



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Sílvio De Biase Siqueira Campos

EFEITO DO DESCOLAMENTO DA RETINA DO RATO SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Go α EM CÉLULAS BIPOLARES

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Cirurgia.

Orientador Interno

Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. do Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientadora Externa

Profa. Dra. Belmira Lara da S. A. da Costa

Profa. do Departamento de Neurofisiologia, CCS-UFPE

Siqueira Campos, Silvio De Biase

Efeito do descolamento da retina do rato sobre a expressão da proteína Go α em células bipolares / Silvio De Biase Siqueira Campos. – Recife: O Autor, 2011.

xii + 40 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Carlos Teixeira Brandt

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Retina. 2. Descolamento de retina. 3. Go α . 4. Célula bipolar. I. Brandt, Carlos Teixeira. II. Título.

617.71

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2011-057

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Corrêa Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Corrêa Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Dissertação do Dr. SÍLVIO DE BIASE SIQUEIRA CAMPOS, Aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil e onze na Sala Professor Porto Carreiro no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de Dissertação do Dr. Sílvio de Biase Siqueira Campos, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-Graduação – foi integrada pelos professores: Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. MÁRIO RIBEIRO DE MELO JUNIOR, Doutor do Departamento de Patologia CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: Dr. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, finalmente, externo, Dr. LIANA MARIA VIEIRA DE OLIVEIRA VENTURA, Doutora da Universidade Federal de Minas Gerais; tendo, como orientador interno, o Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A dissertação apresentada pelo Dr. Sílvio de Biase Siqueira Campos versou sobre **“EFEITO DO DESLOCAMENTO DA RETINA DO RATO SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GO α EM CÉLULAS BIPOLARES”**. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com data show, foram realizadas as argüições na seguinte ordem: Prof. Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO, Prof. DR. MÁRIO RIBEIRO DE MELO JUNIOR; todas as argüições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO, menção “APROVADO”, Prof. Dr. MÁRIO RIBEIRO DE MELO JUNIOR, menção “APROVADO”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em assuntos Educacionais, assinado depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 25 de fevereiro de 2011.

Prof. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR

Prof. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO

Prof. MÁRIO RIBEIRO DE MELO JUNIOR

Sra. ISABELA NOGUEIRA PIMENTEL (Técnica em assuntos educacionais)

Dedicatória

A minha esposa **Daniele** e ao meu filho **Vicente**,
pelo apoio e carinho.

Aos meus pais **Terezinha** e **Manoel**,
pelos ensinamentos e espírito de luta.

Agradecimentos

A Professora **Belmira**, pela dedicação incansável na orientação deste estudo.

Ao Professor **Carlos**, pelas colocações sempre pertinentes durante todo curso do mestrado e na orientação desta dissertação.

Aos Professores **Reginaldo**, **Marcelo** e **Rubem**, pelo apoio irrestrito durante a fase de experimentos.

A Funcionária **Zenira** por colaborar na manipulação dos animais utilizados no estudo.

As Instituições **HOPE** e **Fundação Altino Ventura**, em específico aos que dirigem estas, pela minha formação como médico oftalmologista retinólogo e compreensão durante o período de ausência na preparação desta pesquisa.

Normatização

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org>.

Universidade Federal de Pernambuco. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Estrutura de apresentação de dissertação e teses, sob forma de artigos científicos*, conforme 'Proposta dos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde, CCS da Universidade Federal de Pernambuco'. Recife: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Apresentação do problema.....	02
1.2 Objetivos.....	03
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	04
2.1 Experimental.....	05
2.1.1 Degeneração de fotorreceptores da retina.....	05
2.1.1.1 Retinose pigmentar.....	05
2.1.1,2 Descolamento de retina.....	05
2.1.2 Células bipolares.....	06
2.1.3 Receptores Glutamatérgico metabotrópicos.....	07
METODOLOGIA.....	09
3.1 Casuística e local do estudo.....	10
3.2 Delineamento do estudo.....	10
3.3 Procedimentos técnicos.....	10
3.3.1 Anestesia.....	10
3.3.2 Cirurgia.....	10
3.3 Avaliação Imunohistoquímica.....	12
3.4 Captura de imagens.....	13
3.5 Análise estatística.....	13
3.6 Procedimentos éticos.....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSSÃO.....	20

5.1 Aspectos translacionais.....	27
CONCLUSÕES.....	28
PERSPECTIVA.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
FNDC	fator neurotrófico derivado do cérebro
CCG	camada de células ganglionares
FNC	fator neurotrófico ciliar
FTC	fator transformador de crescimento
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	diaminobenzidina
FCF	fator de crescimento de fibroblasto
F	segmento externo fotorreceptores
PGFA	proteína glial fibrilar ácida
RP	retinose pigmentar
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Lista de Figuras

Fig. 1	Lente de imagem direta sobre substância viscoelástica em córnea, para visualização da retina.....	11
Fig. 2	Visualização da retina descolada com bolsão sub-retiniano. Ao lado imagem ultrassonográfica do descolamento, entre marcadores (+/x).....	11
Fig 3	Globo ocular enucleado.....	12
Fig 4.	Córnea, cristalino e retina aderida a coróide-esclera (A, B, C – respectivamente).....	12
Fig. 5.	A - retina controle marcada com GFAP, aumento 20x. B – retina pós 7 dia descolamento, marcada com GFAP, aumento 20x, observado a marcação células de Müller indicado pelas setas. F – segmento externo fotorreceptores – camada nuclear externa, PE – camada plexiforme externa, NI – camada nuclear interna, PI – camada plexiforme interna e CCG – camada de células ganglionares.....	17
Fig. 6.	A - retina controle marcada com <i>Goα</i> , aumento 20x. B – retina pós 7 dias de descolamento, marcada com <i>Goα</i> , aumento 20x. F – segmento externo fotorreceptores, NE – camada nuclear externa, PE – camada plexiforme externa, NI – camada nuclear interna, PI – camada plexiforme interna e CCG – camada de células ganglionares.....	17
Fig 7.	Retina dissecada após 7 dias de descolamento, presença lesão esbranquiçada em região central devido a membrana epi e sub-retiniana extensa (vide seta)	18
Fig 8	Retina dissecada após 7 dias de descolamento, marcação para GFAP. Observar proliferação de células de Müller com formação de membranas para cavidade vítrea (seta). A – aumento de 10x; B – aumento de 20x.....	19

Resumo

Introdução: A proteína Go α , envolvida com a transdução do sinal do receptor metabotrópico para glutamato, denominado mGluR6 é encontrada em células bipolares do tipo ON que são ativadas pelo estímulo luminoso. Um único estudo prévio indicou que podem ocorrer mudanças na expressão da proteína Go α em um modelo experimental de retinose pigmentar, que cursa com uma perda progressiva de fotorreceptores. **Objetivo:** 1) O presente estudo visa testar a hipótese de que a expressão da proteína Go α pode ser modificada após o descolamento de retina como um indicativo de remodelagem sináptica. 2) Analisar a eficácia do modelo experimental de descolamento em induzir proliferação intraretiniana de células de Müller. **Métodos:** Foram estudadas 14 retinas de 7 ratos Wistar adultos, submetidos a descolamento de retina por 7 dias. As retinas controle e descoladas foram processadas por imunohistoquímica para visualização das proteínas Go α e GFAP. A densidade óptica de cada camada após imunomarcagem para Go α foi aferida com o software Image J. **Resultados:** Observou-se proliferação das células de Müller em todas as retinas descoladas, evidenciando a eficácia do modelo experimental adotado em induzir alterações metabólicas na retina interna. Não foi observada diferença significativa na marcação da proteína Go α após o descolamento de retina. **Discussão:** A ausência de modificações na imunoreatividade da proteína Go α na retina após 7 dias de descolamento sugere que as alterações metabólicas induzidas neste período não foram suficientes para alterar a remodelagem sináptica das células bipolares ON, envolvidas com a ativação do estímulo luminoso. Uma análise quantitativa usando técnicas de “Western blotting” será utilizada para corroborar os presentes achados.

