e JAK3 (Kono *et al.*, 1993; Ellery e Nicholls, 2002 para revisão).

A ativação da via da ERK também foi essencial para que a IL-2 exercesse seu efeito neuroprotetor sobre as RGC em nosso modelo. Realmente, a ligação da IL-2 ao seu receptor pode resultar na ativação de várias vias de sinalização, dentre elas a da MEK/ERK (Kono *et al.*, 1993; Minami e Taniguchi, 1995; Ellery e Nicholls, 2002; Fung *et al.*, 2003). Outras vias normalmente ativadas pelo IL-2R, como as das Src, PI3K e PKC poderiam estar envolvidas mediando o efeito da IL-2 sobre as RGC (Kono *et al.*, 1993; Minami e Taniguchi, 1995; Ellery e Nicholls, 2002). Entretanto, nossos resultados indicam que não há o envolvimento destas outras vias de sinalização intracelulares mediando o efeito neuroprotetor da IL-2 sobre as RGC.

Awatsuji e colaboradores (1993) descreveram um efeito neuroprotetor da IL-2 em neurônios provenientes de diferentes áreas encefálicas (córtex, estriado, septo e hipocampo), sendo que no hipocampo observou-se ainda o efeito neuritogênico, independente da densidade celular. No mesmo ano, Sarder e colaboradores (1993) demonstraram, *in vitro*, que a IL-2 apresenta efeitos diferenciados sobre uma mesma população neuronal (neurônios corticais de ratos), conforme a densidade celular utilizada. Neste trabalho, foi observado um efeito neuroprotetor quando do tratamento de culturas de alta densidade. Ao contrário, neurônios mantidos em baixa

densidade não tinham sua sobrevida aumentada e a resposta celular à citocina era a extensão de neuritos. Neste trabalho eles sugeriram que o primeiro efeito ocorreria de forma indireta, através da liberação de fatores solúveis por células gliais, enquanto que a neuritogênese seria pela ação direta desta interleucina sobre as células neuronais. Entretanto, apesar de termos confirmado que o efeito da IL-4 ocorria indiretamente, através da liberação de BDNF na cultura, o mesmo não foi observado para IL-2, uma vez que o co-tratamento com a BFA ou com o inibidor de receptores Trk não bloquearam a ação da IL-2 sobre as RGC.

A utilização de explantes retinianos permitiu o estudo de outros parâmetros, como por exemplo, alterações na secreção e distribuição das moléculas de ECM. A modulação espaço-temporal da expressão de proteoglicanos do tipo HS e CS foi descrita durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos, com a predominância da secreção de HSPG em P1, P5 e P21, enguanto que o pico da expressão de CSPG foi observado em P14 (Erlich et al., 2003). Além disso, a modulação da PCD de RGC e de células da NL quando do pré-tratamento com heparitinase em retinas de ratos P1, após 1 DIV, também foi observada. É importante destacar que é durante este período que ocorre o pico de PCD pós-natal das RGC (Rehen et al., 1993). Através de análises imunohistoquímicas, demonstramos que a expressão de HS estava aumentada em todas as camadas celulares da retina (ONL, NL e GCL) após o tratamento com a IL-2 por 5 DIV e que o pré-tratamento dos explantes com heparitinase bloqueou totalmente o efeito neuroprotetor desta citocina demonstrando, assim, a dependência da presença inicial deste glicosaminoglicano para que ocorra a redução da morte das RGC induzida pela IL-2.

Os diferentes proteoglicanos ricos em HS podem regular a atividade de moléculas sinalizadoras modulando a difusão de mensageiros extracelulares e até mesmo a ativação de seus receptores (Sasisekharan e Venkataraman, 2000). Segundo Inatani e Tanihara (2002), a presença de HSPG com seus domínios ligantes de membrana nos neuritos das células retinianas indica o seu papel como receptor para citocinas. Além disso, Chai e Morris (1999) demonstraram que moléculas de HSPG presentes na ILM estimulam o padrão de crescimento e a densidade axonal de RGC na retina de galinha *in vitro*, utilizando para tanto o tratamento do tecido com heparitinase. Entretanto, eles verificaram que este efeito poderia estar sendo resultado da ligação do bFGF ao HS, que atuaria modulando os efeitos neurotróficos desta citocina, visto já ter sido descrito o papel do HSPG como reservatório de fatores de crescimento (Allen *et al.*, 2001).

Segundo Ramirez e Rifkin (2003), a ligação das HSPGs ao FGF atuaria como um mecanismo fisiológico para aumentar a concentração local deste ligante. Além disso, a interação do FGF com as cadeias de HS protegeria essa citocina da degradação por proteases extracelulares. Um outro aspecto a ser considerado é o de que a interação de varias moléculas sinalizadoras a uma molécula de HSPG poderia formar oligômeros, o que facilitaria a dimerização de receptores e conseqüentemente a transdução do sinal desencadeado pela citocina. Assim, considerando que a presença inicial de HS foi essencial para que a IL-2 exercesse seu efeito neuroprotetor e que esta citocina também é capaz de se ligar às moléculas de HS (Najjam *et al.*, 1997), é muito provável que a ligação da IL-2 ao seu complexo receptor na retina possa estar sendo modulada por moléculas de HSPG. Segundo Nagy e Reh (1994), a inibição da interação entre as células e o complexo laminina-HSPG inibe a regeneração na retina de anfíbios. Portanto, o aumento na

expressão de HS após o tratamento com a IL-2 pode estar relacionado à otimização do processo de ligação ao receptor, facilitando a união das subunidades além de contribuir para a formação de um ambiente permissivo à regeneração axonal.

Os resultados obtidos *in vitro* com a IL-2 nos conduziram ao estabelecimento da técnica de ONC, de forma a avaliar o potencial neuroprotetor da IL-2 sobre as RGC *in vivo*, cujos resultados preliminares estão sendo apresentados nesta dissertação. É importante ressaltar que iniciamos os estudos com a IL-2, pois essa é a primeira vez que o potencial neurotrófico desta citocina é testado em um modelo de degeneração de RGC *in vivo*, enquanto que os efeitos *in vivo* da IL-4 sobre RGC foram testados com o uso de vetores virais (Koeberle *et al.*, 2004), sem contudo, ficar estabelecido plenamente o potencial terapêutico desta citocina, o que nos estimula ainda a ampliar os estudos *in vivo* também para a IL-4.

Primeiramente, verificamos a eficiência do método analisando o padrão temporal da morte celular na GCL, sendo importante ressaltar que o ONC é um modelo de lesão parcial, ou seja, alguns axônios são seccionados durante a lesão, enquanto outros, apesar de não serem diretamente afetados mecanicamente podem sofrer degeneração secundaria (Kreutz *et al.*, 1999). Após o ONC, as RGC podem ser afetadas de diferentes maneiras: uma parte degenera rapidamente por necrose (degeneração primária) e outras degeneram mais lentamente via PCD (degeneração secundária). Além disso, algumas células, mesmo axotomizadas, podem sobreviver por um longo período de tempo após a lesão, enquanto outras podem permanecer intactas, com suas conexões no CNS alcançando seus alvos (Bien *et al.*, 1999). Kreutz *et al.*, 1999).