Descritores: Retina; Rato; Descolamento da Retina; Go α ; Célula bipolar.

Abstract

Introduction: Go α protein, involved in signal transduction of metabotropic glutamate receptor, mGluR6 is found in the type ON bipolar cells that are activated by light stimulation. One previous study indicated that changes may occur in protein expression Go α in an experimental model of retinitis pigmentosa, which leads to a progressive loss of photoreceptors. **Purpose:** 1) This study aims to test the hypothesis that Go α expression can be modified after retinal detachment as an indicator of synaptic remodeling. 2) To analyze if the experimental model of detachment could induce metabolic reactivity and proliferation of Müller cells. **Methods:** 14 retinas were analyzed from 7 adult Wistar rats submitted to retinal detachment for 7 days. The control and detached retinas were processed by immunohistochemistry for visualization of Go α and GFAP proteins. The optical density of each layer after immunostaining for Go α was measured with the software Image J. **Results:** There was a proliferation of Müller cells in all detached retinas, indicating the effectiveness of our experimental conditions to induce metabolic changes in the inner retina. However, no significant difference in the protein Go α expression was observed after retinal detachment when compared to the control condition. **Discussion:** The absence of changes in immunoreactivity the pattern of Go α expression after 7 days of retinal detachment suggests that the metabolic changes induced in this period were not sufficient to alter the synaptic remodeling of ON bipolar cells, involved in the activation of light stimulus. A quantitative analysis by using western blotting will be performed in order to corroborate the present findings.

Keywords: Retina; Rat; Retinal detachment; Go α ; Bipolar cell.



Introdução

1.1 Apresentação do problema

Degeneração de fotorreceptores retinianos, se causada por descolamento de retina, doenças hereditárias ou envelhecimento, é geralmente acompanhada por notável plasticidade estrutural na forma de prolongamentos aberrantes dos bastonetes remanescentes e ocasionalmente, de axônios de cones com alterações nas conexões estabelecidas pelas células bipolares nos circuitos da retina interna e nos fenótipos moleculares de subtipos de células retinianas¹.

Após descolamento da retina, outra forma de plasticidade estrutural sináptica descrita foi a retração de terminais axonais de bastonetes. Em modelos animais de descolamento seguido de reconexão da retina, foi demonstrado que a retração dos terminais de bastonetes ocorre após o descolamento enquanto que a expansão neurítica dos bastonetes foi observada após a reconexão cirúrgica da retina². Assim, tanto a expansão como a retração axonal são fenômenos que ocorrem em várias regiões no sistema nervoso central adulto e são bem documentados também na retina³.

A proteína $G\alpha$, envolvida com a transdução do sinal do receptor mGluR6 é encontrada em células bipolares do tipo ON^{4,5}. Células bipolares do tipo OFF, por outro lado, expressam os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA^{6,7}. A expressão de receptores glutamatérgicos do tipo mGluR6 em células bipolares do tipo ON é diminuída em camundongos com degeneração de fotorreceptores (modelo experimental de retinose pigmentar)^{8,9}. Não se sabe até o presente, se ocorrem mudanças na expressão da proteína $G\alpha$ após degeneração de fotorreceptores induzida por descolamento de retina.

Por isto, neste estudo, foi explorada a imunoreatividade desta proteína em condições de injúria após o descolamento de retina.

1.2 Objetivos

- ❖ Testar a hipótese de que a expressão da proteína Go α é alterada após o descolamento de retina;
- ❖ Analisar se o modelo de descolamento de retina utilizado é capaz de induzir imunoreatividade de células de Müller como um marcador de alteração metabólica.



Fundamentação Teórica

2.1 Experimental

2.1.1 Degeneração de fotorreceptores da retina

2.1.1.1 Retinose pigmentar

Em retinas de pacientes com retinose pigmentar (RP) foi descrito que bastonetes enviam um número abundante de neuritos com varicosidades contendo vesículas sinápticas ao longo de sua extensão dentro da retina até a membrana limitante interna. A expansão dos prolongamentos dos bastonetes na RP foi acompanhada pela expansão dos prolongamentos de neurônios de segunda e terceira ordem¹⁰. Tal expansão é presumivelmente iniciada pelo crescimento neurítico reativo de fotorreceptores¹.

No presente, a expansão dos prolongamentos de fotorreceptores foi observada em vários tipos de RP, após injúria com laser, em degeneração macular relacionada com a idade e em retinas reconectadas cirurgicamente após descolamento¹¹. Acredita-se que esta reorganização sináptica seja responsável pelas anormalidades que ocorrem na retina interna, frequentemente observadas em doenças retinianas¹²⁻¹⁹. Alguns modelos animais de degeneração da retina também demonstram expansão neurítica de bastonetes¹¹, no camundongo rd1, foi observada expansão neurítica de cones, mas não de bastonetes²⁰.

2.1.1,2 Descolamento de retina

Descolamento de retina é uma importante doença retiniana com separação do epitélio pigmentar da retina sensorial, podendo resultar em perda visual significativa mesmo depois de tratamento cirúrgico com sucesso²¹⁻²⁴. Apesar de

fazer parte do sistema nervoso central, o tecido retiniano difere do cérebro e da medula espinhal quanto às reações e a recuperação após uma agressão tecidual²⁵⁻²⁸. A retina é claramente organizada em camadas alternadas de corpos celulares de neurônios e plexos, de modo que mudanças na organização ou perda de células são facilmente reconhecidas²⁹.

A visão normal depende de uma comunicação intacta entre as células neuronais, gliais, microglias, vasculares e o epitélio pigmentado da retina. O tipo de célula glial predominante na retina são as células de Müller, essas células dispõem-se radialmente atravessando todas as camadas da retina formando suas membranas limitantes, interna e externa, com suas terminações. O corpo celular da glia de Müller localiza-se no terço médio da camada nuclear interna, seu citoplasma se ramifica e estende em processos que envolvem os contatos sinápticos da retina. As interações neuroglias são fundamentais para a fisiologia e homeostase do tecido retiniano, visto que a célula de Müller modula a atividade neuronal da retina³⁰.

2.1.2 Células bipolares

Os eventos que ocorrem ao nível molecular após a perda de fotorreceptores não tem sido bem caracterizados. Células bipolares são classificadas como tipos ON ou OFF, com base em suas respostas fisiológicas diante da luz. Todas as células bipolares de bastonetes são do tipo ON, mas as de cones podem ser dos tipos ON e OFF^{31,32}. Células bipolares do tipo ON expressam receptores de glutamato do tipo metabotrópico (mGluR6) que hiperpolarizam na presença de glutamato^{6,7}.

As células bipolares tipo OFF são hiperpolarizadas na presença do estímulo luminoso, através de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, ocorrendo redução na liberação do glutamato. No escuro ocorre liberação de glutamato e despolarização destas células. De modo que na via OFF não ocorre mudança do sinal do estímulo excitatório proveniente do fotorreceptor, sendo chamada de sinapse conservadora de sinal. Nas bipolares do tipo ON a sinapse é inversora do sinal, no escuro ocorre liberação de glutamato dos fotorreceptores e hiperpolarização destas células. Com a luz há uma redução do glutamato e a despolarização da bipolar ON³³.

2.1.3 Receptores Glutamatérgico metabotrópicos

Os receptores de glutamato metabotrópicos 6 (mGluR6), de ação lenta, mobilizam vias de segundo-mensageiros, o que se deve à ligação as enzimas da membrana plasmática do neurônio.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central³⁴. Foram relatadas altas concentrações de glutamato em fotorreceptores e células bipolares. Posteriormente, foi descrita a presença de receptores glutamatérgicos em outras células da retina de vertebrados³⁵.

A resposta hiperpolarizante ao glutamato é incomum e mediada por um receptor que é expresso apenas na retina. Este receptor foi identificado como o mGluR6, um em uma série de oito receptores metabotrópicos glutamatérgicos, chamados assim devido ao fato da ativação destes receptores levar a uma cascata de sinalizadores intracelulares³⁶. A importância do estudo destes receptores em condições de injúria como o descolamento de retina, é justificada

pela sua relevância na definição do estímulo proveniente dos fotorreceptores, o que permite uma maior resolução e percepção de contraste.

A proteína G α está presente em vários tecidos, inclusive sendo a proteína mais abundante no cérebro. Em animais deficientes nesta proteína não foram observadas alterações estruturais da retina, porém observou-se que a resposta funcional das células bipolares ON diante do estímulo luminoso requer esta subunidade³⁷. A proteína G α não é exclusiva das células bipolares, as células amácrinas também podem expressar esta proteína apesar de possuírem receptores metabotrópicos diferentes do mGluR6. Nas células bipolares ON, essa proteína G α está presente no receptor mGluR6 com papel fundamental na resposta funcional ao estímulo luminoso³⁸.



UFPE

Metodologia

3.1 Casuística e local do estudo

Foram estudadas 14 retinas de sete ratos Wistar, idade 60-90 dias, com peso variando entre 200 a 300g, submetidos ao descolamento de retina no período de 2010 a 2011. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia - CCB, com a colaboração do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Nutrição da UFPE.

3.2 Delineamento do estudo

Estudo prospectivo, analítico e experimental.

3.3 Procedimentos técnicos

3.3.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com dose inalatória de Isoflurano (Isoforine[®], Cristália) inicialmente, seguido por injeção intraperitoneal de Xilazina (Rompum[®], Bayer) e Ketamina (Vetanarcol[®], König) na dose de 12mg/kg e 60mg/kg, respectivamente.

3.3.2 Cirurgia

Foram instiladas gotas de colírio midriático, tropicamida 1% (Ciclomidrin[®], Latinofarma), além de colírio anestésico oxibuprocaína (Oximest[®], Latinofarma). A visualização do fundo do olho foi realizada com a magnificação de uma lupa cirúrgica (DF Vasconcellos LTDA[®]) além de uma lente plana de imagem direta (VFLATSSVD, VOLK[®]). O espaço entre a córnea e a superfície da lente foi preenchido com viscoelástico (Metilcelulose 2%, OPTHALMOS[®]) (Figura 1).

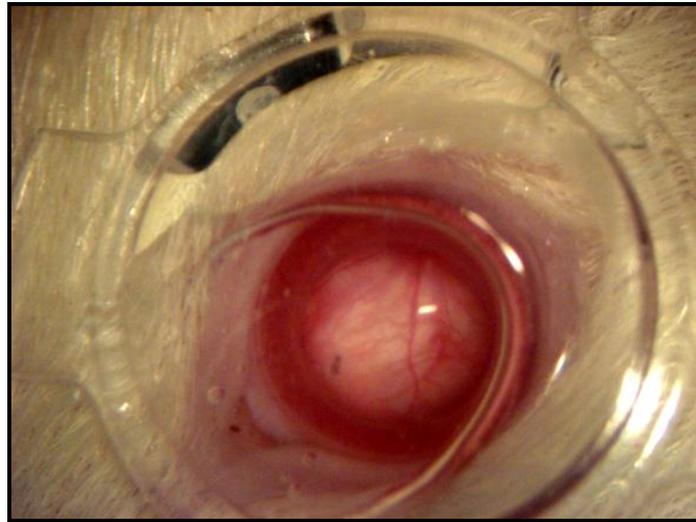


Fig. 1. Lente de imagem direta sobre substância viscoelástica em córnea, para visualização da retina.

Através de penetração no globo ocular via escleral, imediatamente posterior ao cristalino, com uma agulha calibre 29G (BD Ultra-Fine®), foi realizado o descolamento de retina com injeção de 10µl de solução de 0,2% de hialuronato de sódio (hialuronato de sódio 2,0% diluído em solução salina balanceada, OPTHALMOS®) no espaço entre a retina sensorial e o epitélio pigmentar, modelo de descolamento semelhante ao descrito anteriormente³⁹. O descolamento foi realizado até observação do bolsão com palidez retiniana em mais de 50% da retina (Figura 2).

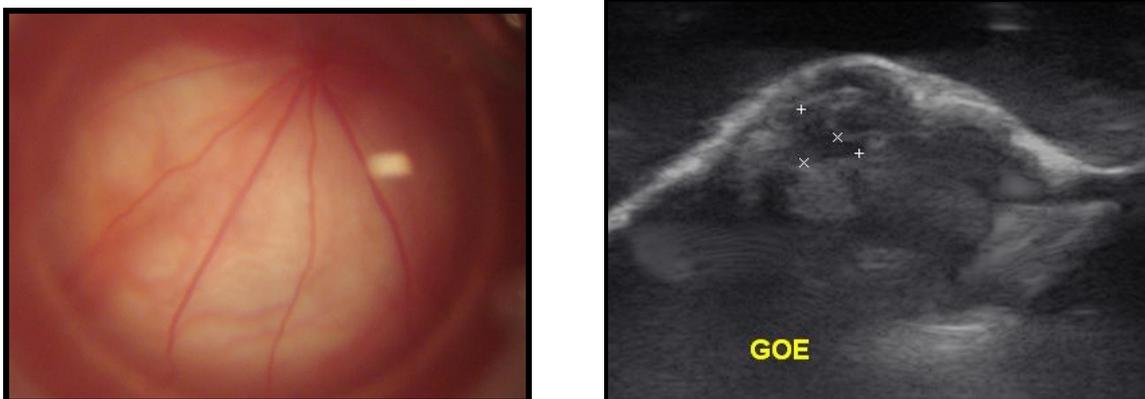


Fig. 2. Visualização da retina descolada com bolsão sub-retiniano. Ao lado imagem ultrassonográfica do descolamento, entre marcadores (+/x).

O hialuronato de sódio é necessário para manter a retina descolada, após 7 dias estes animais foram novamente anestesiados conforme descrito acima e gentilmente enucleados (Figuras 3 e 4). Todos os descolamentos foram realizados no olho esquerdo e no olho direito (controle) foi realizada a penetração com agulha na cavidade vítrea, porém sem a injeção sub-retiniana de hialuronato.