O curso temporal da morte das RGC após o ONC depende do procedimento executado durante a lesão axonal (tabela 1). Em camundongos, após o ONC

realizado com uma pinça durante 3 segundos, cerca de 37% a 47% das células na GCL degeneram após duas semanas, com o pico do numero de células com perfis picnóticos no fim segunda semana (Li et al., 1999), o que foi corroborado pelo trabalho de Tezel e colaboradores (2004). Em ratos, a redução de 66% das RGC após uma semana de ONC foi descrita por Freeman e colaboradores (2000), enquanto que Naskar e colaboradores (2002) descreveram a redução de 75% do numero de RGC no mesmo período, o que pode ser resultado da metodologia utilizada para obtenção do ONC. Nossos resultados mostram que a partir do 5° dia após a lesão houve uma redução de aproximadamente 40% no número de núcleos marcados com Sytox Green na GCL, tendo sido observado ainda o aumento no número de perfis picnóticos no mesmo período. Nossos resultados foram obtidos pela quantificação do número total de núcleos presentes na GCL. Uma análise comparativa, a ser realizada com marcadores retrógrados, do número absoluto de RGC precisa ser realizada, uma vez que após o segundo dia pós-natal ocorre a migração de células amácrinas para a GCL, gerando, na primeira semana, um porcentual de cerca de 50% de células amácrinas compondo a população neuronal na GCL (Perry et al., 1983).

Os nossos resultados descreveram um período de maior perda de células na GCL entre o 3º e o 5º dia após o ONC, o que demonstra ser a morte celular observada em nosso modelo mais rápida do que aquela descrita por outros autores em ratos adultos (Bien *et al.*, 1999; Freeman e Grosskreutz, 2000; Naskar *et al.*, 2002). Este fato poderia ser explicado pela maior susceptibilidade das RGC à morte por excitoxicidade em animais mais jovens (McKnernan *et al.*, 2006). É interessante destacarmos ainda que Li e colaboradores (2007) demonstraram a existência de uma variabilidade na sensibilidade ao ONC em camundongos de diferentes

linhagens. Apesar de não ser claro o mecanismo pelo qual as diferentes linhagens apresentaram esta diferença, sugere-se que a suscetibilidade à morte neuronal seja determinada geneticamente, o que pode nos levar a pensar na grande variabilidade de respostas e de repertórios imunológicos que estas diferentes cepas de camundongos apresentam.

Em nossos estudos, a retina do olho contralateral à lesão do NO foi utilizada como controle para a quantificação dos núcleos presentes na GCL, respeitando sempre a relação centro/periferia de cada retina. Entretanto, durante as quantificações constatamos que também ocorreu uma pequena redução no número de núcleos na GCL da retina contralateral. Alem disso, também observamos a presença de núcleos picnóticos no 5° dia após a lesão nestas mesmas retinas. A resposta celular contralateral observada em modelos de lesão de ON já foi levantada na literatura, tanto nas RGC (ativação de fatores de transcrição envolvidos com a PCD), quanto na reatividade das populações gliais (Bodeutsch et al., 1999). A proliferação microglial retiniana bilateral após o ONC também já foi observada e relacionada a eventos degenerativos em ambas as retinas, onde este tipo celular participaria fagocitando os debris, restos celulares e de mielina resultantes da degeneração das RGC e de seus axônios devido à lesão unilateral (Panagis et al., 2005). Desta forma, torna-se ainda essencial a análise da GCL em animais falsos operados (experimentos em andamento – controle sham), assim como em animais não submetidos a qualquer intervenção cirúrgica (experimentos em andamento), mas submetidos à anestesia, uma vez que os anestésicos comumente usados podem alterar a viabilidade das RGC no modelo de ONC (Kurimoto et al. 2006).

A administração intravítrea de citocinas (*e.g.* BDNF), em diferentes modelos de lesão de ON, tem sido uma ferramenta útil para se testar o potencial neurotrófico

destas moléculas em RGC de ratos (Nakazawa *et al.*, 2002; Pernet e Di Polo, 2006) e de gatos (Chen e Weber, 2001). Portanto, testamos, inicialmente, a eficiência da injeção intravítrea, como meio de administração de citocinas em nosso modelo, utilizando como controle positivo o BDNF. Nossos resultados mostraram um aumento de aproximadamente 100% no número de núcleos na GCL após 5 dias de sobrevida dos animais, o que representa uma sobrevida maior do que aquela descrita após 7 dias do ONC em animais adultos (Pernet e Di Polo, 2006). Assim, pudemos nos certificar da eficiência das injeções, além de verificarmos, posteriormente, que não estava havendo lesão do cristalino.

O método do ONC, assim como a axotomia *in vivo*, resulta na degeneração retrógrada das RGC, porém de maneira mais lenta (Levkovitch-Verbin, 2004 para revisão). Todavia, uma vantagem deste método em relação a axotomia é a de que, além dos estudos de neuroproteção, a lesão por esmagamento facilita as análises de fatores que promovam a regeneração axonal além do local da lesão, como foi observado por Yin e colaboradores (2006). Em uma série de trabalhos deste grupo, estudou-se o efeito da resposta inflamatória e a secreção de citocinas (oncomodulina) por macrófagos recrutados durante a lesão do cristalino na regeneração do ON lesado (Leon *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2006). Entretanto, esta citocina só exerceu seu efeito trófico sobre as RGC quando os níveis de cAMP estavam aumentados (Yin *et al.*, 2006).

Após verificarmos que o ONC causava a morte celular na GCL e que as injeções intravítreas estavam funcionando corretamente, iniciamos os experimentos para testar o potencial neurotrófico da IL-2 *in vivo*. Os primeiros resultados da administração intravítrea da IL-2 no olho ipsilateral à lesão demonstraram que esta citocina aumentou significativamente o número de núcleos viáveis presentes na
GCL, indicando um potencial neurotrófico *in vivo* para o tratamento com a IL-2 após 5 dias de ONC. A presença de um número aumentado de perfis picnóticos nos animais injetados com IL-2, em relação aos animais que não receberam a injeção da interleucina, sugere que esta citocina possa estar promovendo um atraso na morte neuronal em uma parcela da população de células na GCL. Experimentos utilizando outras concentrações, assim como o tratamento por períodos maiores de tempo após o ONC precisam ser realizados.

A meia-vida plasmática da IL-2 é de aproximadamente 6,5 horas (Konrad *et al.,* 1990), embora não esteja disponível na literatura a meia-vida desta molécula em um ambiente como o humor vítreo. Portanto, no 5° dia após a lesão, a concentração intravítrea da IL-2 pode estar significativamente diminuída. Outro ponto de extrema importância é a de que podemos ter utilizado uma concentração muito elevada e, por conseguinte, estaríamos subestimando o efeito neuroprotetor desta citocina. Neste sentido, Hanisch e colaboradores (1997) mostraram que a administração intracerebroventricular de IL-2 por longos períodos de tempo em ratos pode resultar em efeito neurotóxicos para neurônios corticais. Desta forma, mais estudos sobre a administração intravítrea prolongada desta citocina e das concentrações utilizadas precisam ser realizados.