Fig 3. Globo ocular enucleado.

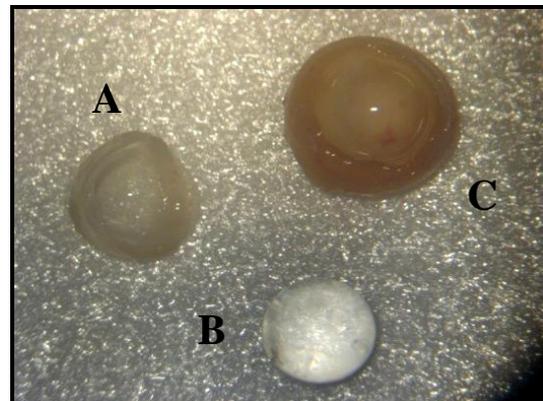


Fig 4. Córnea, cristalino e retina aderida a coróide-esclera (A, B, C – respectivamente)

3.3 Avaliação Imunohistoquímica

Após a enucleação, foi realizada uma abertura na córnea a fim de que os globos oculares fossem melhor fixados em paraformaldeído 4% durante 1 hora. Em seguida, os globos foram lavados em tampão fosfato 0,1%, as retinas dissecadas da esclera e submetidas a crioproteção em soluções de sacarose 10%, 20% e 30% de forma consecutiva, até que a retina decantasse em cada uma destas soluções. Secções transversais de 20 μ m da retina, de olhos controle e olhos submetidos ao descolamento, foram realizadas utilizando-se um criostato (Leica[®]) e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Anticorpos primários contra *Go α* (Chemicon International[®]) e GFAP (proteína glial fibrilar ácida, Sigma[®])

foram utilizados na diluição de 1:2000. Anticorpos secundários biotinizados (1:200) seguidos do kit avidina-biotina (ABC, Vector) foram seqüencialmente usados. A visualização foi realizada com o uso do cromógeno diaminobenzidina (DAB).

3.4 Captura de imagens

Imagens digitalizadas foram adquiridas utilizando-se um microscópio Leica[®]. A intensidade média de marcação entre regiões escaneadas verticalmente através de todas as camadas da retina foi feita usando-se o software Image J (NIH,USA). A densidade óptica, que é definida pelo logaritmo decimal do quociente entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz emergente, foi aferida em cada camada da retina após a marcação pelo anti-Goα. Possibilitando comparar as retinas controle e descoladas, para determinar se a expressão desta proteína é limitada a camada das células bipolares do tipo ON ou se estende a outras células.

A camada nuclear externa serviu de fator de correção para diferenças de coloração na captura das imagens, de modo que todas as camadas foram subtraídas da nuclear externa antes da comparação entre os olhos.

3.5 Análise estatística

Foi aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. O software estatístico empregado foi o SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) – versão 18.0. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.6 Procedimentos éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), de acordo com os princípios éticos da experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).



UFPE

Resultados

RESULTADOS

O modelo de descolamento de retina utilizado foi eficaz em separar a retina sensorial do epitélio pigmentar, tanto por meio da visualização do fluido sub-retiniano durante o procedimento, mas principalmente, pela observação da proliferação das células de Muller nas retinas descoladas (Figura 5). Esse padrão de proliferação de Muller foi visualizado em todas as retinas que sofreram descolamento.

Não houve diferença na densidade óptica das camadas da retina, quando comparado o olho controle com olho que sofreu descolamento de retina, após a marcação com a anti-Go α (Figura 6, tabela 1).

Foi observado a presença de membranas epiretinianas vistas macroscopicamente (Figura 7) e a maior imunoreatividade de células de Müller após marcação com GFAP (Figura 8).

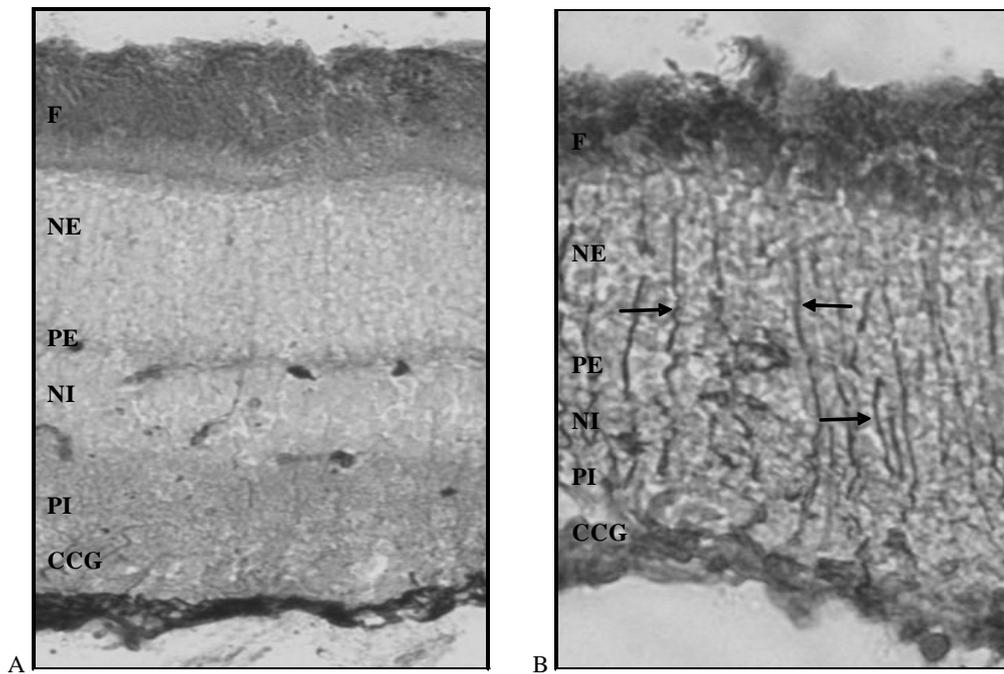


Fig. 5. A - retina controle marcada com GFAP, aumento 20x. B – retina pós 7 dias de descolamento, marcada com GFAP, aumento 20x, observado a marcação nas células de Müller indicado pelas setas. F – segmento externo fotorreceptores, NE – camada nuclear externa, PE – camada plexiforme externa, NI – camada nuclear interna, PI – camada plexiforme interna e CCG – camada de células ganglionares.

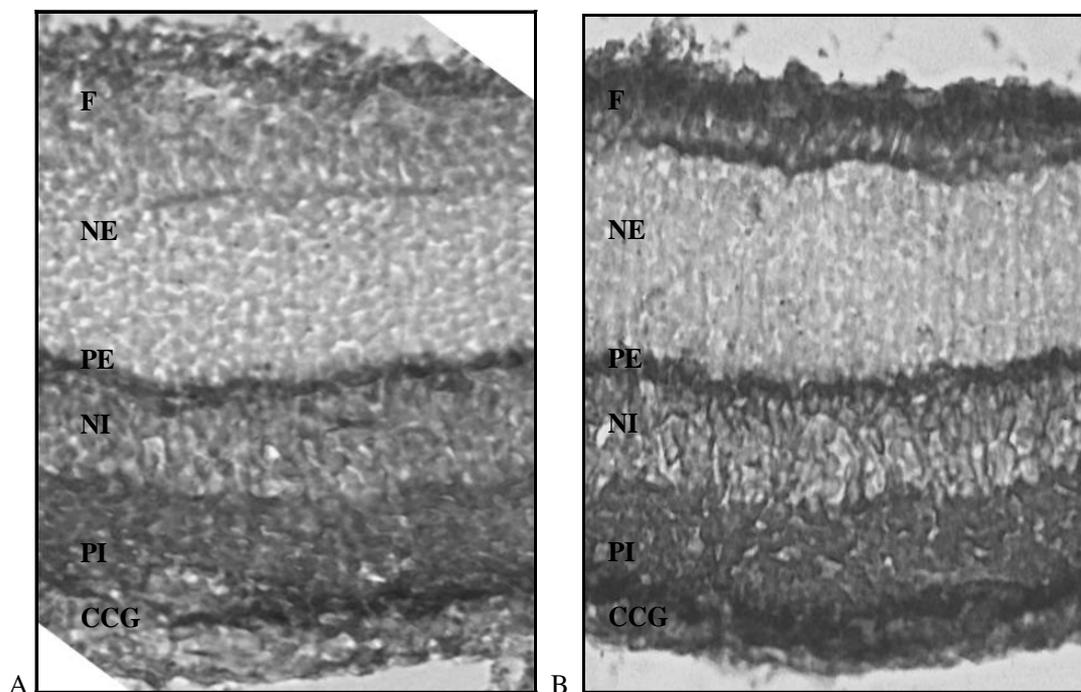


Fig. 6. A - retina controle marcada com $Go\alpha$, aumento 20x. B – retina pós 7 dias de descolamento, marcada com $Go\alpha$, aumento 20x. F – segmento externo fotorreceptores, NE – camada nuclear externa, PE – camada plexiforme externa, NI – camada nuclear interna, PI – camada plexiforme interna e CCG – camada de células ganglionares.

Tabela 1. Medidas das densidades ópticas de cada camada da retina marcada com Goα.

	N (7)	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor
FOTO OD		72.84	78.13	17.55	44.24	90.56	>0,99
FOTO OE		72.28	77.32	34.95	33.34	112.87	
CCG OD		90.56	96.07	22.42	48.24	115.98	0,82
CCG OE		92.56	82.27	21.19	71.17	122.90	
PI OD		81.55	85.14	20.18	39.01	101.73	0,68
PI OE		83.55	85.94	20.26	58.36	106.79	
NI OD		53.63	51.67	14.66	27.97	72.71	0,93
NI OE		48.83	54.32	22.72	4.08	74.60	
PE OD		80.79	83.55	7.66	72.35	92.71	>0,99
PE OE		78.27	80.62	21.95	34.53	10.40	

OD - Olho direito (controle). OE – Olho esquerdo (descolamento da retina). FOTO – segmento externo fotorreceptores, CCG – camada de células ganglionares, PI –camada plexiforme interna, NI – camada nuclear interna e PE – camada plexiforme externa.

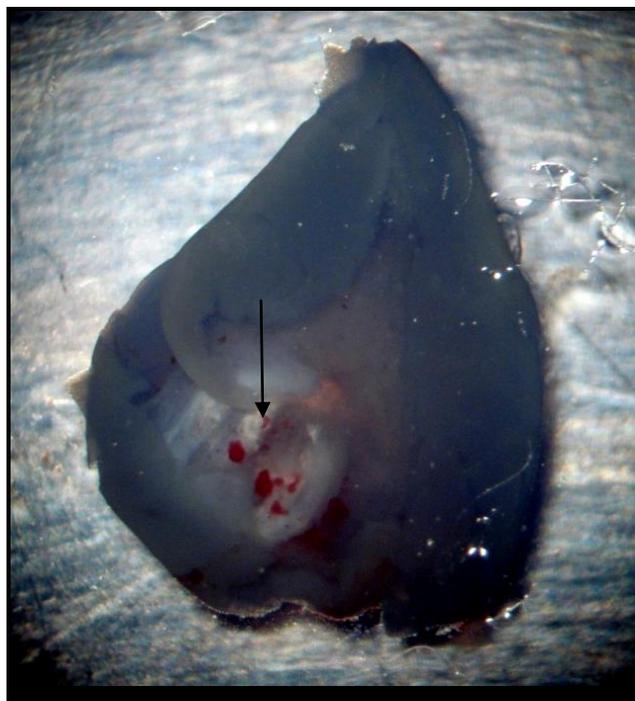


Fig 7. Retina dissecada após 7 dias de descolamento, presença lesão esbranquiçada em região central devido a membrana epi e sub-retiniana extensa (vide seta)

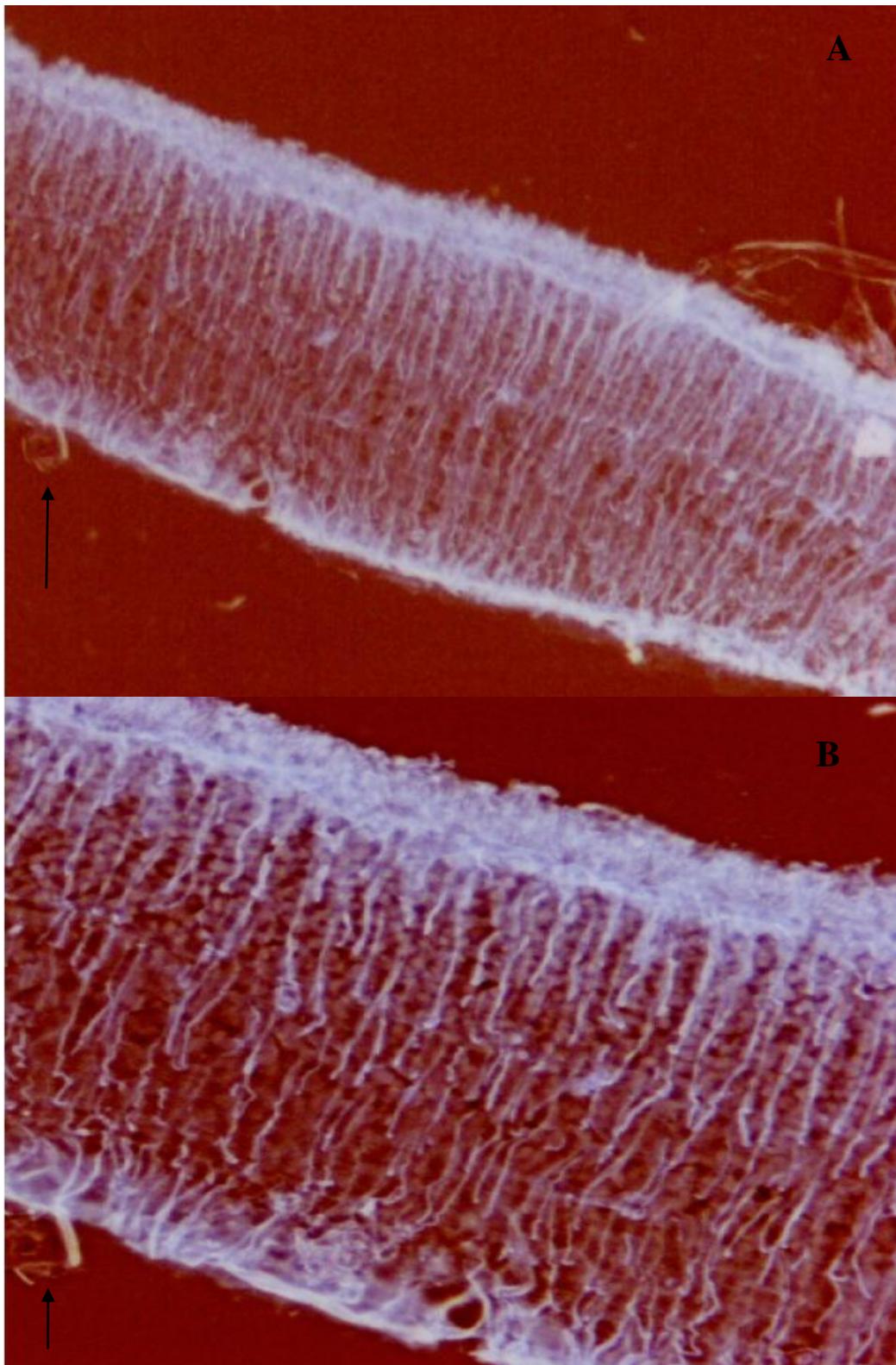


Fig 8. Retina dissecada após 7 dias de descolamento, marcação para GFAP. Observar proliferação de células de Müller com formação de membranas para cavidade vítrea (seta). A – aumento de 10x; B – aumento de 20x



UFPE

Discussão

O descolamento da retina da superfície do epitélio pigmentar resulta não apenas na separação da camada de células fotorreceptoras da superfície apical do epitélio pigmentar, mas também, na expansão do espaço sub-retiniano e uma mudança em sua composição molecular, iniciando assim uma complexa série de mudanças moleculares e celulares na retina e no epitélio pigmentar⁴⁰. A gravidade destas mudanças degenerativas é claramente relacionada com a duração do descolamento, levando a sérias conseqüências para o olho afetado. A reconexão da retina com o epitélio pigmentar pode restaurar pelo menos parcialmente a visão, levando a crer que algumas destas alterações anormais sejam evitadas ou até mesmo revertidas após a retina retornar a posição de origem⁴¹. O conhecimento de eventos celulares que ocorrem após o descolamento de retina vem de modelos experimentais de descolamento em animais. Devido a escassez de tecido retiniano humano apropriado para estudo, apenas recentemente, estudos histopatológicos em descolamentos de retina em humanos têm sido descritos^{42,43}.

Modelos experimentais têm sido desenvolvidos em uma variedade de espécies de roedores a primatas, apesar de diferirem quanto ao método do descolamento eles apresentam resultados similares quanto às alterações pós descolamento². Foram realizadas pequenas alterações no procedimento cirúrgico atual em relação a outros estudos, visto que foi utilizada uma agulha de calibre 29G para realizar a penetração na retina e promover o descolamento, enquanto que há relatos na literatura da utilização de uma micropipeta de 100µm, acoplada a um micromanipulador para este procedimento²⁹. A substituição pela agulha de 29G requer um maior treinamento do cirurgião, a fim de reduzir complicações

como, por exemplo, o contato da agulha com o cristalino ou até mesmo a penetração na coróide. A realização da penetração intra-vítrea da agulha de 29G no olho controle, sem a injeção sub-retiniana, foi realizada como controle para demonstrar que a presença da reatividade das células de Müller ocorreu não pelo traumatismo e/ou reação inflamatória do procedimento, mas sim pela separação do epitélio pigmentar e da retina neurosensorial após o descolamento de retina.

A vantagem desta técnica de descolamento, com infusão de hialuronato no espaço sub-retiniano, é a possibilidade de controlar o tempo de permanência deste líquido. A escolha do período de sete dias de descolamento ocorreu devido ao conhecimento de reatividade das células de Müller mesmo em lesões retinianas de curta duração, a partir de 3 dias já existe resposta metabólica destas células⁴⁴. Como não há relatos da proteína Go α com descolamento de retina, sete dias foi o período de escolha para uma primeira avaliação. Existem descrições de descolamentos de retina experimentais de 1 até 28 dias de duração^{45,46}. No presente estudo, confirmamos por meio de ultrassom, que o presente protocolo de descolamento utilizado mantém o bolsão sub-retiniano mesmo após 21 dias, o que permitirá a complementação dos achados atuais após um período maior de descolamento. A presença de imunoreatividade das células de Müller a proteína GFAP em toda a extensão da retina, comprova a presença do descolamento, o qual, poderá acarretar em proliferação celular adjacente a área descolada. Com isso, apesar da análise por meio de ultrassom não ser uma rotina em trabalhos anteriores, será de grande valia para aferir a área do descolamento, a altura do bolsão sub-retiniano e a duração deste. As mudanças decorrentes do descolamento de retina são geralmente em regiões localizadas, principalmente

quando ocorrem por um período curto de tempo. Tais mudanças poderão acarretar em uma perda de visão importante quando acometem a mácula, região central da retina, onde mesmo uma pequena lesão da retina resulta em um efeito deletério profundo. Além disto, a altura do bolsão macular também pode ser um indicador da gravidade. A presença do descolamento macular é conhecido por produzir distúrbios na acuidade, metamorfopsia e na visão de cores que persistem mesmo após o sucesso anatômico²¹. Deste modo, a melhora funcional após o descolamento de retina pode ser comprometida devido a alterações moleculares intra-retinianas induzidas pela reorganização sináptica⁴⁷.

A utilização do rato albino da linhagem Wistar, foi justificada por ser um mamífero de fácil manipulação, baixo custo e resistente a infecções pós-operatórias. Tais características fazem com que estes animais sejam escolhidos com frequência para protocolos iniciais em pesquisas. Em estudos anteriores estes animais experimentais já foram utilizados para avaliar a retina após lesão do epitélio pigmentar^{8,9}. Foram também descritas alterações estruturais e funcionais semelhantes, após o descolamento de retina experimental em gatos e em amostras da retina descolada de humanos⁴⁴. O estabelecimento do presente modelo experimental de descolamento em ratos, representa uma etapa preliminar a respeito de futuros estudos a serem realizados no nosso laboratório em primatas do Novo Mundo (sagüi *Callitrix jacchus jacchus*), os quais apresentam um maior percentual de cones e de tipos de células bipolares. Existem aproximadamente 9-12 tipos de células bipolares de cones em mamíferos (primatas, coelhos, gatos e ratos) que vêm sendo estudadas. Em contraste com a via das bipolares de cones, a via de bastonetes possui apenas um tipo de célula

bipolar, o qual é distinto morfológico e fisiologicamente podendo ser ativada por menores níveis de luminosidade. As bipolares de bastonetes são numerosas possuem uma densidade três vezes maior que qualquer bipolar de cone^{48,49}.

A presença de extensa membrana epi e sub-retiniana nos olhos de alguns animais que sofreram o descolamento pode ser observada macroscopicamente devido à importante proliferação de células de Müller em consequência da lesão neuronal iniciada pelo descolamento de retina⁵⁰⁻⁵². Estudos anteriores vêm demonstrando a proliferação destas para o espaço sub-retiniano e mesmo para a cavidade vítrea, estando esta última relacionada com a proliferação vítreo-retiniana que é um dos principais fatores de redescolamento de retina pós-cirúrgico em humanos^{44,22-24}. No presente estudo, o modelo experimental de descolamento da retina foi eficaz em induzir a imunorreatividade das células de Müller à proteína GFAP, o que além de indicar uma ativação metabólica destas células sugere proliferação intra-retiniana. Tal reatividade das células de Müller geralmente vem acompanhada da liberação de várias substâncias tróficas as quais podem ser benéficas, com funções neuroprotetoras enquanto outras podem induzir efeitos deletérios ao tecido⁴⁴.

Um grande número de mutações de fotorreceptores, que acometem a cascata da fototransdução, levam a degeneração destes em condições de enfermidades como a RP. O defeito frequentemente acomete os bastonetes, mas eventualmente, cones e bastonetes estão degenerados, com consequências na organização da retina remanescente. A retina interna requer estímulos dos fotorreceptores para manter sua estrutura bem organizada. Quando ocorre a perda do estímulo, os segundos neurônios, como as células bipolares de

bastonetes, produzem novos dendritos que se espalham fazendo vários contatos inapropriados. Uma consequência desta reorganização neural é a dificuldade de funcionar de maneira coerente diante dos sinais luminosos⁵⁰.

Algumas substâncias que agem promovendo a sobrevivência dos fotorreceptores, são capazes de manter as células em um estado mitótico quiescente, sustentando a diferenciação fenotípica dos neurônios retinianos e prevenindo eventos secundários como a fibrose sub-retiniana e a retinopatia vítreo-proliferativa. Tais substâncias ativas podem ter um valor terapêutico significativo no tratamento adjunto à cirurgia do descolamento de retina. Entre estes fatores poderíamos citar os fatores de crescimento de fibroblastos (FCF-1 e FCF-2), fator neurotrófico derivado do cérebro (FNDC), fator neurotrófico ciliar (FNC), fator transformador de crescimento-alfa (FTC-alfa), beta interleucina-1, neurotrofina-3 e 4^{53,54}. Com a definição da eficácia do método atual de descolamento e a presença destas membranas após o período de 7 dias, surge a possibilidade de avaliar alguns destes fatores na inibição dos achados aqui descritos.

Em mamíferos a proteína Go α está presente nos dendritos primários, no corpo das células bipolares e nos axônios que cruzam a camada plexiforme interna, visualiza-se nesta camada uma marcação difusa⁷. Foi observada uma marcação semelhante no presente estudo, porém, alterações no padrão de imunorreatividade à proteína Go α não foi encontrado na retina do rato após 7 dias de descolamento. Em um estudo prévio utilizando um modelo experimental de RP em camundongos, foi descrito uma redução da imunoreatividade ao receptor metabotrópico mGluR6⁸. Além disto, em estudos recentes realizados pelo prof.

Robert Jardine Clarke em camundongos mutantes com degeneração de fotorreceptores, foi observado um aumento na expressão da proteína Go α tanto na camada nuclear interna como nas camadas plexiformes interna e externa. Porém, nestes estudos anteriores, a degeneração de fotorreceptores ocorreu desde o nascimento, com repercussões sobre o desenvolvimento das células bipolares. É possível que alterações metabólicas expressivas, decorrentes da progressiva degeneração de fotorreceptores ocorram após um período maior de descolamento da retina. Neste sentido, alguns experimentos em andamento visam testar esta hipótese, analisando as repercussões após 21 dias de descolamento.

Já foi descrito na literatura que a proteína PKC alfa, presente em corpos celulares e dendritos de células bipolares de bastonetes, projeta-se em direção à camada nuclear externa após três dias de descolamento de retina experimental⁴⁶. Considerando que as proteínas PKC e Go α co-localizam nas mesmas células bipolares, os presentes achados sugerem que as duas proteínas podem ter a sua expressão modificada por fatores distintos, tornando-se necessário verificar potenciais efeitos após um período maior de descolamento da retina. Experimentos preliminares realizados com seis animais mostraram que o protocolo de descolamento utilizado é capaz de manter a retina desconectada por 21 dias, o que está sendo quantificado por ultrassom. Possivelmente uma análise quantitativa dos níveis de Go α a partir da técnica de “Western blotting” será necessária para corroborar os presentes achados.

5.1 Aspectos translacionais

Na tentativa de minimizar a perda visual que ocorre após a lesão dos fotorreceptores, têm sido estudadas drogas que bloqueiam a retração axonal, após o descolamento de retina experimental *in vitro*, reduzindo a lesão sináptica que ocorre principalmente entre os fotorreceptores e as células bipolares após o descolamento⁵⁵. Pesquisas em *in vivo* apontam o surgimento de novos fatores de prognóstico visual após o descolamento de retina como a dosagem plasmática e no humor vítreo da endotelina (IR-ET-1), em seres humanos^{56,57}. De modo que os achados em pesquisas com animais de diferentes linhagens, visam contribuir para o entendimento destes resultados.

A análise de mecanismos moleculares envolvidos com os fotorreceptores e as células bipolares que foi desenvolvida no presente estudo visa compreender melhor os fatores que estão envolvidos com a formação de sinapses aberrantes entre fotorreceptores e células da retina interna. Tais sinapses aberrantes vêm sendo descritas em modelos de retinose pigmentar bem como após transplante de bastonetes⁴⁴. Acreditamos que a compreensão destes mecanismos moleculares de reatividade celular diante do descolamento da retina possa contribuir para a busca de alternativas de recuperação funcional da visão.



Conclusões

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

1. O descolamento da retina por 7 dias não induz modificação na expressão da proteína Go α nas camadas nucleares e plexiformes da retina de ratos albinos;
2. O modelo de descolamento de retina utilizado é eficaz em gerar imunoreatividade de células de Müller, indicando alteração metabólica no tecido.



UFPE

Perspectiva

Com o estabelecimento do protocolo de descolamento da retina desenvolvido no presente estudo, serão realizadas etapas experimentais futuras que visam:

1. Analisar os efeitos do descolamento da retina por períodos de 21 e 28 dias;
2. Quantificar os níveis protéicos da proteína Go α utilizando a técnica de “Western blotting” em homogenados de retinas;
3. Avaliar o nível de proliferação das células de Muller utilizando o marcador de proliferação celular “Doublecortin”;
4. Avaliar a degeneração de fotorreceptores a partir de marcadores moleculares de apoptose como a presença da enzima caspase 3;
5. Realizar o protocolo experimental em coelhos e primatas do Novo Mundo com percepção cromática distinta do rato albino, no sentido de investigar se a distribuição diferenciada de cones e bastonetes pode alterar a remodelagem molecular induzida pelo descolamento da retina.



Referências Bibliográficas

1. Marc RE, Jones BW, Watt CB. 2006. Retinal Remodeling: Circuitry Revisions Triggered by Photoreceptor Degeneration. (Eds) Pinaud, R., Tremere, L.A., De Weerd, P. In: *Plasticity in the Visual System*. New York: Springer. p 33-34.
2. Lewis GP, Fisher SK, Linberg KA, Verardo MR. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Prog Retin Eye Res* 2005;24(3):395-431.
3. Luo L, O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:127-156.
4. Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, et al. Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 1995;80(5):757-765.
5. Vardi N. Alpha subunit of Go localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 1998;395(1):43-52.
6. Zhang J, Wu SM. Goalpha labels ON bipolar cells in the tiger salamander retina. *J Comp Neurol* 2003;461:276-289.
7. Brandstatter JH, Koulen P, Wassle H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res* 1998;38(10):1385-1397.
8. Strettoi E, Pignatelli V. Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(20):11020-11025.
9. Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res* 2003;43(8):867-877.

10. Fariss RN, Li ZY, Milam AH. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2000;129(2):215-223.
11. Townes-Anderson E, Zhang N. 2006. Synaptic Plasticity and Structural Remodeling of Rod and Cone Cells. (Eds) Pinaud, R., Tremere, L.A. and De Weerd, P. In: *Plasticity in the Visual System*. New York: Springer. p 13-32.
12. Banin E, Cideciyan AV, Aleman TS, Petters RM, Wong F, Milam AH, Jacobson SG. Retinal rod photoreceptor-specific gene mutation perturbs cone pathway development. *Neuron* 1999;23(3):549-557.
13. Cideciyan AV, Jacobson SG. Negative electroretinograms in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(12):3253-63.
14. Falsini B, Iarossi G, Porciatti V, Merendino E, Fadda A, Cermola S, Buzzonetti L. Postreceptor contribution to macular dysfunction in retinitis pigmentosa. *Invest phthalmol Vis Sci* 1994;35(13):4282-90.
15. Hood DC, Birch DG. Abnormalities of the retinal cone system in retinitis pigmentosa. *Vision Res* 1996;36(11):1699-1709.
16. Hood DC, Greenstein V. Models of the normal and abnormal rod system. *Vision Res* 1990;30(1):51-68.
17. Milam AH, Li ZY, Cideciyan AV, Jacobson SG. Clinicopathologic effects of the Q64ter rhodopsin mutation in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;7(5):753-765.
18. Sieving PA. Photopic ON- and OFF-pathway abnormalities in retinal dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1993;91:701-773.

19. Tam BM, Xie G, Oprian DD, Moritz OL. Mislocalized rhodopsin does not require activation to cause retinal degeneration and neurite outgrowth in *Xenopus laevis*. *J Neurosci* 2006;26(1):203-209.
20. Fei Y. Cone neurite sprouting: an early onset abnormality of the cone photoreceptors in the retinal degeneration mouse. *Mol Vis* 2002;8:306-314.
21. Burton TC. Recovery of visual acuity after retinal detachment involving the macula. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1982;80:475–497.
22. Tani P, Robertson DM, Langworthy A. Rhegmatogenous retinal detachment without macular involvement treated with scleral buckling. *Am J Ophthalmol.* 1980;90:503–508.
23. Tani PD, Robertson DM, Langworthy A. Prognosis for central vision and anatomic reattachment in rhegmatogenous retinal detachment with macula detached. *Am J Ophthalmol.* 1981;92:611–620.
24. Chang SD, Kim IT. Long-term visual recovery after scleral buckling procedure of rhegmatogenous retinal detachment involving the macula. *Korean J Ophthalmol.* 2000;14:20–26
25. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994;4:229–237.
26. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2004;15:415–436.
27. Wilhelmsson U, Bushlong EA, Price DL, et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:17513–17518.

28. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50:427–434.
29. Verardo MR, Lewis GP, Takeda M, Linberg KA, Byun J, et al. Abnormal reactivity of muller cells after retinal detachment in mice deficient in GFAP and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3659-65.
30. Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996;19:307-12.
31. Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The rd mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Prog Retinal Eye Res* 1994;13:31–64.
32. Wässle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 1991;71:447–480.
33. Slaughter MM, Miller RF. 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science*. 1981;211(4478):182-5.
34. Mayer M. L., Viklicky L. Jr. & Sernegor, E. A physiologist's view of the N-Methyl-D-Aspartate receptor: an allosteric ion channel with multiple regulatory sites. *Drug Dev. Res.* V.17, p.263-280. 1989.
35. Watkins, J. C., P. Krosgaard-Larsen & T. Honore. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci*, v.11, n.1, Jan, p.25-33. 1990.

36. Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell*. 1994;77(3):361-9.
37. Dhigra A, Lyubarsky A, Jiang M, Jr EN, Birnbaumer L, et al. The light response of ON bipolar neurons requires $G\alpha$. *J Neurosci*. 2000;20(24):9053-58.
38. Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, et al. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem*. 1994;269(2):1231-36.
39. Matsumoto B, Hale IL. Preparation of retinas for studying photoreceptors with confocal microscopy. *Methods Neurosci*. 1993;15:54-71.
40. Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH. Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(6):1739-48.
41. Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, Leitner WP, Linberg KA, Fisher SK. The ability of rapid retinal reattachment to stop or reverse the cellular and molecular events initiated by detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2412-20.
42. Nork TM, Millecchia LL, Strickland BD, Linberg JV, Chao GM. Selective loss of blue cones and rods in human retinal detachment. *Arch Ophthalmol*. 1995;113(8):1066-73.

43. Wilson DJ, Green WR. Histopathologic study of the effect of retinal detachment surgery on 49 eyes obtained post mortem. *Am J Ophthalmol.* 1987;103(2):167-79.
44. Fisher SK, Lewis GP. Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res.* 2003;43(8):887-97.
45. Eibl KH, Lewis GP, Betts KE, Gandorfer A, Kampik A, Fisher SK. The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:1305–11.
46. Lewis GP, Linberg KA, Fisher SK. Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(2):424-34.
47. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:2404–16.
48. Boycott BB, Wässle H. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci.* 1991;3(11):1069-1088.
49. Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2004;469(1):70-82.
50. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22:607-655.

51. Lewis GP, Chapin EA, Luna G, Linberg KA, Fisher SK. The fate of Müller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. *Mol Vis.* 2010;16:1361-72.
52. Fisher SK, Stone J, Rex TS, Linberg KA, Lewis GP. Experimental retinal detachment: a paradigm for understanding the effects of induced photoreceptor degeneration. *Prog Brain Res.* 2001;131:679–98.
53. Zhao C, Yasumura D, Li X, Matthes M, Lloyd M, Nielsen G, Ahern K, Snyder M, Bok D, Dunaief JL, LaVail MM, Vollrath D. mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):369-83.
54. Lavail MM, Nishikawa S, Duncan JL, Yang H, Matthes MT, Yasumura D, Vollrath D, Overbeek PA, Ash JD, Robinson ML. Sustained delivery of NT-3 from lens fiber cells in transgenic mice reveals specificity of neuroprotection in retinal degenerations. *J Comp Neurol.* 2008;511(6):724-35.
55. Fontainhas AM, Townes-Anderson E. RhoA Inactivation Prevents Photoreceptor Axon Retraction in an In Vitro Model of Acute Retinal Detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):579-87.
56. Roldán-Pallarés M, Sadiq-Musa A, Rollin R, Bravo-Llatas C, Fernández-Cruz A, Fernández-Durango R. Retinal detachment: visual acuity and subretinal immunoreactive endothelin-1. *J Fr Ophthalmol.* 2008;31(1):36-41.
57. Roldán-Pallarès M, Musa AS, Bravo-Llatas C, Fernández-Durango R. Preoperative duration of retinal detachment and subretinal immunoreactive

endothelin-1: repercussion on logarithmic visual acuity. Graefes Arch Clin
Exp Ophthalmol. 2010;248(1):21-30.