Um parâmetro da ação da IL-2 ainda não analisado *in vivo f*oi o das vias de sinalização reguladas quando da administração desta citocina, o que poderá ser alcançado utilizando-se o método já descrito por Luo e colaboradores (2007), que aplicaram intravítreamente inibidores das principais vias de sinalização quando da neuroproteção de RGC mediada por enxerto de nervo periférico. A análise das vias de sinalização ativadas por CNTF *in vivo* mostrou que a sobrevida das RGC axotomizadas ocorreria através da ativação das vias PI3K/PKB/Akt, MEK/ERK e

107

JAK/STAT (Park *et al.*, 2004). Estes dados estão de acordo com aqueles observados por nós quando da análise do efeito neuroprotetor *in vitro* da IL-4 e/ou IL-2. Entretanto, de um modo incongruente, Park e colaboradores (2004), mostraram ainda que a simples inibição destas mesmas vias, quando da lesão de RGC por axotomia, também pode resultar na sobrevida desta população celular, sugerindo que estas vias poderiam exercer papeis diferenciados sobre as RGC quando ativadas em diferentes condições (Park *et al.*, 2004).

Outro parâmetro importante que deve ser destacado para futuras análises é o do potencial da IL-2 na regulação do processo inflamatório gerado pelo ONC. O nível de ativação glial e microglial é de grande importância durante a lesão do ON(Panagis *et al.,* 2005). Um outro modelo de regeneração do ON, onde observamos um papel modulatório sobre as populações gliais é o de implante intravítreo de nervos periféricos (Berry et al., 1996), que também está relacionado à ação de citocinas liberadas localmente, pelo tecido enxertado e por macrófagos infiltrantes (Benowitz e Yin, 2008).

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que as interleucinas estudadas e, em particular a IL-2, podem constituir importantes moléculas alvo para o estudo do tratamento de patologias que envolvam a degeneração das RGC, como por exemplo, no caso das neuropatias ópticas.

Na morte de RGC axotomizadas in vitro:

- A neuroproteção da IL-4:
 - É dependente da atividade de proteínas tirosina cinase e da JAK.
 - É parcialmente dependente das vias da ERK, PI3K e PKA.
 - É independente das vias da Src e PKC.
 - É indireta, dependente da liberação de peptídeos e da ativação de receptores Trk por BDNF.
- > IL-4 aumenta a expressão de BDNF pela glia de Muller in vitro.
- A neuroproteção da IL-2:
 - É dependente da atividade de proteínas tirosina cinase e da JAK.
 - É dependente da via da ERK.
 - É independente das vias da PI3K, PKA, PKC e Src.
 - Depende da presença inicial de heparan sulfato.
- IL-2 aumenta a expressão de heparan sulfato nas camadas celulares da retina *in vitro*.
- No modelo de morte de RGC de ratos submetidos ao ONC a IL-2 possui efeito neuroprotetor de 50%, quando da administração intravítrea desta citocina na concentração de 2.500 U/μL.

7 PERSPECTIVAS

A extrapolação dos dados obtidos na retina *in vitro* para um modelo *in vivo* visa uma abordagem mais integrativa sobre a ação de citocinas como agentes neuroprotetores, além de possibilitar a avaliação de seu efeito na regeneração axonal (através da analise das fibras do nervo óptico), nas projeções retinotectais e nas respostas neuro-inflamatórias. Portanto, como perspectivas futuras, utilizando o ONC e as injeções intraoculares de interleucinas, pretendemos analisar os seguintes parâmetros na retina, no nervo óptico e nos alvos de projeção retinianos no CNS:

- Padrão de sobrevida das RGC e as vias de sinalização envolvidas quando da manutenção dos animais por períodos mais longos de sobrevida.
- ✓ Distribuição e respostas gliais (macroglial e microglial).
- ✓ Distribuição e expressão das moléculas de ECM (*e.g.* HS, CS e laminina).
- ✓ Distribuição e atividade de MMPs e TIMPs.
- ✓ Regeneração axonal.

ADÃO-NOVAES, J.; GUTERRES, C.C.B.; CAMPELLO-COSTA, P.; LINDEN, R., SHOLL-FRANCO, A. (2009). Neuroprotect effect of interleukin-4 against tapsigargininduced cell death in rat rod photoreceptors: involvement of cAMP. (no prelo). J Neurosci. V.xx:p.xx

AHMED ,Z.; DENT, R.G.; LEADBEATER, W.E.; SMITH, C.; BERRY, M.; LOGAN, A.(2005). Matrix metalloproteases: degradation of the inhibitory environment of the transected optic nerve and the scar by regenerating axons, **Mol. Cell. Neurosci**. v.28: pp. 64–78

ALLEN, B..L.; FILLA, M.S.; RAPRAEGER, A.C. (2001). Role of heparan sulfate as a tissue –specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. **J Cell Biol.** v.155: p. 845-857.

ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; MELO, C.V.; GOMES, J.R.; MENDES, C.S.; GRÃOS, M.M.; CARVALHO, R.F.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. (2005). Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell Death Differ.** v. 12: p. 1329-1343.

ANDREWS, A.L.; HOLLOWAY, J.W.; HOLGATE, S.T.; DAVIES, D.E. (2006). IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. **J Immunol.** v.15:pp. 7456-7461.

ARAÚJO, D.M.; COTMAN, C.W. (1993). Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. **Brain Res.** v. 600: pp.49-55.

ARAÚJO, D.M.; COTMAN, C.W. (1995). Differential effects of interleukin-1 β and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture. **Int J Devl. Neuroscience.** v.13:p.201-212.

ARAÚJO, D.M.; LAPCHAK, P.A.; COLLIER, B.; QUIRION, R. (1989). Localization of interleukin-2 immunoreactivity and interleukin-2 receptor in the rat brain: interaction with the cholinergic system. **Brain Res.** v.498:p.257-266.

ARAÚJO, E.G.; LINDEN, R. (1993). Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Eur J Neurosci.** v.5:p.1181-1188.

ARY-PIRES, R.; NAKATANI, M.; REHEN, S.K.; LINDEN, R. (1997). Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors *in vitro*. **Int J Devl Neuroscience.** v.15: p.239-255.

AVILÉS-TRIGUEROS, M.; MAYOR-TORROGLOSA, S.; GARCÍA-ÁVILES, A.; LAFUENTE, M.P.; RODRIGUEZ, M.E.; IMPERIAL, J.M.; VILLEGAS-PÉREZ, M.P.; VIDAL-SANZ, M. (2003). Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimodine. **Exp Neurol.** v.184: p.767-777.

AWATSUJI, H.; FURUKAWA, Y., NAKAJIMA, M.; FURUKAWA, S.; HAYASHI, K. (1993). Interleukin-2 as a neurotrophic factor for supporting the survival of neurons cultured from various regions of fetal rat brain. **J Neurosci Res.** v.35: p.305-311.

BAKALASH, S.; ROLLS, A.; LIDER, O.; SCHWARTZ, M. (2007). Chondroitin Sulfate-Derived Disacharide Protects Retinal Cells from Elevated Intraocular Pressure in Aged and Immunocompromised Rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci** v.48: p.1181-1190.

BECK JR, R.D.; WASSERFALL, C.; HA, G.K.; CUSCHMAN, J.D.; HUANG, Z.; ATKINSON, M.A.; PETITTO, J.M. (2005). Changes in hippocampal IL-15, related cytokines, and neurogenesis in IL-2 deficient mice. **Brain Res.** v.1041:p.223-230.

BECK JR, R.D.; KING, M.A.; HUANG, Z.; PETITTO, J.M. (2002) Alterations in septohippocampal cholinergic neurons resulting from interleukin-2 gene knockout. **Brain Res.** v.955: p. 16-23.

BENOWITZ, L.; YIN, Y. Rewiring the injured CNS: Lessons from the optic nerve. (2008) **Exp Neurol.** v.209: p.389-398.

BERKELAAR, M.; CLARKE, D.B.; WANG, Y.C.; BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. **J Neurosci..** v.14:pp.4368-4374.

BERRY, M.; CARLILE, J.; HUNTER, A. (1996). Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. **J Neurocytol.** v. 25:p. 147-170.

BERRY, M.; CARLILE, J.; HUNTER, A.; TSANG, W.L.; ROSUSTREL, P.; SIEVERS, J. (1999). Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. **J Neurocytol** v.28: pp. 721-741.

BERSON, D.M.; DUNN, F.A.; TAKAO, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science.** v.295: p. 1070-1073.

BIEN, A.; SEIDENBECHER, C.I.; BOCKERS, T.M.; SABEL, B.A.; KREUTZ, M.R. (1999). Apoptotic versus necrotic characteristics of retinal ganglion cell death after partial optic nerve injury. **J Neurotrauma.** v.16: pp.153-163.

BIFRARE, Y.D.; KUMMER, J.; JOSS, P.; TÃUBER, M.G.; LEIB, S.L. (2005). Brain-Derived Neurotrophic Factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. **J Infect Dis**. v.191: p. 40-45. BODEUTSCH, N., SIEBERT, H., DERMON, C., THANOS, S. (1999). Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. **J Neurobiol.** v.38:pp.116-128.

BOK, D. (1993) The retinal pigmented epithelium: a versatile partner of vision. **J Cell Sci.** v.17: p.189-195.

BOULTON, M.; DAYHAW-BARKER, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and aging changes. **Eye.** v.15: p.384-389.

BOYD, Z.S.; KRIATCHKO, A.; YANG, J.; AGARWAL, N.; WAX, M.B.; PATIL, R.V. (2003). Interleukin-10 receptor signaling through STAT-3 regulates the apoptosis of retinal ganglion cells in response to stress. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.44:p.5206-5211.

BROBERG, E.K.; SALMI, A.A.; HUKKANEN, V. (2004). IL-4 is the key regulator in herpes simplex virus-based gene therapy of BALB/c experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurosci Lett.** v. 364: p. 173-178.

BRODIE, C. (1996). Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. **FEBS Lett** v. 394: p. 117-120.

BRODIE, C. e GOLDREICH, N. (1994). Interleukin-4 modulates the proliferation and differentiation of glial cells. **J Neuroimmunol.** v. 55: p. 91-97.

BRODIE C, GOLDREICH N, HAIMAN T, KAZIMIRSKY G. (1998). Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. **J Neuroimmunol**. 1998 Jan;81(1-2):20-30.

BUSCH, S.A.; SILVER, J. (2007). The role of extracellular matrix in CNS regeneration. **Curr Opin Neurobiol.** v.17:pp.120-127.

BUSS, R.R.; SUN, W; OPPENHEIM, R.W. (2006). Adaptative roles of programmed cell death during nervous system development. **Annu Rev Neurosci.** v.29:p.1-35.

CAFFERTY, W.B.J.; GARDINER, N.J.; DAS, P.; QIU, J.; MCMAHON, S.B.; THOMPSON, W.N. (2004). Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. **J Neurosci..** v.24:pp.4432-4443.

CAMACHO-ARROYO I, LÓPEZ-GRIEGO L, MORALES-MONTOR J. (2009). The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. **Neuroimmunomodulation**. 16(1):1-12.

CARVALHO, A.L.; CALDEIRA, M.V.; SANTOS, S.D.; DUARTE, C.B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. **Br J Pharmacol.** v.153: p.310-324.

CEPKO, C.L.; AUSTIN, C.P.; YANG, X.; ALEXIADES, M.; EZZEDDINE, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 93: p. 589–595.

CEPKO, C.L (2000). Giving in to the blues. Nat Genet. v. 24: p. 99-100.

CHAI, L.; MORRIS, J.E. (1999). Heparan sulfate in the inner limiting membrane of embryonic chicken retina binds basic fibroblast growth factor to promote axonal outgrowth. **Exp Neurol.** v. 160:pp.175-85.

CHAKRABORTY, G.; REDDY, R.; DRIVAS A.; LEDDEN, R.W. (2003). Interleukin-2 receptors and interleukin-2-mediated signaling in myelin: activation of diacylglycerol kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Neuroscience.** v.122: p.967-973.

CHEN, H.; WEBER, A.J. (2001). BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.42: p.966-974.

CUSATO, K.; BOSCO, A.; LINDEN, R.; REESE, B.E. (2002). Cell death in the inner nuclear layer of the retina is modulated by BDNF. **Developmental Brain Research.** v. 139:p. 325-330.

DANIAS, J.; SHEN, F.; GOLDBLUM, D.; CHEN, B.; RAMOS-ESTEBAN, J.; PODOS, S.M.; MITTAG, T. (2002). Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.43: p. 587-594.

DAVIS-SILBERMAN, N.; ASHERY-PADAN, R. (2007). Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. **Brain Res.** v. 1192: p. 17-28.

DEBOY, C.A.; XIN, J.; BYRAM, S.C.; SERPE, C.J.; SANDERS, V.M.; JONES, K.J. (2006). Immune-mediated neuroprotection of axotomized mouse facial motoneurons is dependent on the IL-4/STAT6 signaling pathway in CD4+ T cells. **Exp Neurol** v.201 : p.212-224

DECHANT, G. (2001). Molecular interactions between neurotrophin receptors. **Cell Tissue Res.** v. 305: p. 229-238.

DELESPINE-CARMAGNAT, M.; BOUVIER, G.; BERTOGLIO, J. (2000). Association of STAT1, STAT3 and STAT5 proteins with the IL-2 receptor involves different subdomains of the IL-2 receptor β chain. **Eur J Immnol.** v.30 p:59-68.

DONOVAN, S.L.; DYER, M.A. (2005). Regulation of proliferation during central nervous system development. **Semin Cell Dev Biol.** v.16: p.407-421.

ELLERY, J.M.; NICHOLLS, P.J. (2002). Alternate signaling pathways from the interleukin-2 receptor. **Cytokine Growth Factor** Rev., v. 13: p.27-40.

ERLICH, R.B.; WERNECK, C.C.; MOURÃO, P.A.S.; LINDEN, R. (2003). Major glycosaminoglycan species in the developing retina: synthesis, tissue distribution and effects upon cell death. **Exp Eye Res** v.77: p.157-165.

FAN, W.; AGARWAL, N.; COOPER, N.G.F. (2006). The role of CAMKII in BDNFmediated neuroprotection of retinal ganglion cells (RGC-5). **Brain Res.** v.1067: pp. 48-57. FAIN, G. (2006). Why photoreceptors die (and why they don't). **Bio Essays.** v. 28:p. 344-354.

FAWCETT, J.W.; ASHER ,R.A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res. Bull**. v. 49:pp. 377–391.

FISHER, D.; HEIDUSCHKA, P. THANOS, S. (2001). Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. **Exp Neurol.** v. 172:pp. 257-272.

FISHER, A.J., REH, T.A. (2003). Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. **Dev Neurobiol.** v.259: p.225-240.

FREEMAN E.E.; GROSSKREUTZ C.L. (2000). The effects of FK506 on retinal ganglion cells after optic nerve crush. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.41: pp.1111-1115.

FUJIWARA, T.; ODA, K.; YOKOTA, S.; TAKATSUKI, A.; IKEHARA, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulatin of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem**. v.263: pp.18545-18552.

FUNG, M.M.; ROHWER, F.; McGUIRE, K.L. (2003). IL-2 activation of a PI3-K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. **Cell Signal.** v.15: p.625-636.

GADINA, M.; HILTON, D.; JOHNSTON, J.A.; MORINOBU, A.; LIGHVANI, A.; ZHOU, Y.J.; VISCONTI, R.; O'SHEA, J.J.(2001). Signaling by Type I and II cytokine receptors: ten years after. **Curr Opin Immunol.** v. 13: p.363-373.

GALEA, P.; THIBAULT, G.; LACORD, M.; BARDOS, P.; LEBRANCHU, Y. (1993). IL-4, but not tumor necrosis factor- α , increases endothelial cell adhesiveness for lymphocytes by activating a cAMP-dependent pathway. **J Immunol.** v. 151: p. 588-596

GARCÍA, M.; FORSTER, V.; HICKS, D.; VECINO, E. (2002). Effects of müller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. **Invest Ophthalmol Vis. Sci.** v.43: p.3735-3743.

GIBSON, R.M.; ROTHWELL, N.J.; FEUVRE, R.A.L. (2004). CNS injury: the role of the cytokine IL-1. **Vet J.** v.168: pp.230-237.

GONCHAROVA, L.B.; TARAKANOV, A.O. (2007). Molecular networks of brain and immunity. **Brain Res Rev.** v.55: p.155-166.

GORIO, A.; LESMA, E.; VERGANI, L.; GIULIO, D. (1997). Glycosaminoglycan supplementation promotes nerve regeneration and muscle reinervation. **Eur J Neurosci.** v.9: pp.1748-1753.

GRANDPRE, T.; STRITTMATTER, S.M.(2001). Nogo: A molecular determinant of Axonal Growth and Regeneration. **Neuroscientist**. v. 7:pp. 377-386.

GROSSKREUTZ C.L.; HÄNNINEN V.A.; PANTCHEVA M.B.; HUANG W.; POULIN N.R.; DOBBERFUHL A.P. (2005). FK506 blocks activation of the intrinsic caspase cascade after optic nerve crush. **Exp Eye Res.** v80: pp. 681-686.

HAKKOUM, D.; STOPPINI, L.; MULLER, D. (2007). Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures. **J Neurochem** v. 100: p.747-757.

HANISCH, U.K.; QUIRION, R. (1996). Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. **Brain Res Rev** v.21: p.246-284.

HANISCH, U.K.; NEUHAUS, J.; ROWE, W.; ROSSUM, D.; MÖLLER, T.; KETTENMANN, H.; QURION, R. (1997). Neurotoxic consequences of central long-term administration of interleukin-2 in rats. **Neuroscience.** v.79: pp.799-718.

HARVEY, A.R.; HU, Y.; LEAVER, S.G.; MELLOUGH, C.B.; PARK, K.; VERHAAGEN, J.; PLANT, G.W.; CUI, Q. (2006). Gene therapy and transplantation in CNS repair: The visual system. **Retinal and Eye Research.** v. 25:p. 449-489.

HATAR, S.; LIAO, H.W.; TAKAO, M.; BERSON, D.M.; YAU, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. **Science.** v.295: pp.1065-1070.

HENNIGAN, A.; O'CALLAGHAN, R.M.; KELLY, A.M. (2007). Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. **Biochem Soc Trans.** v. 35: p. 424-427.

HIRATA, K., KAWABUCHI, M. (2002). Myelin phagocytosis by macrophages and non macrophages during Wallerian degeneration. **Microsc Res Tech.** v. 57: p.541-547.

HU, S.; PETERSON, P.K.; CHAO, C.C. (1997). Cytokine-mediated neuronal apoptosis. **Neurochem. Int.** v.30: p.427-431.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci.** v. 24: p. 677-736.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. (2003).Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. **Annu Rev Biochem.** v. 72: p. 609-642.

HUANG, W.; FILETA, J.B.; DOBBERFUHL, A.; FILIPPOPOLOUS, T.; GUO, Y. KWON, G. (2005). Calcineurin cleavage is triggered by elevated intraocular pressure, and calcineurin inhibition blocks retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. **PNAS.** v. 102: p.12242-12247.

IHLE, J.N.(1995). Cytokine receptor signaling. Nature v. 377: p.591-594.

INATANI, M.; TANIHARA, H. (2002). Proteoglycans in retina. Retinal and eye research. v.21: pp.429-447.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK. (2007).Imunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença, capítulo 8 (Imunidade mediada por células T). 6° Ed. Artmed.

JANKOWSKY, J.L.; PATTERSON, P.H. (2001). The role of cytokines and growth factor in seizures and their sequelaes. **Prog Neurobiol.** v. 63:pp. 125-149.

JOHANSSON, K.; BRUUN, A.; GRASBON, T.; EHINGER, B. (2000). Growth of postnatal rat retina in vitro. Development of neurotransmitter systems. **J Chem Neuroanat.** v.19: p.117-128.

JOHN, G.R.; LEE,S.C.; BROSNAN, C.F. (2003). Cytokines: Powerful Regulators of Glial Cell Activation. **Neuroscientist.** v.9:pp.10-21.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. e JESSELL, T.M. (2003). Princípios da Neurociência, cap. 26 (Processamento visual da retina), 4º Ed. Manole Ltda.

KELLY-WELCH, A.E.; HANSON, E.M.; BOOTHBY, M.R.; KEEGAN, A.D. (2003). Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling connections maps. **Science.** v.300:p.1527-1528.

KIRKEN, R.A.; EVANS, G.A.; DUHÉ, R.J.; SILVA, L.; MALABARBA, M.G.; ERWIN, R.A.; FARRAR, W.L. (1998). Mechanisms of cytokine signal transduction: IL-2, IL-4 and prolactin as hematopoeitin receptor models. **Vet Immunol Immunopathol.** v.63: p.27-36.

KLOCKER N.; ZERFOWSKI, M.; GELLRICH, N,C,; BÄHR, M.(2001). Morphological and functional analysis of an incomplete CNS fiber tract lesion: Graded crush of the rat optic nerve. **J Neurosci Methods** v.110: pp.147-153.

KOEBERLE, P.D.; GAULDIE, J. E.; BALL, A.K. (2004). Effects of adenoviralmediated gene transfer of interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta on the survival of axotomized retinal ganglion cells. **Neuroscience** v.125: p. 903-920.

KONO, T.; MINAMI, Y.; TANIGUCHI, T. (1993). The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the β -chain. **Semin Immunol.** v.5: p. 299-307.

KONRAD, M.W.; HEMSTREET, G.; HERSH, E.M.; MANSELL, P.W.A.; MERTESMANN, R.; KOLITZ, J.E.; BRADLEY, E.C. (1990). Pharmacokinetics of recombinant interleukin 2 in humans. **Cancer Res.** v. 50: p. 2009-2017

KREUTZ, M.R.; SEIDENBECHER, C.I.; SABEL, B.A. (1999). Molecular plasticity of retinal ganglion cells after partial optic nerve injury. **Restor Neurol Neurosci** v. 14: pp. 127-134.

KURIMOTO, T.; ISHII. M.; TAGAMI, Y.; NISHIMURA, M.; MIYOSHI, T.; TSUKAMOTO, Y.; MIMURA, O. (2006). Xylazine promotes axonal regeneration in the crushed optic nerve of adult rats. **Neuroreport.** v.17: p. 1525-1529.

LEE, B.B.(2004).Paths to colour in the retina. Clin Exp Ophtalm. v.87: p.239-248.

LEON, S.; YIN, Y.; NGUYEN, J.; IRWIN, N.; BENOWITZ, L.I. (2000). Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. **J Neurosci**. v. 15: pp. 4615-4626.

LEVKOVITCH-VERBIN, H. (2004). Animal models of optic nerve diseases. **Eye.** v.18:p.1066-1074.

LI, Y.; SCHLAMP C.L.; NICKELLS R.W.(1999). Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 40: pp.1004-1008.

LI, Y.; SEMAAN, S.J.; SCHLAMP, C.L.; NICKELLS, R.W. (2007). Dominant inheritance of retinal ganglion cell resistance to optic nerve crush in mice. **BMC Neurosci.** v.5:pp.8-19

LIN, J.X.; LEONARD, W.J. (1997).Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.8: p.313-332.

LINDEN, R. (2000). The anti-death league: associative control of apoptosis in developing retinal tissue. **Brain Res Rev**. v. 32: p. 146-158.

LINDEN, R.; REHEN, S.K. e CHIARINI, L.B. (1999). Apoptosis in developing retinal tissue. **Prog Retin Eye Res**. v. 18: p. 133-65.

LIU, X.; GRISHANIN, R.N.; TOWAN, R.J.; RENTERÍA, R.C.; XU, B.; REICHARDT, L.F.; COPENHAGEN, D.R. (2007). Brain-Derived Neurotrophic factor and TrkB modulate visual experience-dependent refinement of neuronal pathways in retina. **J Neurosci**. v.27: p.7256-7267.

LIU, K.D.; GREENE, W.C.; GOLDSMITH, M.A. (1996). The alpha chain of the IL-2 receptor determines the species specificity of high-affinity IL-2 binding. **Cytokine.** V.8:pp. 613-621.

LUCAS, S.M. ROTHWELL, N.J.; GIBSON, R. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol.** v. 147: p.232-240

LUND, R.D. (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. **Science** v. 149 pp. 1506–1507.

LUO J.M.; CEN, L.P.; ZHANG, X.M.; CHIANG, S.W.; HUANG, Y.; LIN, D.; FAN,Y.M.; ROOIJEN, N.V.; LAM, D.S.C.; PAN, C.P.; CUI, Q. (2007). PI3K/akt, JAK/STAT and MEK/ERK pathway inhibition protects retinal ganglion cells via different mechanisms after optic nerve injury. **Eur J Neurosci**. 2007;**26**:828–842.

MA, Y.T.; HSIEH, T.; FORBES, M.E.; JOHNSON, J.E.; FROST, D.O. (1998). BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. **J Neurosci..** v.18: p.2097-2107.

MACLAREN, R.E.; BUCH, P.K.; SMITH, A.J.; BALAGGAN, K.S.; MACNEIL, A.; TAYLOR, J.S.; OSBORNE, N.N.; ALI, R.R. (2006). CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retina undergoing focal injury and branch vessel occlusion. **Exp Eye Res.** v. p.1-10.

MANADAS, B.J.; MELO, C.V.; GOMES, J.R.; DUARTE, C.B. (2007). Neurotrophin signaling and cell survival. In: MALVA, J.O.; REGO, A.C.; CUNHA, R.A.; OLIVEIRA, C.R. Interaction between neurons and glia in aging and disease. **Springer-Verlag: New York.** p.137-172.

MARGALIT, E.; SADDA, S.R. (2003). Retinal and Optic Nerve Diseases. Artif Organs. v.27: p.963-974.

MARSHAK, S.; NIKOLAKOPOULOU, A.M.; DIRKS, R.; MARTENS, G.J.; COHEN-CORY, S. (2007). Cell-autonomous TrkB signaling in presynaptic retinal ganglion cells mediates axon arbor growth and synapse maturation during the establishment of retinotectal synaptic connectivity. **J Neurosci.**, v.27: p.2444-2456.

MARTINO, G.; POLIANI, P.L.; FURLAN, R.; MARCONI, P.; GLORIOSO, J.C.; ADORINI, L.; COMI, G. (2000) Cytokine therapy in immune-mediated demyelinating diseases of the central nervous system: a novel gene therapy approach. **J Neuroimmunol.** V.107: p.184-190.

MASLAND, R.H.(2001a).Neuronal diversity in the retina. **Curr Opin Neurobiol.** v.11: p. 431-436.

MASLAND, R.H.(2001b). The fundamental plan of the retina. **Nat Neur.** v.4: p.877-886.

MASLAND, R.H. (2004). Neuronal cell types. Curr Biol. v.14:p.497-500

McKERNAN, D.P.; CAPLIS, C.; DONOVAN, M.; O`BRIEN,C.J.; COTTER, T.G. (2006). Age-dependent susceptibility of the retinal ganglion cell layer to cell death. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.47:pp.807-814.

MCKAY, C.E.; HEWITT, E.L.; OZANNE, B.W.; CUSHLEY, W. (2000) A functional role for interleukin (IL)-4 driven cyclic AMP accumulation in human B lymphocytes. **Cytokine.** v.12:p.731-736.

MENDONÇA-TORRES, P.M.; ARAÚJO, E.G. (2001). Interleukin-6 increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. **J Neuroimmunol.** v.117:pp.43-50.

MINAMI, M.; KATAYAMA, T.; SATOH, M. (2006). Brain Cytokines and Chemokines: Roles in Ischemic Injury and Pain. **J Pharmacol Sci**. v.100: p.461-470.

MINAMI, Y.; TANIGUCHI, T. (1995). IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor. **Curr Opin Neurobiol.** v.7: p.156-162.

MIZUNO, T.; SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; MARUNOUCHI, T. (1994). Expression of cytokines during glial differentiation. **Brain Res.** v.656: p.141-146.

MUELLER, T.D.; ZHANG, J.L.; SEBALD, W.; DUSCHL, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. **Biochim Biophys Acta.** v.152:p.237-250.

NAGY, T.; REH, T.A. (1994). Inhibition of retinal regeneration in larval Rana by an antibody directed against a laminin-heparan sulfate proteoglycan. **Brain Res Dev Brain Res.** v.12: pp. 131-134.

NAJJAM, S.; GIBBS, R.V.; GORDON, M.Y.; RIDER, C.C. (1997). Characterization of human recombinant interleukin-2 binding to heparin and heparan sulfate using an elisa approach. **Citokyne.** v.9:pp.103-1022.

NAKAZAWA, T.; MATSUBARA, A.; NODA, K.; HISATOMI, T.; SHE, H.; SKONDRA, D.; MIYAHARA, S.; SOBRIN, L.; THOMAS, K. L.; CHEN, D.F.; GROSSKREUTZ, C.L.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; MILLER, J.W. (2006). Charachterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. **Mol Vis.** v.12: p. 867-78.

NAKAZAWA, T.; TAMAI, M.; MORI, N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. **Invest Ophthalmol Vis Sci** v.43: p.3319-3326.

NASKAR, R.; QUINTO, K.; ROMANN, I.; SCHUETTAUF, F.; ZURAKOWSKI, D. (2002). Phenytoin blocks retinal ganglion cell death after partial optic nerve crush. **Exp Eye Res.** v.74: pp. 747-752.

NELMS, K.; KEEGAN, A.D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. (1999). The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol.** v. 17: p.701-738.

NEWMAN, E.; REICHENBACH, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. **Glia.** v. 19: p. 307-312.

NGUYEN, N.; LEE, S.B.; LEE, Y.S.; LEE, K.H.; AHN, J.Y. (2008). Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-Kinase and MAPK pathways. **Neurochem Res.**v.xx:p.xx

OSBORNE, N.N.; CHIDLOW, G.; LAYTON, C.J.; WOOD, J.P.M.; CASSON, R.J.; MELENA, J. (2004). Optic Nerve and neuroprotection strategies. **Eye.** v.18: p. 1075-1084.

PANAGIS, L.; THANOS, S.; FISCHER, D.; DERMON, C.R.(2005). Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. **Eur J Neurosci.** v.21: pp.2305-2309.

PARK, K.; LUO, J.M.; HISHEH, S.; HARVEY, A.R.; CUI, Q. (2004). Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. **J Neurosci**. v.24, pp. 10806–10815.

PARK, K. W.; LEE, D. Y.; JOE, E. H.; KIM, S. U.; JIN, B. K. (2005) Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. **J Neurosci Res**. v.81: p.397-402.

PATIL, B.B.; DOWD, T.C.(2000) Physiological functions of the eye. **Biochim Biophys Acta.** v.11:p. 293-298.

PENG, Y. P.; QIU, Y. H.; LU, J. H.; WANG, J. J. (2005). Interleukin-6 protects cultured cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters.** v.347: p.192-196.

PERNET, V.; DI POLO, A. (2006). Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy *in vivo*. **Brain.** v.129: p.1014-1026.

PERRY, V.H.; HENDERSON, Z. E LINDEN, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. **J Comp Neurol**. V. 219: p.356-368.

PETITTO, J.M.; MCNAMARA, R.K.; GENDREAU, P.L.; HUANG, Z.; JACKSON, A.J. (1999). Impaired learning and memory and altered hipocampal neurodevelopment resulting from interleukin-2 gene deletion. **J Neur Res.** v.56: p.441-446.

PIZZI, M. A.; CROWE, M.J. (2007) Matrix metalloproteinases and proteoglycans in axonal regeneration. **Exp Neur**. v.204: p.496-511

POLLMACHER, T.; HAACK, M.; SCHULD, A.; REICHENBERG, A.; YIRMIYA, R. (2002). Low levels of circulating inflammatory cytokines – do they affect human brain functions? **Brain Behavior Immun**. v.16: p.525-532.

PRESLAND, A. (2007). Applied ocular physiology and anatomy. **Anaes Intens Care Medicine.** v. 8: p. 9.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LaMANTIA, A.S.; McNAMAR, J.O.; WILLIANS, S.M. (2005). Neurociências, cap.11 (Visão: o olho); cap.12 (Vias centrais da visão), 2^a Ed. Artmed.

QUIGLEY, H.A. (2005). Glaucoma: macrocosm to microcosm. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.46:p. 2663-2670.

RABER, J.; SORG, O.; HORN, T.F.W.; YU, N.; KOOB, G.F.; CAMPBELL, I.L.; BLOOM, F.E. (1998). Inflammatory cytokines: putative regulators of neuronal and neuro-endocrine function. **Brain Res Rev** v.26:p.320-326.

RAMIREZ, F.; RIFKIN, D.B. (2003). Cell signaling events: a view from the matrix. **Matrix Biology.** v.22: pp.101-107.

REHEN, S.K.; ARY-PIRES, R.; LINDEN, R. (1993). Intraretinal neurotrophic activity prevents the degeneration of ganglion cells in retinal explants. **Braz J Med Biol Res.** v. 26:p. 955-959.

REHEN, S.K.; VARELLA, M.H.; FREITAS, F.G.; MORAES, M.O. e LINDEN, R.(1996). Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. **Development** v. 122: p. 1439-1448.

REICHARDT, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signaling pathways. **Phil Trans R Soc B** v. 361: p.1545-1564.

ROTHWELL, N. J.; STRIJBOS, P.J.L.M.(1995) Cytokines in neurodegeneration and repair. **Int J Devl Neuroscience.** V13: p. 179-185.

ROLLS, A., AVIDAN, H.; CAHALON, L.; SCHORI, H.; BAKALASH, S.; LITVAK, V.; LEV, S.; LIDER, O.; SCHWARTZ, M. (2004). A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice. **Eur J Neurosci.** v. 20: pp. 1973-1983.

SANDVIG, A.; BERRY, M.; BARRETT, L.B.; BUTT, A.; LOGAN, A. (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: Expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. **Glia.** v. 46: pp. 225-251.

SARDER, M.; SAITO, H.; ABE, K. (1993). Interleukin-2 promotes survival and neurite extension of cultured neurons from fetal rat brain. **Brain Res.** v.625: p.347-350.

SARDER, M. ABE, K.; SAITO, H.; NISHIYAMA, N. (1996). Comparative effect of IL-2 and IL-6 on morphology of cultured hippocampal neurons from fetal brain. **Brain Res.** v. 715: p.9-16.

SASISEKHARAN, R.; VENKATARAMAN, G. (2000). Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. **Curr Opin Chem Biol.** v.4: pp.626-631.

SCHWARTZ, M.(2004a). Optic nerve crush: protection and regeneration. **Brain Res Bull.** v. 62: p.467-471.

SCHWARTZ, M.(2004b). Vaccination for glaucoma: dream or reality? **Brain Res Bull.**v. 62: p.481-484.

SEIGEL, G.M. (1999). The golden age of retinal cell culture. Mol Vis. v.5: p. 4-13.

SEKI, M.; TANAKA, T.; SAKAI, Y.; FUKUCHI, T.; ABE, H.; NAWA, H.; TAKEI, N. (2005). Müller cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat müller cells. **Neurochem Res.** v.30: pp.1163-1170.

SHARPE, L.T.; STOCKMAN, A. (1999).Rod pathways: the importance of seeing nothing. **Trends Neurosci.**v.22p.497-504.

SHOLL-FRANCO, A.; FIGUEIREDO, K.G.A.; ARAÚJO, E.G. (2001a). Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture. **Neuroreport.** v. 12:p. 109-112.

SHOLL-FRANCO, A.; MARQUES, P.M.B.; PAES-DE-CARVALHO, R.; ARAUJO, E.G. (2001b). Antagonistic and synergistic effects of combined treatment with interleukin-2 and interleukin-4 on mixed retinal cell cultures. **J. Neuroimmunol.** v. 113: p. 40-48.

SHOLL-FRANCO, A.; MARQUES, P.M.B.; FERREIRA, C.M.C.; ARAÚJO, E.G. (2002). IL-4 increases GABAergic phenotype in rat retinal cell cultures: involvement of muscarinic receptors and protein kinase C. **J Neuroimmunol.** v.133: p. 20-29.

SHOLL-FRANCO A.; SILVA, A.G.L.S.; ADÃO-NOVAES, J. (2009). Interleukin-4 as a Neuromodulatory Cytokine. **Ann N Y Acad Sci** v.1153: p.65-75.

da SILVA, A.G.; CAMPELLO- COSTA, P.; LINDEN, R.; SHOLL-FRANCO, A. (2008). Interleukin-4 blocks proliferation of retinal progenitor cells and increases rod photoreceptor differentiation through distinct signalling pathways. **J Neuroimmunol.** v.30: pp. 82-93.

SILVER, J.; MILLER, J. H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. **Nature Rev Neuroscience**. 5:146-156.

SMERDON, D. (2000). Focus on the eye. Anatomy of the eye and orbit. **Cur Anaes Critical Care** v. 11; p. 286-292.

SZELÉNYI, J. (2001). Cytokines and the central nervous system. **Brain Res Bull.** v.54: p. 329-338.

TEZEL G.; YANG X.; YANG J.; WAX M.B. (2004). Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. **Brain Res.** v.996:pp202-212

TURRIN, N.P.; PLATA-SALAMÁN, C.R. (2000). Cytokine-cytokine interactions and the brain. **Brain Res Bull.** v.51:p.3-9.

UGOLINI, G.; CREMISI, F.; MAFFEI, L. (1995). TrkA, TrkB and p75 mRNA expression is developmentally regulated in the rat retina. **Brain Res.** v.704: p. 121-124.

VARELLA, M.H.; CORREA, D.F.; CAMPOS, C.B.L.; CHIARINI, L.B.; LINDEN, R. (1997). Protein kinases selectively modulate apoptosis in the developing retina *in vitro*. **Neurochem Int.** v.31: p. 217-227.

VECINO, E.; CAMINOS, E. (1998). Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. **Gen Pharmac.** V.30:p.305-314.

VECINO, E.; GARCÍA-CRESPO, D.; GARCÍA, M; MARTINEZ-MILLAN, L.; SHARMA, S.C.; CARRASCAL, E. (2002). Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. **Vision Res**. v.42: pp.151-157.

VERGARA, M.N.; ARSENIJEVIC, Y.; DEL RIO-TSONIS K.(2005). CNS regeneration: a morphogen's tale. **J Neurobiol.** v. 64: p.491-507.

VILCECK, J. (2006). Cytokines: Wherefrom and Whereto. In: RANSOHOFF, R. M.; BENVENISTE, E.N. Cytokines and the CNS. **Taylor & Francis Group**. 2^a ed.p.23-38.

VISSE, R.; NAGASE, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res.** v.92: pp.827-839.

VITKOVIC, L.; MAEDA, S.; STEMBERG, E. (2001). Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. **Neuroimmunomodulation.** v.9: p. 295-312.

WANG, G.; LU, C.; LIU, H.; JIN, W.; JIAO, X.; WEI, G.; CHEN, J.; ZHU, Y. (2001). Immunohistochemical localization of interleukin-2 and its receptor subunits $\alpha,\beta \in \gamma$ in the main olfactory bulb of the rat. **Brain Res.** v.893: p.244-252.

WANG, I.M.; LIN, H.; GOLDMAN, S.J.; KOBAYASHI, M. (2004). STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types. **Mol Immunol.** v.41:p.873-884.

WAGUESPACK, P.J.; BANKS, W.A.; KASTIN, A.J. (1994).Interleukin-2 doe not cross the blood-brain barrier by a saturable transport system. **Brain Res Bulletin**. v.34: p.103-109.

WEBER, A.J.; HARMAN, C.D.; VISWANATHAN, S. (2008). Effects of optic nerve injury, glaucoma and neuroprotection on the survival, structure and function of ganglion cells in the mammalian retina. **J Physiol.** v. 18: p.4393-4400.

WICK, K.R.; BERTON, M.T. (2000). IL-4 induces serine phosporylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes. **Mol Immunol.** v.37: p.641-652.

WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F.D. (2008). Untangling the complex web of IL-4 and IL-13 mediated signaling pathways. **Sci Signal.** V.1:p.51-55.

YAMASAKI, E.N.; RAMOA, A.S. (1993). Dendritic remodeling of retinal ganglion cells during development of the rat. **J Comp Neurol.** v. 329: p.277-289.

YE, J.H.; TAO, L.; ZALCMAN, S.S. (2001). Interleukin-2 modulates N-methyl-D-aspartate receptors of native mesolimbic neurons. **Brain Res.** v.16:pp. 241-248.

YIN, Y.; CUI, Q.; LI, Y.; IRWIN, N.; FISHER, D.; HARVEY, A.R.; BENOWITZ, L.I. (2003). Macrophage-derived factor stimulate optic nerve regeneration. **J Neurosci**. v.23: pp.2284-2293.

YIN, Y.; HENZL, M.T.; LORBER, B.; NAKAZAWA, T.; THOMAS, T.T.; JIANG, F.; LANGER, R.; BENOWITZ, L.I. (2006). Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. **Nat Neurosci.** v.9:pp. 843-852.

YOLES, E.; SCHWARTZ, M. (1998). Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. **Exp Neurol.** v.153:pp.1-7.

YOLES, E.; WHEELER, L.A.; SCHWARTZ, M. (1999). α 2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v40:pp.65-73.

YONG, V.W.; KREKOSKI,C.A.; FORSYTH, P.A.; BELL ,R.; EDWARDS, D.R. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS, *Trends Neurosci.* v.21: pp. 75–80.

ZHANG, C.W.; LU, Q.; YOU, S.W.; ZHI, Y.; YIP, H.K.; WU, W. (2005). CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.46:p.1497-1503.

ZAVERUCHA-DO-VALE, C. **Células de medula óssea promovem neuroproteção e regeneração em modelo de lesão no nervo óptico de ratos.** 2006. 145f. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro . Rio de Janeiro, 2006.

ZHAO, W.; XIE, W.; XIAO, Q.; BEERS, D.R.; APPEL, S.H. (2006). Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. **J Neurochem**. 2006 Nov;99(4):1176-87.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo