

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

BIBIANA MARIA LOBO DE FRANÇA

TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
CAMUNDONGO COM LESÃO RETINIANA

Porto Alegre

2010

BIBIANA MARIA LOBO DE FRANÇA

TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
CAMUNDONGO COM LESÃO RETINIANA

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta

Porto Alegre

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

F814t França, Bibiana Maria Lobo de.

Transplante de células mononucleares da medula óssea em camundongo com lesão retiniana / Bibiana Maria Lobo de França. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

87 f.:graf.;il.;tab. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências.

1. DEGENERAÇÃO RETINIANA. 2. TRANSPLANTE DE CÉLULAS. 3. CÉLULAS-TRONCO. 4. CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA. 5. ELETORRETINOGRAFIA. 6. ESTUDOS EXPERIMENTAIS. I. DaCosta, Jaderson Costa. II. Título.

CDD 617.73
NLM WW 270

Bibliotecária Responsável:
Sabrina Caimi Silva da Costa
CRB 10/1606

BIBIANA MARIA LOBO DE FRANÇA

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM
CAMUNDONGO COM LESÃO RETINIANA**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em _____, de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jefferson Braga Silva – PUCRS

Prof. Dr. Dario Francisco Guimarães de Azevedo – PUCRS

Prof. Dr. Jacó Lavinsky – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pela oportunidade de realizar meu Mestrado sob sua orientação e por ter possibilitado tantos aprendizados.

Aos colegas Daniel Rodrigo Marinowic e Simone de Paula, pela contribuição e dedicação a este trabalho.

Aos professores Dario Francisco Guimarães de Azevedo e Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, e à pós-graduanda Gabriela Lourençon Ioshimoto por toda a ajuda com a eletrorretinografia.

Ao Ricardo Vaz Breda e à Zuzete Pires, pela ajuda técnica nos experimentos. A todos os funcionários da PUCRS e do Hospital São Lucas que, gentilmente, colaboraram com a parte técnica do trabalho.

Às colegas Caroline Calice da Silva, Elisa Lettnin Kaminski, Gianina Teribele Venturin, Mariana Marczyk Santos e ao colega Samuel Greggio, pela troca de idéias, experiências e conhecimentos no cotidiano do laboratório. Agradeço também às colegas Gabriele Goulart Zanirati, Gleice Monteiro Reder e Pâmella Nunes Azevedo, pelo companheirismo e disponibilidade.

À Daniela Souza de Abreu, à Nelcy Nory Arndt Luiz e à Simone Denise Salamoni, pela disposição em ajudar sempre.

Às amigas Fernanda Noal Carlesso e Mariana Lorenzet Florian, pela inestimável ajuda, carinho e companheirismo. Aos meus queridos pais, por todo o apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e à PUCRS, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura. À CAPES, pela bolsa de Mestrado.

RESUMO

Objetivos: avaliar a funcionalidade da retina após o transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) em um modelo experimental de degeneração retiniana induzida com iodato de sódio (NaIO₃).

Métodos: as células para o transplante foram obtidas de camundongos transgênicos GFP⁺. A degeneração retiniana foi induzida com a administração intravenosa de 25 mg/kg de NaIO₃ em camundongos C57Bl/6. Três dias após a indução da lesão os grupos de animais (n=6 para cada grupo) receberam, via infusão intracarotídea, transplante de 1x10⁶ CMMOs ou 1x10⁶ CMMOs lisadas com nitrogênio líquido. Animais que receberam solução salina serviram como controle. No 7° e no 16° dia após a infusão, a funcionalidade da retina dos animais foi avaliada com eletrorretinografia (eletrorretinograma - ERG). Foram realizados processamento histológico e PCR para análise.

Resultados: a amplitude e o tempo implícito das componentes **a** e **b** do ERG mostraram alteração significativa quando comparados os períodos pré-lesão e 2 dias pós-lesão. Os ERGs obtidos no 7° e 16° dia após o transplante não apresentaram diferença significativa nos parâmetros avaliados quando comparados os tratamentos entre si, e cada tratamento ao longo do tempo. O resultado da PCR foi positivo para 1 hora e 16 dias após a infusão de células mononucleares. A análise histológica da retina mostrou lesões severas na retina central.

Conclusões: o modelo de lesão retiniana com o NaIO₃ se mostrou capaz de induzir lesão de grande extensão e gravidade. Não houve recuperação dos potenciais do ERG após o transplante de CMMOs. No entanto, a presença das CMMOs na retina, após infusão carotídea, incentiva novos estudos para investigação da possibilidade de regeneração retiniana com estas células e do seu potencial terapêutico.

Descritores: retina, eletrorretinograma, células mononucleares da medula óssea, infusão intracarotídea, camundongo.

ABSTRACT

Objectives: evaluation of retinal function after transplantation of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) in sodium iodate model of retinal degeneration.

Methods: the BMMCs were obtained from GFP⁺ transgenic mice. The retinal degeneration was induced with intravenous administration of 25 mg/kg in C57Bl/6 mice (n=18). Three days after injury animals received transplants via intracarotid infusion of bone marrow mononuclear cells, or bone marrow mononuclear cells lysed with liquid nitrogen. Animals that received saline served for control. For assessing retinal function, electroretinography was performed in 7 and 16 days after transplantation. Histological analysis of retinal injury was performed on the day 16. The migration and incorporation of transplanted cells was evaluated with PCR 1 hour and 16 days after transplantation.

Results: the amplitude and implicit time of *b*-wave and *a*-wave were significantly different when comparing the pre-injury and 2 days after sodium iodate. The averages after treatment showed no significant difference between groups or in different time points in each treatment. The PCR were positive in both right and left eyes for 1 hour and 16 days after transplantation. Retinal histology analysis showed severe damage in the central retina.

Conclusions: the model of retinal degeneration used was capable of inducing large retinal lesion size and severity. No potential electroretinogram recovery was detected after transplantation of BMMCs. However, the presence of BMMCs in the injuries sites after carotid infusion encourages further studies to investigate the possibility of retinal regeneration of these cells and their therapeutic potential.

Keywords: retina, bone marrow mononuclear cells, intracarotid infusion, electroretinogram, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura esquemática mostrando a organização estratificada da retina.....	14
Figura 2- Localização dos tecidos adjacentes à retina neural que podem abrigar células progenitoras	17
Figura 3- Curvas de sensibilidade dos fotorreceptores de camundongos obtidas por eletrorretinografia	21
Figura 4- Electrorretinograma evocado por um flash de luz branca	26
Figura 5- Foto da técnica de infusão intracarotídea.....	32
Figura 6- Eletrodo de registro utilizado para obtenção dos ERGs.	35
Figura 7- Fenotipagem das células da fração mononuclear da medula óssea.....	38
Figura 8- Resultado da Nested-PCR.....	39
Figura 9- ERG obtido previamente à indução de lesão com NaIO ₃	40
Figura 10- ERGs elicitados por estímulos de diferentes intensidades.....	41
Figura 11- ERGs obtidos 2 dias após a indução da lesão com NaIO ₃	41
Figura 12- Comparação dos parâmetros amplitude e tempo implícito da componente <i>a</i> antes e após a indução de lesão.....	42
Figura 13- Comparação dos parâmetros amplitude e tempo implícito da componente <i>b</i> antes e após a indução de lesão.....	43
Figura 14- Registro obtido no 7º dia após a infusão de CMMOs lisadas.....	44
Figura 15- Registros obtidos no 7º dia após a infusão de CMOs lisadas.....	44
Figura 16- ERGs obtidos no 7º dia após a infusão de CMMOs lisadas.....	45
Figura 17- ERGs obtidos no 16º dia após a infusão de CMMOs lisadas.....	46
Figura 18- Secções transversais da retina de camundongos.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - ERGs obtidos nos períodos pré e pós indução da lesão com NaIO ₃ , anterior ao transplante.	42
Tabela 2 - Parâmetros da componente h obtidos após a infusão intracarotídea de salina, CMMOs e lisado.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CIE	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
CMOs	Células mononucleares da medula óssea
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
EP	Epitélio pigmentar
ERG	Eletrorretinograma
Gd-DTPA	<i>Gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
LED	Diodo emissor de luz
nm-haFGF	<i>Non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RCS	<i>Royal College of Surgeons rats</i>
RMI	Imagem de ressonância magnética
RP	Retinite Pigmentosa
SDF-1	<i>Stromal-derived cell factor</i>
SNC	Sistema nervoso central
TFPI-2	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i>
UFSJ	Universidade Federal de São João Del Rei
UV	Ultravioleta
VRGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1 DEGENERAÇÃO RETINIANA	12
1.1.1 Organização celular da retina.....	13
1.2 CÉLULAS-TRONCO E DEGENERAÇÃO DA RETINA	17
1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DEGENERAÇÃO RETINIANA.....	20
1.4 ELETORRETINOGRAFIA	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS	29
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.3 INDUÇÃO DE DEGENERAÇÃO RETINIANA	30
3.4 PROTOCOLO PARA A OBTENÇÃO DAS CMMOs	30
3.5 FENOTIPAGEM DAS CMMOs	31
3.6 INFUSÃO INTRACAROTÍDEA.....	31
3.7 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DAS CMMOs.....	32
3.8 AVALIAÇÃO ELETORRETINOGRÁFICA	34
3.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA QUALITATIVA.....	36
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES.....	38
4.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CMMOs	39
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO.....	40
4.4 ELETORRETINOGRAMAS APÓS TRANSPLANTE	43
4.5 HISTOLOGIA	47
5 DISCUSSÃO	48

6 CONCLUSÕES.....	51
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9 ARTIGO CIENTÍFICO.....	59
Abstract	60
Introduction	61
Methods.....	63
Results.....	67
Discussion	69
References	74
Figures.....	80
ANEXO A— Confirmação da submissão do artigo científico.....	85
ANEXO B— Carta de aprovação do projeto pelo CEU-PUCRS.....	86

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 DEGENERAÇÃO RETINIANA

Algumas doenças que afetam a retina – tecido nervoso que reveste internamente o fundo do olho – caracterizam-se pela degeneração progressiva do tecido. Até o momento não há tratamento curativo ou reversível. As degenerações retinianas podem ter origem nas células fotorreceptoras da retina ou em tecidos adjacentes a ela, como o epitélio pigmentar da retina (EP) e a coróide (MARC et al., 2003).

Retinose pigmentar (RP) é o termo dado a um amplo grupo de doenças hereditárias caracterizadas principalmente pela degeneração dos fotorreceptores. A maioria dos casos de RP está relacionada à degeneração dessas células exclusivamente, embora muitos dos casos estejam associados a alterações em estruturas não oculares, constituindo as síndromes, como a síndrome de Usher e a síndrome de Bardet-Biedl. O padrão de hereditariedade da RP pode ser autossômico-dominante (30 a 40 % dos casos), autossômico-recessiva (50 a 60%), ou ligado ao cromossomo X (5 a 15%). Padrões não mendelianos já foram reportados, mas remetem a uma pequena proporção dos casos (HARTONG et al., 2006). A RP está associada a mutações em vários genes específicos de fotorreceptores e de células do EP. A mutação pode se originar na estrutura e transdução de genes (PHELAN e BOK, 2000). Mutações no gene periferina/RDS (gene relacionado à degeneração lenta da retina - retinal degeneration slow), por exemplo, levam a fenótipos clínicos diferentes em pacientes diagnosticados com retinose pigmentar ou degeneração macular — outra doença degenerativa da retina (JACOBSON et al., 1996; KEMP et al., 1994). A periferina é uma glicoproteína encontrada nos segmentos externos de cones e bastonetes. Deleções ou inserções nos códons do gene periferina/RDS podem resultar na terminação prematura dos códons e produzir o truncamento da molécula. Apesar dos fenótipos clínicos diferentes, as mutações desse gene promovem as mesmas alterações fisiológicas: diminuição da velocidade de adaptação ao escuro de cones e bastonetes, formação de depósitos no espaço subretinal e redução da resposta dos fotorreceptores (JACOBSON et al., 1996)

Em todo o mundo a RP afeta mais de um milhão de pessoas (SHINTANI et al., 2009) e sua prevalência é de 1:4000. Pode existir uma variabilidade considerável no prognóstico: alguns pacientes tornam-se cegos ao redor dos 30 anos de idade e a maioria é considerada legalmente cega aos 60 anos. Tipicamente, os pacientes desenvolvem dificuldade com

adaptação ao escuro e cegueira noturna na adolescência, perda da visão periférica quando adultos jovens e perda adicional da visão central além de atenuação arteriolar da retina nos estágios avançados (BERSON, 2007).

As estratégias terapêuticas empregadas no tratamento de pacientes com RP visam retardar a degeneração e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Essas estratégias são baseadas, principalmente, na suplementação alimentar, por exemplo, com Vitamina A. Dentre os alvos do tratamento com a suplementação vitamínica estão a proteção contra estresse oxidativo e a manutenção da integridade da coróide e dos vasos da retina (HARTONG et al., 2006).

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI), outra doença degenerativa da retina, comum em pacientes adultos, é a maior causa de cegueira no mundo. A progressão da DMRI envolve múltiplos fatores genéticos e ambientais. O depósito de resíduos não fagocitados pelo EP, na região da mácula, é a primeira evidência do início da DMRI (YUAN et al., 2010).

A DMRI pode se manifestar lentamente, quando células do EP degeneram na região da mácula (forma seca), ou pela perda imediata da visão decorrente da neovascularização (forma exudativa) (revisado por NILSSON, 2006). A neovascularização refere-se ao crescimento de novos vasos a partir da coróide. Neste caso, as células endoteliais que formam as paredes dos vasos proliferam e migram de forma aberrante, podendo atravessar a membrana de Bruch's, o epitélio pigmentar e alcançar a retina neural. A neovascularização pode causar sérias hemorragias, descolamento do EP ou da retina e ocasionar o aparecimento de cicatrizes (BRESSLER, 2009).

Tal como a RP, a DMRI não possui tratamento curativo. Dentre as principais medidas terapêuticas utilizadas para prevenir lesões à retina de pacientes com DMRI, estão múltiplas injeções intravítreas de agentes anti-VGEF (VGEF é um fator de crescimento do endotélio vascular) (DAVIS et al., 2010) e foto coagulação dos micro vasos por laser (NILSSON, 2006).

1.1.2 Organização Celular da Retina

A retina é estruturada em camadas celulares (figura 1), situando-se os fotorreceptores, células receptoras da retina, na camada mais externa. Nessa camada, ocorre a transdução do

estímulo luminoso em sinal elétrico que percorre as camadas mais internas até as células ganglionares, que por meio de potenciais de ação, enviam os sinais visuais para o encéfalo (WASSLE e BOYCOTT, 1991).

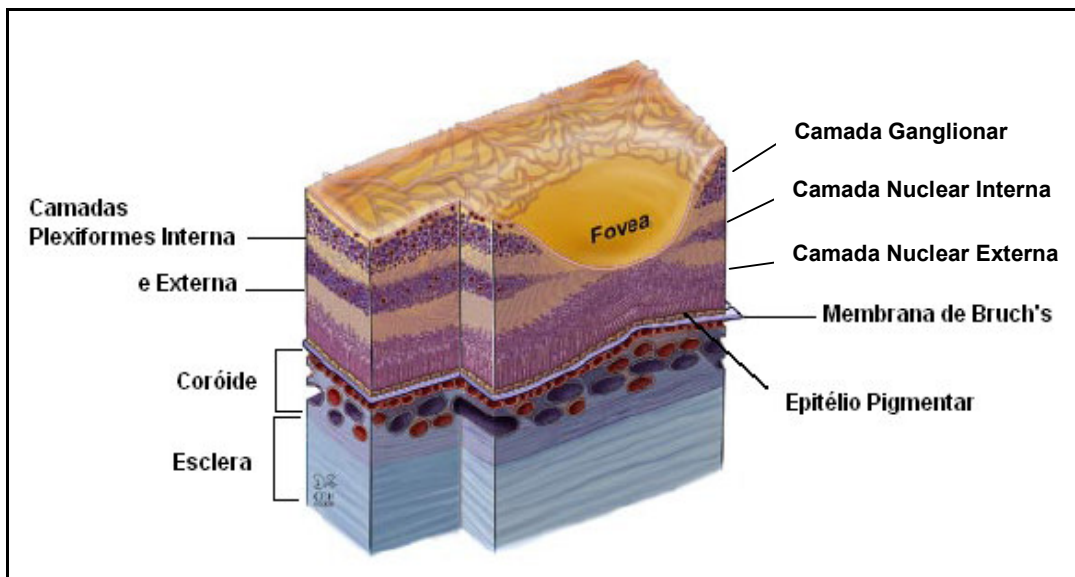


Figura 1- Figura esquemática mostrando a organização estratificada da retina. Adaptado de YUAN et al. (2010).

Os fotorreceptores bastonetes, altamente sensíveis à luz e utilizados na visão noturna, e os fotorreceptores cones, menos sensíveis, utilizados na visão diurna, possuem uma estrutura semelhante entre si. A porção apical dessas células é formada pelos segmentos externos e internos. Nos segmentos internos ocorre a geração de ATP e a manutenção dos gradientes transmembrânicos dos íons sódio e potássio pela bomba sódio/potássio. Os segmentos externos são formados por discos membranosos que contêm os pigmentos visuais capazes de absorver a luz. Em humanos, o único tipo de pigmento visual existente nos bastonetes, chamado de rodopsina, possui absorção máxima em comprimento de onda de luz de 507 nm, enquanto que nos cones há três tipos de fotopigmentos com absorção máxima nos comprimentos de onda de 430, 535 e 565 nm. O pigmento visual é constituído por uma proteína transmembrana e um cromóforo (11-*cis* retinal). A absorção da luz pelos pigmentos inicia o Ciclo Visual, uma cascata de eventos bioquímicos que leva à decomposição dos pigmentos a estados intermediários pouco sensíveis à luz e sua posterior regeneração. Os

eventos relacionados ao Ciclo Visual promovem o fechamento de canais iônicos nos segmentos externos dos fotorreceptores bloqueando a entrada de íons sódio e cálcio (revisado por AZEVEDO, 1996).

O mecanismo de fototransdução inicia-se com a absorção de luz pelo pigmento visual e culmina na hiperpolarização da membrana dos fotorreceptores decorrente do fechamento de canais iônicos. Duas categorias fundamentais de células bipolares, com as quais os fotorreceptores fazem sinapses são chamadas células bipolares ON e células bipolares OFF. Os bastonetes formam sinapse com células bipolares de bastonetes ON, sendo que os cones formam sinapses com células bipolares de cones ON e OFF. Em resposta a um rápido aumento da iluminação, as células bipolares ON despolarizam, enquanto que as bipolares OFF hiperpolarizam. Essas funções de interação de bastonetes e cones com células bipolares são mediadas pela liberação contínua de neurotransmissores glutamato nas fendas sinápticas entre essas células, com uma razão de liberação que reduz em função da hiperpolarização induzida por luz (KOLB e MARSHAK, 2003).

Adjacente à camada dos fotorreceptores está a camada nuclear interna, composta por interneurônios que incluem aproximadamente quatro tipos de células horizontais, onze tipos de células bipolares e trinta tipos de células amácrinas. A camada mais interna é composta por pelo menos vinte tipos de células ganglionares, cujos axônios formam o nervo óptico. Esses números variam de acordo com a espécie analisada. Entre as camadas de corpos celulares, encontram-se as camadas de conexões sinápticas, camada plexiforme externa e camada plexiforme interna. Além da retina captar o estímulo luminoso, sua rede de circuitos permite processar parte da informação visual (KOLB e MARSHAK, 2003).

Externamente aos fotorreceptores fica o EP, uma monocamada de células epiteliais cubóides, pigmentadas, adjacentes aos fotorreceptores em sua porção apical, e à membrana de Bruch's em sua porção basal. Dentre as principais funções deste tecido estão: formação da barreira sangue-retina, adesão da retina neural, diminuição do espalhamento de luz, proteção contra estresse oxidativo, fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores, regeneração do 11-cis-retinaldeído no ciclo visual, síntese e manutenção da matriz extracelular dos fotorreceptores, transporte de metabólitos entre fotorreceptores e circulação coroidal, balanço da concentração de íons sódio e potássio, síntese e secreção de fatores tróficos (MECKLENBURG e SCHRAERMAYER, 2007).

A citoarquitetura final da retina resulta de uma série de processos bem definidos de sinalização celular, extrínseca e intrínseca, espacial e temporalmente coordenados durante o período de desenvolvimento, que regulam a proliferação e diferenciação de células com

capacidade de se auto-renovar e gerar novas células (KLASSEN, 2006). Em mamíferos não há produção contínua de novas células ao longo da vida, sendo a retina incapaz de se regenerar no indivíduo adulto. No entanto, células do epitélio pigmentar da retina obtidas da margem ciliar (que reveste o corpo ciliar – figura 3A) de camundongos, quando mantidas em cultura, são capazes de gerar colônias de células esféricas pigmentadas e não pigmentadas (TROPEPE, 2000).

A imunomarcagem das células não pigmentadas, geradas a partir de células da margem ciliar de camundongos, mostrou que elas expressam CHX10, um marcador para células progenitoras (células com potencial de diferenciação restrito) neurais da retina, e nestina, marcador para filamentos intermediários celulares encontrados no SNC durante o período de desenvolvimento embrionário. Quando mantidas em meios de cultura que induzem diferenciação celular, estas células expressaram marcadores específicos de células da retina neural, tais como células bipolares, fotorreceptores e células Müller. Assim, pode-se considerar que existe uma pequena quantidade de células-tronco retinianas, mantidas quiescentes provavelmente por fatores ambientais inibitórios, na margem ciliar da retina de mamíferos (TROPEPE, 2000). A retina de humanos adultos, incluindo a *pars plana* (região posterior do corpo ciliar – figura 3B), quando cultivada *in vitro* em meios suplementados, apresenta células progenitoras neurais, principalmente em porções próximas à ora serrata (porção adjacente ao corpo ciliar – figura 3B). Após dissociação desse tecido, e cultivo das células, são geradas neuroesferas contendo células marcadas para nestina (filamentos intermediários encontrados no SNC durante o período de desenvolvimento embrionário, utilizados para identificar células progenitoras neurais), células de linhagem glial, neural e fotorreceptoras (MAYER et al., 2005). Apesar dos estudos com cultivo de células da região ciliar levantarem a possibilidade de transplante autólogo em pacientes, para repor as células perdidas, a capacidade de diferenciação das neuroesferas em fotorreceptores, *in vitro*, ainda é discutida. GUALDONI et al. (2010) mostraram que as esferas geradas a partir do epitélio do corpo ciliar de camundongos, quando cultivadas em meios que induzem diferenciação, são incapazes de ativar o promotor do gene *Nrl* que é essencial para diferenciação de bastonetes.

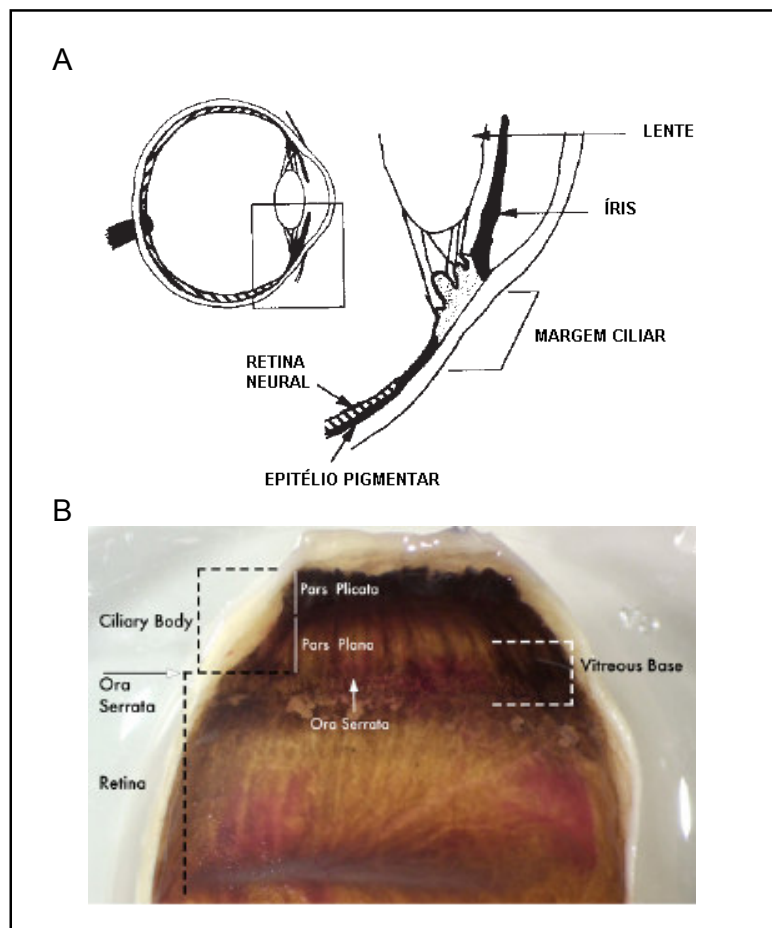


Figura 2 - Localização dos tecidos adjacentes à retina neural que podem abrigar células progenitoras. A- Representação esquemática de corte sagital de olho de mamífero. No detalhe observa-se a região da margem ciliar. Adaptado de TROPEPE et al. (2000). B- Vista interna do olho humano após corte transversal e dissecação dos segmentos anteriores, da íris e do cristalino. Estão localizadas as áreas *pars plana*, corpo ciliar e *ora serrata*. Retirado de Skeie & Mahajan (2011).

1.2 CÉLULAS-TRONCO E DEGENERAÇÃO DA RETINA

A terapia celular com células-tronco gera grande expectativa em torno das doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC), como a doença de Parkinson (YASUHARA et al., 2006) e a doença de Alzheimer (WU et al., 2008), bem como doenças degenerativas da retina (LI et al., 2006).

O potencial benefício da terapia celular com células-tronco pode resultar de mais de um mecanismo. Pesquisas experimentais apontam que as células-tronco podem atuar na reposição celular, por adoção do fenótipo das células que foram danificadas, na liberação de

fatores tróficos, que atuam na sinaptogênese, angiogênese, proteção contra apoptose, indução de neurogênese endógena ou na imunomodulação (WALKER et al., 2009).

As células-tronco representam uma população de células com características específicas, como capacidade de se autoregenerar e potencial para assumir diversas linhagens celulares. São as unidades estruturais durante o desenvolvimento embrionário, denominadas então de totipotentes quando provenientes do blastocisto, podendo originar células das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma (KRAUSE et al., 2001). Nos tecidos maduros as células-tronco, denominadas pluripotentes, são indiferenciadas e possuem a capacidade de gerar células de diferentes órgãos e tecidos (MORRISON et al., 1997).

A medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco. A fração de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) contém as células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela formação de todos os tipos de células sanguíneas do corpo (KORBLING et al., 2003), as células-tronco mesenquimais, ou estromais, que podem gerar células de diversos tecidos inclusive tecido nervoso, e as células progenitoras endoteliais, comprometidas com a diferenciação em células endoteliais (JOYCE et al., 2010).

Nas pesquisas com experimentação animal, observa-se que o desfecho após transplante de células-tronco pode ser dependente da linhagem da célula enxertada, da via do transplante e do ambiente (milieu) celular durante o quadro degenerativo.

Entre os aspectos positivos da utilização de células-tronco da medula óssea estão a alta capacidade de diferenciação, facilidade de obtenção e expansão, grande capacidade de migração para áreas lesionadas e pouco risco de rejeição pelo transplante autólogo (CASTENHEIRA et al., 2008; TOMITA et al., 2006). Em modelos de lesão retiniana, após incorporação na retina neural, as células transplantadas expressaram marcadores vimentina (para células gliais), calbidina (para células horizontais e amácrinas), GFAP (para células Müller, principais glias da retina) e rodopsina (marcador para bastonetes) (CASTANHEIRA et al., 2008; TOMITA et al., 2002) e RPE-65 (para células do EP) (LI et al., 2006).

Em humanos, a capacidade de migração das células-tronco da medula óssea mostra-se dependente das interações das células com a quimiocina SDF-1 (Fator derivado de células estromais) por meio de seu receptor CXCR4 (LAPIDOT e PETIT, 2002). Em um modelo de degeneração da retina, a quimiocina SDF-1 já foi descrita dentre os principais agentes responsáveis pela migração de células transplantadas para o espaço subretinal. Quando a expressão de SDF-1 por células do epitélio pigmentar foi avaliada por um período de uma semana, verificou-se que a expressão da quimiocina foi maior no terceiro dia após a indução da degeneração (LI et al., 2006). No entanto, outro estudo, que utilizou o mesmo modelo em

camundongos, não encontrou aumento da expressão de SDF-1 no período avaliado 1, 3, 7 e 14 dias após a indução da degeneração (HARRIS et al., 2006).

Muitos trabalhos experimentais que realizaram transplante de células-tronco na retina utilizaram transplante intraocular (subretinal ou intravítrea) das células (CASTANHEIRA et al., 2008; TOMITA et al., 2002). Apesar de o transplante local facilitar a migração das células ao sítio da injúria, a administração sistêmica é vantajosa por ser menos invasiva, considerando o potencial para a utilização clínica.

No entanto, a utilização da via venosa apresenta uma dispersão das células pelos órgãos sistêmicos como fígado, baço, pulmão (LI et al., 2006). Em decorrência disso, estudos relatam baixa taxa de migração de células-tronco da medula óssea para a retina neural após transplante intravenoso (LI et al., 2006; HARRIS et al., 2006; ENZMANN, 2003).

A infusão intracarotídea permite a migração de níveis significativos de células. Em modelos de isquemia com ratos, a infusão intracarotídea de células-tronco da medula óssea permitiu a incorporação no encéfalo e posterior detecção dessas células, enquanto que as células infundidas pela veia femoral não foram detectadas (WALCZAK et al., 2008).

O ambiente celular da retina em degeneração sofre alterações na composição química de moléculas solúveis e íons, arranjo da matriz extracelular, remodelamento do contato célula-célula e formação de novos circuitos. Na retina em processo degenerativo, as células remanescentes podem sofrer migração devido ao espraiamento das células Müller, o que constitui um “corredor” para migração de outras células (JONES e MARC, 2005; SULLIVAN et al., 2003). Em estágios avançados de retinose pigmentar em humanos, foi observado que o espaço antes ocupado por neurônios era preenchido por células de Müller, e que a camada de células ganglionares apresentava-se coberta por terminações hipertrofiadas dessas células (MARC et al., 2003).

Por isso, o ambiente celular retiniano é um fator-chave, envolvido não apenas no processo de migração, como também na sobrevivência e atuação das células transplantadas. Lesões no tecido podem criar ambientes hostis à geração e sobrevivência de novas células, e ainda terão influência direta sobre a funcionalidade destas (JONES e MARC, 2005).

Nesse sentido, quando a incorporação de células transplantadas não é permanente, moléculas liberadas ou presentes nessas células podem ser capazes de promover reações no tecido. A secreção e fatores neurotróficos pelas células transplantadas pode ser usado para estimular as células progenitoras da margem ciliar a regenerar as células da retina e proteger os neurônios remanescentes (OTANI et al., 2002, 2004). Um efeito protetor do fator de crescimento de fibroblasto nm-haFGF foi descrito após ser administrado intravitrealmente em

modelos de lesão retiniana com iodato de sódio (CHEN et al., 2009). Além desse fator, o fator TFPI-2, conhecido por estimular a proliferação do EP, após ser injetado no vítreo de coelhos tratados com iodato de sódio, mostrou efeito trófico e proliferativo para as células do EP (OBATA et al., 2005).

1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DEGENERAÇÃO RETINIANA

Diante dos desafios na busca de novas terapias e melhor compreensão das bases celulares e moleculares envolvidas nas doenças degenerativas da retina, a experimentação animal se faz necessária e desempenha um importante papel nas pesquisas biomédicas. O camundongo é muito utilizado como modelo na pesquisa básica sobre retina, seja para a caracterização do papel de genes específicos, de mecanismos envolvidos na disfunção e degeneração da retina, ou de estratégias experimentais para deter a progressão de doenças (PEACHEY e BALL, 2003).

A retina de camundongos possui a topografia básica comum aos mamíferos em relação a sua estruturação em camadas. Porém, nesses animais, a retina apresenta algumas particularidades. Nos camundongos, a retina não possui a região da fôvea, como a maioria dos mamíferos. Essa é uma região especializada responsável pela alta resolução visual e por coordenar os movimentos da cabeça e/ou dos olhos para que a imagem de um objeto seja focalizada sobre ela (WASSLE E BOYCOTT, 1991). Os cones de camundongos podem expressar dois tipos de pigmentos: um com sensibilidade a ondas curtas, UV (350-360 nm), e outro a ondas médias, M (510nm). No entanto, a maioria dos cones expressa as duas opsinas (GOURAS E EKESTEN, 2004). Os bastonetes, que somam mais de 96% do total de fotorreceptores da retina de camundongos, possuem um pigmento capaz de absorver radiação no espectro centrado em 500 nm, bastante parecido com humanos (SASZIK et al., 2002; LYUBARKY et al., 1999). A figura 3 mostra as curvas de sensibilidade de cones e bastonetes de camundongos, obtidas por eletrorretinografia.

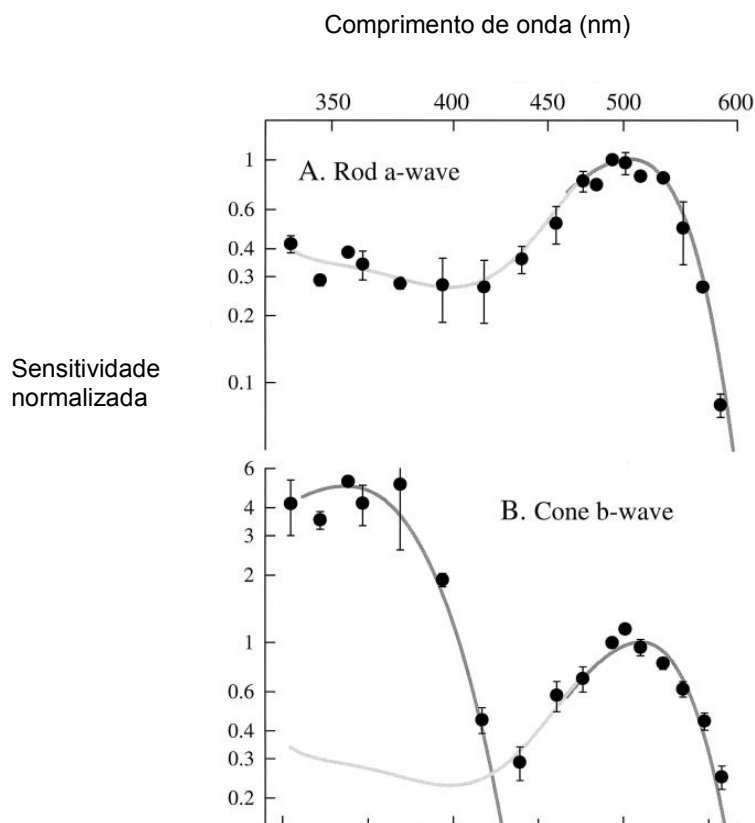


Figura 3 - Curvas de sensibilidade dos fotorreceptores de camundongos obtidas por eletrorretinografia. A- Sensitividade espectral de bastonetes com pico em um comprimento de onda de 500 nm. B- Sensitividade espectral de cones com picos em comprimentos de onda de 355 nm e 508 nm, Dados normalizados para uma sensibilidade igual a 1 em 500 nm. Adaptado de LYUBARSKY et al. (1999).

Além de estar presente nos modelos transgênicos, a degeneração retiniana em camundongos pode ser induzida com uso de substâncias tóxicas, como o iodato de sódio (NaIO_3), um oxidante químico com efeito seletivo no EP. Essa substância diluída em solução fisiológica, administrada intravenosamente, é empregada como agente tóxico em modelos animais para estudo da fisiologia da retina desde a década de 50 (NOELL, 1953). O iodato de sódio já foi utilizado para estudo da fisiologia da retina e do EP (ASHBURN et al., 1980; KORTE et al., 1984), da barreira sangue-retina (SEN et al., 1992; ZHANG et al., 2005), e de modelos de degeneração retiniana (HARRIS et al., 2006; KORTE e WANDERMAN, 1993).

Os efeitos tóxicos do iodato de sódio no EP iniciam-se nas primeiras horas após a administração. Em camundongos tratados com essa substância, análises histológicas e ultra-estruturais das células epiteliais mostraram inchaço de organelas citoplasmáticas em um período de 6 horas, redução no número de células em 12 horas e ausência de microvilosidades

em 24 horas. Após esses eventos ocorre grande redução no número dessas células. Resultados de análises do método TUNEL - utilizado nesse caso para detectar apoptose - foram negativos, indicando que, neste modelo, as células do EP morrem por processo de necrose (KIUCHI et al., 2002).

A necrose do EP provoca alterações na retina e em tecidos adjacentes. Nas regiões em que o EP permanece inalterado, a retina e outros tecidos apresentam estrutura normal, caracterizando esse modelo como um modelo de degeneração em áreas circulares (*patches*) (ENZMANN et al., 2006; KORTE et al., 1984; KORTE, 1989). A extensão dessas áreas de degeneração é dose e tempo-dependente. O uso de concentrações de 35, 50 e 70 mg/kg de iodato de sódio em camundongos mostraram padrões diferentes na captação da autofluorescência do epitélio pigmentar (autofluorescência dos grânulos contendo melanina e lipofuscina), visto sob microscópio confocal. As áreas com ausência de autofluorescência foram maiores quanto maior foi a dose utilizada (ENZMANN, Row et al., 2006).

Um processo de regeneração do EP foi observado por FRANCO et al. (2009) por meio da detecção de autofluorescência. Foi possível verificar uma repopulação significativa do EP três meses após administração de 15, 25 e 35 mg/kg. No entanto, em outro estudo, após administração de 50 mg/kg de iodato de sódio em camundongo não foi visível qualquer recuperação da autofluorescência do EP em um período de seis meses (ENZMANN, et al., 2006). Esses dados indicam que a indução de lesões menores, por meio da administração de doses menores de iodato de sódio, possibilita a recuperação das células do epitélio pigmentar após um período de tempo.

A regeneração do EP após administração de NaIO_3 inicia-se após a remoção das células mortas por macrófagos. Análises ultra-estruturais permitiram visualizar uma nova camada de células modificadas, despigmentadas, achatadas e sem microviosidades (KORTE et al., 1984; MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997). Essas células também apresentam alterações funcionais dependendo da proximidade com as células não afetadas. Diferem entre si, e entre as células maduras remanescentes, na polaridade, número e distribuição de junções de adesão, disposição de microfilamentos e atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase (importante componente da membrana plasmática em epitélios de transporte). Essas áreas de regeneração podem concentrar-se próximas do disco óptico e na periferia da retina (KORTE e WANDERMAN, 1993; KORTE et al, 1995).

Em registros eletrofisiológicos no rato após injeção rápida de *azide* de sódio observa-se uma modificação transitória no potencial transocular conhecida como resposta *azide*. Registros eletrofisiológicos da resposta *azide*, originada da despolarização da membrana basal

do EP, confirmam uma recuperação funcional após um período da administração do iodato de sódio. Entre o 1º e o 7º dia após a injeção, há um bloqueio da resposta *azide*, e no do 14º dia é completada uma recuperação que alcança 25% da resposta pré-injeção (MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997).

Como parte do remodelamento do tecido após a indução da lesão, nas áreas sem EP são formadas cicatrizes de tecido fibrótico (KIUCHI et al., 2002). Surgem ainda lâminas de várias camadas de processos distais das células Müller (KORTE et al., 1984). No SNC, a reativação de astrócitos ocorre em resposta a todas as formas de lesões do sistema nervoso. Na retina, as células Müller tornam-se reativas em resposta a alterações patológicas como na DMRI e na RP. A reativação dessas células produz respostas específicas e não específicas, protetoras ou prejudiciais, dependendo do padrão da lesão. A degeneração lenta, como a dos modelos animais *rd* (camundongos) e *Royal College of Surgeons - RCS* (ratos), causa uma mudança menos dramática nas células Müller e prejudicial à retina, do que degenerações rápidas com rompimento da barreira sangue-retina (FELMY et al., 2001; IANDIEV et al., 2006).

Outra consequência da destruição do EP nesse modelo é o rompimento da barreira sangue-retina, formada pelo EP e pelo endotélio dos vasos retinianos (SEN et al., 1992). Esse fenômeno pôde ser observado 24 h após administração em coelhos, por meio de angiografia, observando-se o vazamento da fluoresceína sódica através do epitélio pigmentar (KORTE et al., 1984), de ressonância magnética com uso de Gd-DTPA como contraste (SEN et al., 1992) e pelo índice de captação por difusão facilitada de hexoses e aminoácidos na retina e no vítreo (TAARNHOJ e ALM, 1992). O vazamento de fluoresceína, em estudos angiográficos, foi detectado até sete dias após a administração de iodato de sódio, período concomitante à restauração do EP (KORTE et al., 1984).

A destruição do EP também provoca a atrofia dos vasos da coróide. Com uso de microscopia eletrônica, foi possível observar que, uma semana após a administração de iodato de sódio, os coriocapilares apresentavam alterações iniciais de uma atrofia, como lúmen reduzido, diminuição do número de fendas das células endoteliais e infiltração de fibroblastos e granulócitos no espaço pericapilar (KORTE et al., 1984). Tal como ocorrido com o EP, o epitélio dos coriocapilares passa por um período de regeneração. Sete dias após a administração de iodato de sódio em coelhos, células endoteliais iniciaram um processo de brotamento (*sprouting*) nas proximidades dos capilares não atrofiados (KORTE, 1989).

A redução no número de células do EP, causada pelo iodato de sódio, afeta drasticamente os fotorreceptores, provocando a degeneração tanto de cones quanto de

bastonetes. Três dias após a administração, análises com método TUNEL mostraram apoptose na camada nuclear externa. Esse período já foi descrito como ponto máximo de apoptose dos fotorreceptores nesse modelo (MACHALINSKA et al., 2010).

Inicialmente, em um período de horas, pode-se perceber, por meio de microscopia eletrônica, que nas áreas recém degeneradas do EP, os discos dos segmentos externos dos fotorreceptores tornam-se dilatados, desarranjados e localizam-se próximos à membrana de Bruch's (ADACHI-USAMI et al., 1992). De uma a duas semanas, existem áreas onde os segmentos externos estão completamente ausentes (MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997). Quando foi utilizada um dose de 50 mg/kg de iodato de sódio em camundongos, a espessura da camada nuclear externa diminuiu significativamente entre o terceiro e o sétimo dia após administração, permanecendo assim até 28 dias (ENZMANN et al., 2006).

Em camundongos albinos, a morte dos fotorreceptores observada após uma semana foi em torno de 70% na retina central, e 50% na retina periférica (MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997). Em ratos Wistar (Han) também foi observada maior perda celular na retina periférica após administração de 50 mg/kg de iodato de sódio (REDFERN et al., 2010). Porém, em camundongos C57BL, essa diferença entre o centro e a periferia da retina foi observada após administração de uma dose de 20 mg/kg, enquanto que uma dose de 40 mg/kg provocou alterações em toda a extensão da retina (MACHALINSKA et al., 2010).

Algumas características da lesão produzida pelo iodato de sódio aos fotorreceptores já foi descrita após realização de testes comportamentais, análise morfológica e molecular, e testes eletrofisiológicos. A avaliação da visão com o teste Water Maze (adaptação do teste comportamental Water Maze. Aqui o animal é solto dentro de um tanque com água e deve localizar uma plataforma submersa, indicada por uma pista visual sobre ela) mostrou recuperação parcial apenas em animais que receberam uma dose de 25 mg/kg. Camundongos tratados com 30 mg/kg obtiveram desempenho reduzido e sem recuperação em um período de 3 meses (FRANCO et al., 2009). A partir de duas horas após tratamento com 50 mg/kg de iodato de sódio, em ratos wistar, a marcação para sinaptosina (glicoproteína integral de membrana das vesículas sinápticas) reduziu significativamente nas camadas plexiformes, sem recuperação em um período de avaliação de seis semanas (REDFERN et al., 2010). A acuidade visual de animais tratados com diferentes dosagens pôde ser avaliada utilizando-se testes optomotores, que monitoram a resposta a variações na frequência espacial de estímulos visuais em um padrão de grades. Em camundongos C57Bl/6, observou-se uma redução na acuidade visual 2 horas após a administração, com déficit máximo 24 horas após e recuperação próxima a 90% em 72 horas (50 mg/kg) (REDFERN et al., 2010). No entanto,

em outro trabalho, 25 mg/kg extinguiram a resposta optomotora em 72 horas, e a mantiveram significativamente reduzida após uma semana (FRANCO et al., 2009).

Registros de eletrorretinografia obtidos de camundongos C57Bl/6 tratados com 40 mg/kg de iodato de sódio mostraram redução progressiva da resposta das células da retina, do segundo para o quarto dia. Essa redução foi correlacionada com as alterações histopatológicas (ADACHI-USAMI et al., 1992). Com a utilização de 40 mg/kg, administrada em camundongos albinos BALBc, foi descrita pela primeira vez uma recuperação parcial em registros eletrorretinográficos após a indução da degeneração neste modelo. A sensibilidade dos interneurônios a estímulos de baixa intensidade recuperou-se progressivamente até níveis normais durante 42 dias a partir da injeção, embora a recuperação da resposta máxima tenha mantido os mesmos valores reduzidos a partir do 14º dia. Dessa forma, os autores sugerem que a degeneração em pequenas áreas circulares tem um padrão de resposta máxima, relacionada às áreas intactas, e uma recuperação progressiva da sensibilidade dos fotorreceptores remanescentes, suportada pela regeneração do EP (MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997). Já em camundongos C57Bl/6, essa mesma dosagem extinguiu as respostas e não foi detectada recuperação (MACHALINSKA et al., 2010).

1.4 ELETORRETINOGRRAFIA

A eletrofisiologia é uma importante ferramenta para avaliação da funcionalidade da retina na pesquisa experimental. Testes eletrofisiológicos podem ser utilizados como método diagnóstico e avaliativo das doenças que afetam a retina (BERSON, 2007). Um método bastante difundido é a eletrorretinografia, teste não invasivo e *in vivo*.

O eletrorretinograma (ERG) consiste de um sinal elétrico que representa a resposta de massa da retina à estimulação luminosa. O ERG pode ser facilmente registrado a partir da superfície da córnea, e é usualmente utilizado para verificar a integridade das camadas interna, média e externa da retina. Um estímulo que utiliza iluminação difusa produz grandes amplitudes no ERG, porque a resposta é evocada de toda a retina. Com uma iluminação difusa, as células da retina tendem a ter mudanças no potencial de membrana, simultaneamente, gerando correntes extracelulares que fluem radialmente através da retina e estende-se extraocularmente para produzir o ERG (DRYJA et al., 2005).

O ERG evocado por um *flash* de luz branca intensa e registrado sob a superfície da córnea apresenta uma forma de onda característica (figura 4), correspondendo a variações na polarização das células retinianas. A componente negativa **a**, correspondente à hiperpolarização dos fotorreceptores cones e bastonetes, é seguida de uma componente positiva **b**, que reflete o somatório de potenciais de células bipolares ON e OFF (DRYJA et al., 2005).

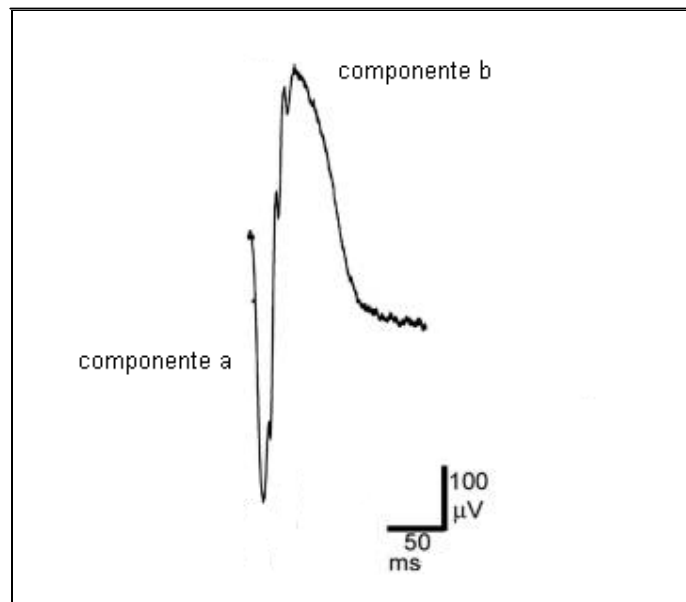


Figura 4 - Electrorretinograma evocado por um flash de luz branca. ERG normal de paciente. Foi utilizado um flash de curta duração e alta intensidade como estímulo luminoso após adaptação ao escuro do paciente. Observam-se a primeira e a segunda componente do ERG, componente **a** - deflexão negativa do sinal e componente **b** - deflexão positiva do sinal. Adaptado de DRYJA et al. (2005).

Após estímulo luminoso, a hiperpolarização dos fotorreceptores provoca uma diminuição na concentração de íons potássio no espaço intersticial próximo aos segmentos externos dessas células. Essa mudança na concentração do meio extracelular gera uma componente positiva, a componente **c** (WU, J. et al., 2004).

O teste de eletrorretinografia permite que sejam avaliadas diferentes características da função visual. Para tanto, são utilizados protocolos de estimulação, que incluem, por exemplo, extração da resposta dos bastonetes a um flash de luz de baixa intensidade, avaliação de sensibilidade a partir da variação na intensidade de estímulo, definição de potenciais

oscilatórios sobre adaptação à luz e ao escuro, resposta a *flash* intenso em olhos adaptados ao escuro representando a soma das respostas de cones e bastonetes.

O padrão da estimulação deve basear-se em medidas fotométricas, que se referem ao efeito que a radiação de uma fonte exerce sobre o sistema visual, levando em conta a quantidade de energia radiante e a sensibilidade do olho para um determinado comprimento de onda da radiação. A função que descreve a resposta relativa do olho a diferentes comprimentos de onda é conhecida como função relativa de eficiência luminosa espectral, $V(\lambda)$ (WEYMOUTH e VINGRYS, 2008). Com a finalidade de proporcionar uma base padronizada para a comparação de radiações com diferentes comprimentos de onda para humanos, a Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) adota duas funções particulares de eficiência luminosa espectral, a fotópica $V(\lambda)$ - visão diurna, e a escotópica $V'(\lambda)$ - visão noturna. Da mesma forma como em humanos, a predição da sensibilidade escotópica para camundongos, $V'(\lambda)$, como uma função do comprimento de onda, é baseada no espectro de absorção da rodopsina nos bastonetes. Assim, para camundongos a $V'(\lambda)$ muda em direção a comprimentos de ondas mais curtos, 500 nm, mas muito próximo a de humanos. Como a curva de sensibilidade espectral dos bastonetes de camundongos é bastante semelhante à $V'(\lambda)$ de humanos, a energia do estímulo eletrorretinográfico na experimentação com camundongos tem sido expressa em luminância. A luminância é usada para descrever o fluxo luminoso em uma direção e em um ponto específico da trajetória do raio luminoso. É um conceito diretamente relacionado com a luminosidade percebida pelo observador (LYUBARSKY et al., 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de degeneração retiniana com NaIO_3 .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a capacidade de migração e integração das células transplantadas após indução de degeneração com NaIO_3 .
- Caracterizar a funcionalidade da retina após o transplante de células por meio de teste eletrofisiológico.
- Avaliar se há diferença na eficácia do transplante de células-tronco da fração mononuclear ou lisado dessas células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este trabalho, foram utilizados 18 camundongos machos C57Bl/6, de 5 a 12 semanas de idade, para avaliação do tratamento com células, e quatro camundongos C57Bl/6 GFP⁺ (*green fluorescent protein*) machos, utilizados como doadores das células-tronco. Animais adicionais foram utilizados para controle da avaliação histológica e realização da PCR. Os animais permaneceram no alojamento para animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, onde o ambiente é climatizado (21 ± 1 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*.

Os protocolos utilizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais na PUCRS (CEUA - PUCRS) sob registro 09/00110. Todos os procedimentos foram baseados em técnicas específicas, pré-estabelecidas, e realizados tomando-se o devido cuidado para reduzir o número de animais empregados e seu sofrimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia profunda, e os animais receberam os cuidados pós-cirúrgicos necessários.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi um estudo experimental, *in vivo*, controlado. Os animais foram divididos em três grupos de seis animais (n=6), de acordo com o tratamento: (1) um grupo tratado com células da fração mononuclear da medula óssea (CMMOs); (2) um grupo tratado com a solução resultante da lise das células mononucleares (CMMOs lisadas); e (3) um grupo controle tratado com solução fisiológica - NaCl 9% (Salina).

Decorridos dois dias da indução da lesão retiniana, todos os animais foram avaliados com teste eletroretinográfico, para certificação da ocorrência da lesão. No terceiro dia após a indução da lesão, os animais foram tratados de acordo com a divisão dos grupos descrita acima.

No 7° e 16° dias após o transplante, os animais foram avaliados por meio de eletrorretinografia. No 16° dia após a obtenção dos eletrorretinogramas, os animais foram induzidos a eutanásia para subsequente enucleação dos olhos e processamento histológico.

3.3 INDUÇÃO DE DEGENERAÇÃO RETINIANA

Uma dose única de 25 mg/kg de iodato de sódio (Sigma), diluído a 1 % em solução fisiológica NaCl 9%, foi administrada pela veia da cauda dos animais. Para isso, os animais foram anestesiados com 40 mg/kg de ketamina (Cristália - Brasil) e 8 mg/kg de xilazina (Syntec - Brasil).

O controle da lesão foi obtido por meio de testes de eletrorretinografia realizados antes da administração do NaIO₃ e 2 dias após. Os animais que não apresentaram alterações significativas no eletrorretinograma, após a indução da lesão, não foram utilizados no trabalho.

3.4 PROTOCOLO PARA A OBTENÇÃO DAS CMMOs

Os animais doadores (C57Bl/6 GFP⁺) das CMMOs foram anestesiados com ketamina e xilazina (80 mg/kg e 16 mg/kg) e eutanasiados por deslocamento cervical. Os ossos longos, fêmur e tíbia, foram dissecados e tiveram as epífeses cortadas, e as cavidades internas foram lavadas com auxílio de seringas. Em seguida, o aspirado de células foi centrifugado a 1500 rpm, por dez minutos. Após isso, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* suspenso para fracionamento em RPMI (meio de cultura; Sigma-Aldrich) na proporção 1:1 com DPBS (Sigma-Aldrich).

A camada de células mononucleares foi então separada por gradiente Ficoll-paque 11191 (Histopaque- Sigma-Aldrich) e centrifugada a 400g em centrífuga (Eppendorf 5417C) por trinta minutos. A interface coletada da amostra foi lavada em solução salina e centrifugada a 1500 rpm, por cinco minutos. O *pellet* foi resuspenso, e esse procedimento foi repetido duas vezes. Finalmente, o *pellet* foi resuspenso em solução salina, para então serem separadas alíquotas de 10⁶ células em um volume de 50 µL.

As células foram contadas em um hematocítocimetro Neubauer. A viabilidade das células foi conferida por marcação com Azul de Tripán. Além da CMMOs, foram usadas CMMOs lisadas para a infusão intracarotídea. Seguiu-se o mesmo protocolo para extração das células e, em seguida à contagem de células, 1×10^6 CMMOs foram embebidas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^\circ\text{C}$), maceradas, ressuspensas e preparadas em um volume total de $50\text{ }\mu\text{L}$ em DPBS.

3.5 FENOTIPAGEM DAS CMMOs

Para avaliação de antígenos de superfície, as células mononucleares da medula óssea de um camundongo C57Bl/6 foram incubadas por 30 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ com um anticorpo específico conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE). Os anticorpos usados foram anti-CD19, CD45, CD117, CD34 e Sca-1 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). As amostras foram lavadas com DPBS para remover o excesso de anticorpos e fixadas com paraformaldeído a 3,6%. As amostras foram lavadas novamente com DPBS e resuspensas em tampão de azida de sódio 0,01%. A detecção das células marcadas com FITC e PE foi realizada em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) equipado com laser argônio-488 nm, usando o software CellQuest. Dez mil eventos foram coletados para cada medida.

3.6 INFUSÃO INTRACAROTÍDEA

As infusões de CMMOs, CMMOs lisadas ou apenas solução salina foram realizadas no terceiro dia após a administração de iodato de sódio. Os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para o acesso intra-arterial.

Após indução da anestesia geral com 80 mg/kg de ketamina e 16 mg/kg de xilazina, realizou-se a tricotomia seguida pela incisão mediana da face anterior do pescoço dos animais em estudo. Sob visão da lupa cirúrgica (DFVasconsellos - Brasil), realizou-se a divulsão do tecido subcutâneo entre os músculos esternocleidomastóide e esterno-hióide e, assim, a artéria carótida comum direita foi localizada e dissecada. Com o uso de fio de seda 7.0, a porção

mais caudal do vaso foi tracionada, a fim de reduzir a quantidade de sangramento após a punção arterial (figura 2). Seguidamente, administrou-se a concentração de 1×10^6 de CMMOs, CMMOs lisadas, ou solução fisiológica em um volume de 50 μL . Utilizou-se para isto uma seringa de insulina conectada a uma agulha ultra-fina (34G).

Ao término do conteúdo da seringa, o fluxo sanguíneo foi liberado e torundas de algodão foram colocadas sobre o vaso, a fim de tamponar qualquer sangramento adicional. Após esse processo, os tecidos foram aproximados e a pele suturada com uso de fio de seda 7.0. Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos aquecidos por uma manta térmica, e os olhos permaneceram hidratados com solução salina.

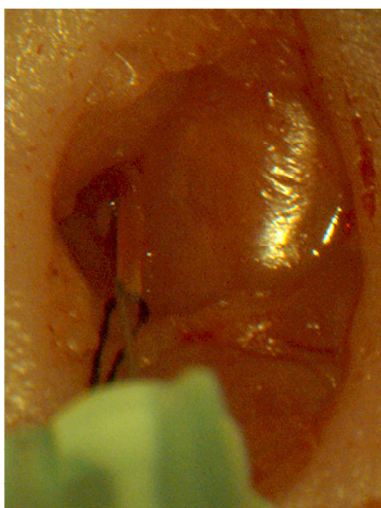


Figura 5- Foto da técnica de infusão intracarotídea. Mostra a artéria carótida comum direita tracionada com um fio de seda e uma agulha ultra-fina utilizada para realizar a infusão intracarotídea nos três grupos de animais: CMMOs, CMMOs lisadas e salina.

3.7 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DAS CMMOs

Para verificar a migração e presença de células transplantadas, foi utilizado o protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de PCR foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência de DNA correspondente a uma seqüência específica do gene que codifica a proteína GFP.

Utilizou-se para isso cinco camundongos. Um animal foi induzido à eutanásia uma hora após o transplante de CMMOs, e quatro camundongos, após 16 dias do transplante. Os animais anestesiados foram eutanasiados por decaptação, os olhos foram enucleados com auxílio de uma microtesoura e depositados em *ependorfs*.

A extração de DNA foi realizada com fenol/clorofórmio, baseado no método descrito por Isola *et al.* (1994). Os olhos enucleados dos animais foram maceradas em microtubos contendo os 300µl de tampão *phosphate buffer salin* (PBS - GIBCO™). Foram adicionados 600µl de Trizol (Invitrogen™) e 120µl de clorofórmio (Merk™); o conteúdo foi homogeneizado utilizando vortex (Genie™) e centrifugado a 400 g por dez minutos em centrífuga (Eppendorf 5417C). O sobrenadante foi coletado, e a ele foi adicionado 70% de seu volume de álcool isopropílico (Merk™). O conteúdo foi ressuspenso e armazenado a -20°C por 12 horas. O material foi novamente centrifugado a 400 g por dez minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 50 µl de água ultra pura estéril. As amostras tiveram o DNA quantificado, utilizando espectrofotômetro FotoUltra (Eppendorf).

A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-tgaattcgccaccatggtgagc-3' e reverso 5'tgaattctactgtacagctcgcc-3', complementares à seqüência de DNA correspondente a uma seqüência específica do gene que codifica a proteína EGFP, gerando um produto de PCR de 1000 pb, e uma nova amplificação utilizando o *primer* direto 5'-gggcacaagctggagtaca-3' e reverso 5'-atgttggtggcggatcttga-3', gerando um produto de PCR de 100 pb, caracterizando a técnica de Nested-PCR. Como controle positivo, foram realizados ensaios de PCR de todas as amostras, utilizando *primers* específicos, complementares ao gene constitutivo de camundongo IL2 (IL2-F 5'-ctagccacagaattgaaagatct-3' / IL2-R 5'-gtaggtggaaattctagcatcatcc-3'), resultando em um produto de PRC de 324pb.

Para cada reação, foram utilizados 5µg de DNA genômico, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 50 pmol de cada primer, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 5 µL de solução tampão e água ultra pura estéril para completar o volume de reação de 50 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos para desnaturação; 30 ciclos subsequentes, consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma etapa de anelamento a 52°C por 30 segundos e uma etapa a 72°C por um minuto para extensão; e então uma etapa de extensão final a 72°C por dez minutos.

Os produtos gerados após a técnica de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio em tampão TRIS, ácido acético, EDTA (TAE) 1x por

30 minutos, aplicando uma voltagem de 100 v e uma amperagem de 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta (3UV-Biorad), e as imagens foram capturadas utilizando equipamento de foto documentação, por meio do programa Quantity One (Biorad).

3.8 AVALIAÇÃO ELETRORRETINOGRÁFICA

Para obtenção de eletrorretinogramas escotópicos, os animais foram adaptados ao escuro durante a noite e todos os procedimentos do teste foram realizados sob iluminação de uma rede de LEDs vermelhos. Para obtenção da midríase, utilizaram-se tropicamida 1% (Alcon, Brasil) e fenilefrina cloridrato 2,5% (ALLERGAN, Brasil). Após vinte minutos, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg), para que permanecessem imóveis pelo período de 1 hora. Anestesiados, os animais foram fixados a uma mesa extereotáxica.

Durante o teste, a temperatura corporal dos camundongos foi mantida entre 37°C e 38°C por uma manta térmica. Ambos os olhos foram testados sequencialmente, e o olho contralateral ao teste permaneceu coberto por uma lente de contato opaca preenchida com 1% de carboximetilcelulose, para evitar o ressecamento da córnea e a dessensibilização da retina.

Os eletrorretinogramas foram obtidos com um eletrodo de registro desenhado no Laboratório de Neurociências Experimental e Computacional Dr. Aristides Pacheco de Leão – da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) (figura 3). O eletrodo foi confeccionado a partir de uma ponteira de pipeta microvolumétrica sem cor, cuja ponta foi recortada para uma abertura de 3 mm, polida por flambagem e preenchida com solução salina. A extremidade de um fio de prata cloretada foi inserida na região anterior da ponteira, e na região posterior foi acoplado um LED de 2 mm de luz branca. A distância do LED até a córnea dos animais foi de 1 cm. A conexão elétrica do LED foi envolvida com papel alumínio, e este aterrado para diminuir o artefato de interferência eletromagnética decorrente do disparo do LED. O eletrodo terra consistiu de um fio de prata cloretada envolto em algodão umedecido com salina, e foi inserido na boca dos animais. Os fios de conexão dos eletrodos ao amplificador foram trançados.

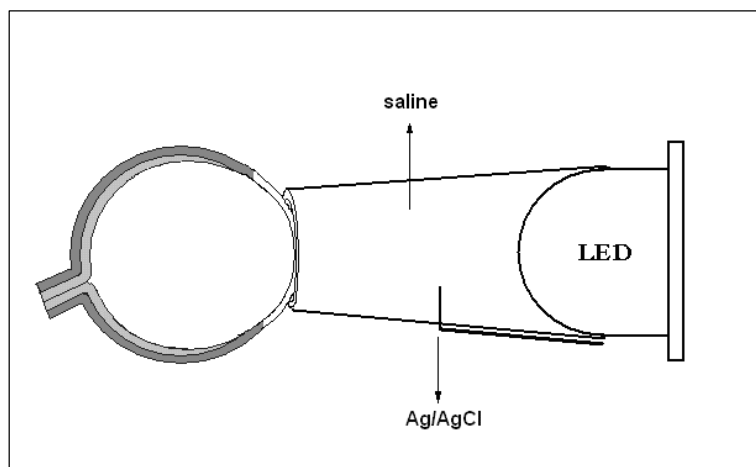


Figura 6- Eletrodo de registro utilizado para obtenção dos ERGs. O eletrodo consiste de uma ponteira de pipeta microvolumétrica sem cor, cuja ponta foi recortada para uma abertura de 3 mm, preenchida com solução salina. A extremidade de um fio de prata cloretada foi inserida na região anterior da ponteira e na região posterior foi acoplado um LED de 2 mm de luz branca. A distância do LED até a córnea dos animais é de 1 cm.

O sinal captado sob a córnea foi condicionado pelo sistema de amplificação Cyberamp 320 (Axon Instruments Inc), ajustado para um ganho final de 1000X e com limitação em frequência por filtragem com filtro passa-baixa de corte em 200 Hz e filtro passa-faixa desativado. Após condicionamento com uma placa Digidata 1322a (Axon Instruments, EUA), o sinal foi digitalizado por meio do software AxoScope 9 (Axon Instruments, EUA) e amostrado a uma taxa de 10 kHz.

Para elicitar os ERGs, foram disparados *flashes* de luz branca com 4 ms de duração, a intervalos de 3 minutos. O LED utilizado para disparar o *flash* foi alimentado por um eletroestimulador (GRASS S48, EUA) ajustado para fornecer estímulos em três luminâncias fotópicas: (I) 826 cd/m² (Essa luminância possibilitou uma resposta específica de bastonetes caracterizada por uma componente **b** proeminente); (II) 13x10³ cd/m²; e (III) 200x10³ cd/m². A luminância foi medida utilizando-se um luminômetro Minolta LS 110 (Konica Minolta, Japão) com uma lente nº 110, utilizada para medir luminância de pequenos objetos a curtas distâncias (fator de correção 1.050).

Devido ao fato da energia entregue à retina variar, dependendo do posicionamento do eletrodo sobre a córnea, em cada intensidade de estímulo variou-se a posição do eletrodo três vezes, e a maior resposta elicitada foi escolhida para posterior análise.

Os parâmetros tempo implícito (ms) e amplitude (µV) das componentes **a** e **b** foram avaliados em cada ERG utilizando-se software AxoScope 9. A amplitude da componente **a** foi

definida como a distância da linha de base, no momento do estímulo, até o pico da componente. A amplitude da componente **b** foi calculada como a distância entre o pico da componente **a** até o valor máximo da **b**. O tempo implícito foi considerado como o tempo decorrido entre o início do estímulo e o pico de cada componente. Como os registros foram obtidos sem filtro passa-faixa, os pontos de interesse para os parâmetros avaliados foram obtidos a partir da média entre os picos dos valores máximo e mínimo da senoide do ruído registrado sobre o sinal.

3.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA QUALITATIVA

Para melhor caracterização da lesão da retina, induzida pelo iodato de sódio, no 16º dia após o transplante de células foi coletado material para análise morfológica. Os animais receberam anestesia (ketamina 80 mg/kg e xilazina 16mg/kg) e foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, os olhos foram enucleados com auxílio de microtesoura cirúrgica, e foram depositados em placas de Petri preenchidas com solução salina resfriada. Sob uma lupa de dissecação, foram removidos excessos de músculos e tecidos ao redor do globo ocular. Utilizou-se para isso uma microtesoura e uma pinça de ponta fina. O material foi, então, imerso em paraformaldeído 4% durante uma noite. Posteriormente à fixação, o material permaneceu em sacarose 30% por 24 horas. O material foi congelado a -20°C para processamento em criostato (SHANDON, Japão).

Foram obtidas secções transversais de 20µm e as lâminas foram coradas com a técnica de Nissl utilizando o seguinte protocolo: banho em álcool absoluto; banho em álcool 80%; banho em álcool 70%; banho em água destilada; imersão em cresil por um minuto; banho em água destilada; banho em álcool 70%; banho em álcool 80%; banho em álcool absoluto; e banho em xilol. Em seguida, depositou-se a lamínula utilizando-se Bálsamo do Canadá. As lâminas foram analisadas com microscópio ótico (Olympus - Japão). Imagens digitalizadas das secções da retina foram obtidas com uma camera de video instalada em um microscópio Olympus BX40, utilizando o software Image Pro-plus 6.1 (Media Cybernetics).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise da indução da lesão retiniana, foi utilizado o teste Wilcoxon pareado. Para avaliação dos tratamentos com CMMOs, CMMOs lisadas ou salina, foi utilizado o teste de Friedman para os parâmetros da componente **b**. Os registros eletrorretinográficos de ambos os olhos foram comparados entre si utilizando o Test t no período pré-lesão, e pelo teste de Mann-Whitney nos outros períodos. Para avaliar os fatores tempo e tratamento, foi utilizada ANOVA de 2 vias para os parâmetros da componente **b**. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$ e $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES

As células da fração mononuclear extraídas da medula óssea foram positivas para os seguintes marcadores: CD34, CD19, CD45 e CD117 (figura 4).

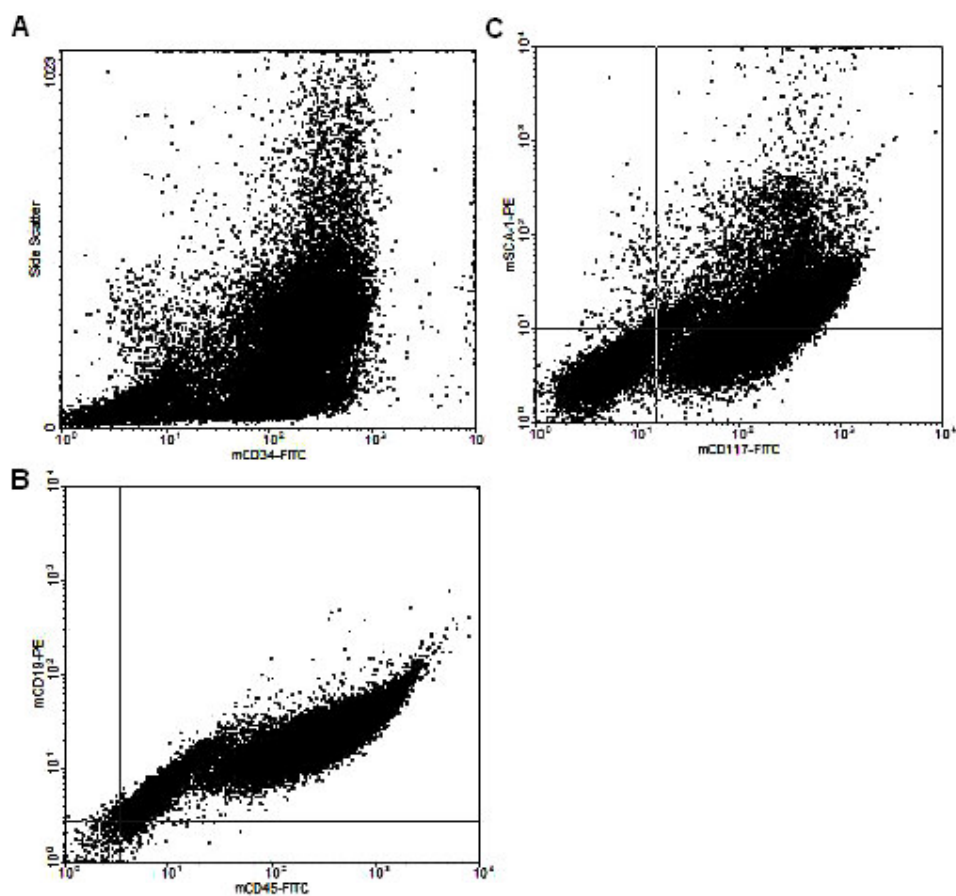


Figura 7. Fenotipagem das células da fração mononuclear da medula óssea. As células foram CD34⁺ (A), CD19⁺ (B), e CD45⁺ (B) e CD117⁺ (C).

4.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CMMOs

A técnica de PCR foi utilizada para verificar a migração e a incorporação das CMMOs transplantadas. Para isso, como doadores de células, foram utilizados camundongos C57Bl/GFP⁺. Assim, a técnica de PCR foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares à sequência de DNA correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína EGFP.

Foram avaliados olhos enucleados de cinco camundongos. Os períodos de avaliação foram 1 hora após infusão intracarotídea de CMMOs (n=1) e 16 dias após a infusão (n=4).

Os resultados foram positivos para o período de 1 hora após a infusão em ambos os olhos. Para o 16º dia, os resultados foram positivos em ambos os olhos para um animal, e apenas no olho esquerdo para um animal (figura 5).

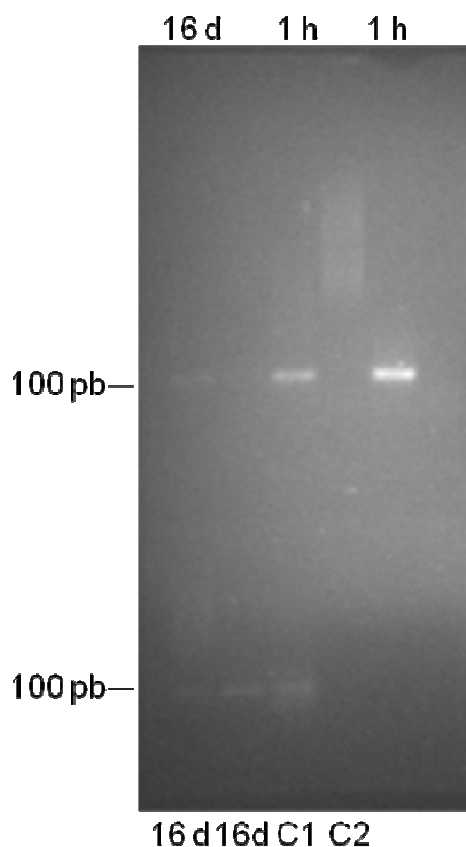


Figura 8- Resultado da Nested-PCR. PCR positivo para uma sequência de 100 pares de bases utilizando *primers* complementares à sequência de DNA correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína EGFP. Os resultados foram positivos para 1 h após a infusão, em ambos os olhos (canaletas superiores direitas). Após 16 dias foram positivos para ambos os olhos em um animal (canaletas inferiores esquerdas), e para o olho esquerdo de um animal (canaleta superior esquerda). C1 = Controle positivo, C2 = Controle negativo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO

Para avaliar o efeito do transplante de células da fração mononuclear da medula óssea em retinas lesionadas, foi utilizado um modelo de degeneração retiniana em camundongos C57Bl/6 com NaIO_3 . Para avaliação do quadro degenerativo, dois dias após administração de 25 mg/kg de iodato, os animais passaram por um teste de eletrorretinografia. Os ERGs obtidos de cada animal antes da indução da degeneração serviram como controle (figuras 6 e 7).

No segundo dia após a indução da lesão, a resposta foi extinta em cinco animais. As respostas a estímulos de baixa intensidade estiveram ausentes na maioria dos casos ($n=16$). Por isso, foram utilizadas as respostas ao estímulo III, de maior intensidade, para a análise estatística. A figura 8 mostra ERGs com a componente **b** parcialmente preservada.

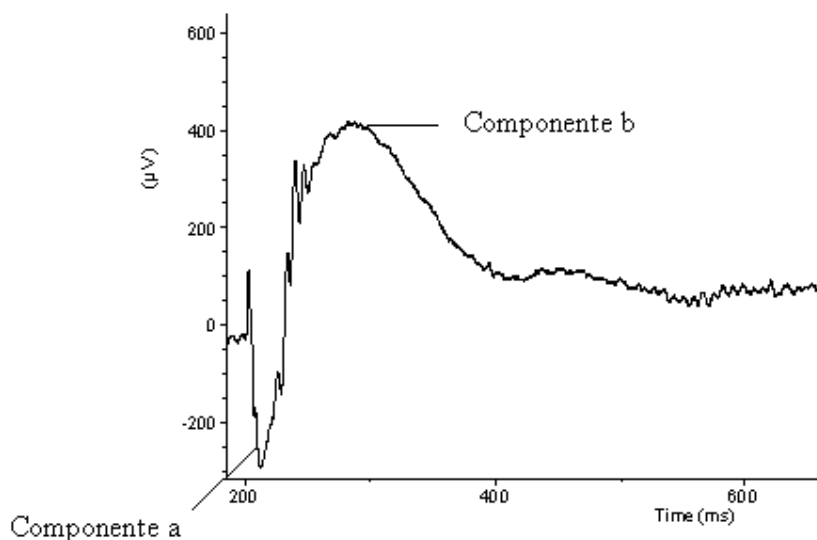


Figura 9- ERG obtido previamente à indução de lesão com NaIO_3 . O estímulo utilizado para eliciar esse ERG foi de $200 \times 10^3 \text{ cd/m}^2$ e de 4ms de duração. No instante "200 ms" foi disparado o estímulo de luz branca. As espículas, positiva e negativa, que surgem nos registros nesse período são artefatos do estímulo.

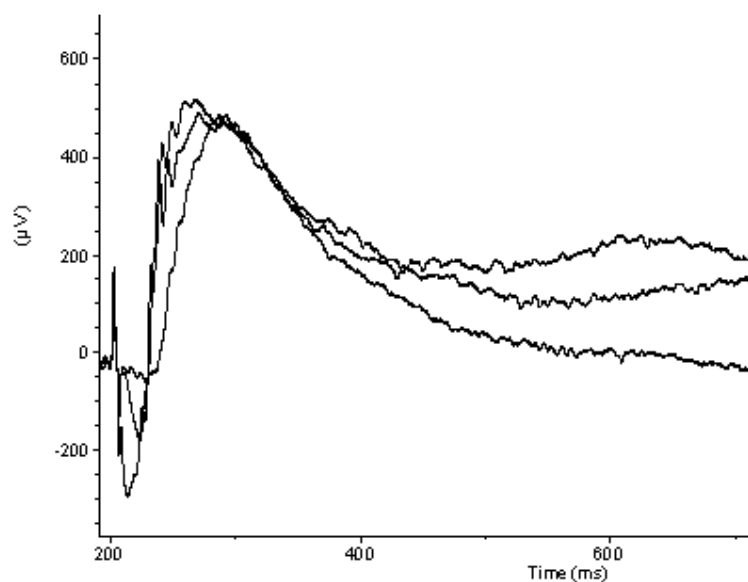


Figura 10- ERGs elicitados por estímulos de diferentes intensidades. Intensidades I, II e III.

Após a indução da lesão, as médias das amplitudes das componentes **a** e **b** foram significativamente menor ($p < 0,05$), comparadas às médias obtidas nos registros controle para ambos os olhos. A diferença entre as médias também foi significativa ($p < 0,05$) para o tempo implícito, tanto para a componente **a** quanto para a componente **b**. Apenas o tempo implícito da componente **a**, registradas de olhos direitos, não apresentou diferença significativa entre as médias (Tabela 1). Os gráficos nas figuras 9 e 10 mostram valores dos ERGs obtidos dos olhos esquerdos ($n=18$).

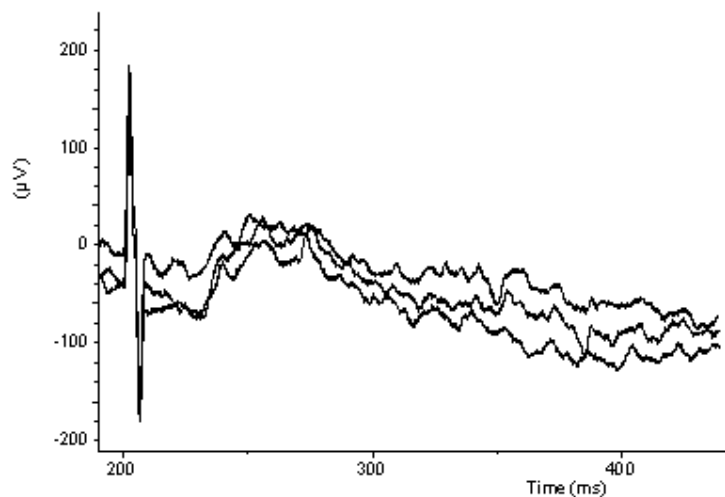


Figura 11- ERGs obtidos 2 dias após a indução da lesão com NaIO_3 . Há preservação parcial da componente **b**. Intensidade de estímulo III. Nesses registros a deflexão negativa em 200 ms são artefatos do estímulo.

Tabela1 - ERGs obtidos nos períodos pré e pós indução da lesão com NaIO₃, anterior ao transplante.

Componentes do ERG	Pré NaIO ₃ média ± desvio padrão		Pós NaIO ₃ mediana (mínimo e máximo)		<i>p</i> ^a
	Olho esquerdo	Olho direito	Olho esquerdo	Olho direito	
Amplitude a (μV)	221,1 ± 55,15a	198,9 ± 50,30	0,0 (0,0 to 88,20)	32,70 (0,0 a 75,40)	0,0002/0,0002
Tempo implícito a (ms)	14,79 ± 2,94b	14,09 ± 1,94	0,0 (0,0 to 27,19)	0,0 (0,0 a 31,90)	0,0065/0,1385
Amplitude b (μV)	612,0 ± 166,7c	562,9 ± 178,8	0,0 (0,0 to 221,6)	0,0 (0,0 a 180,4)	0,0002/0,0002
Tempo implícito b (ms)	93,65 ± 38,00d	87,45 ± 40,31	0,0 (0,0 to 75,10)	53,10 (0,0 to 81,60)	0,005/0,0011

As variáveis foram comparadas usando o teste Wilcoxon. $\alpha = 0,05$.

^a Pré NaIO₃ versus Pós NaIO₃; olho esquerdo / olho direito.

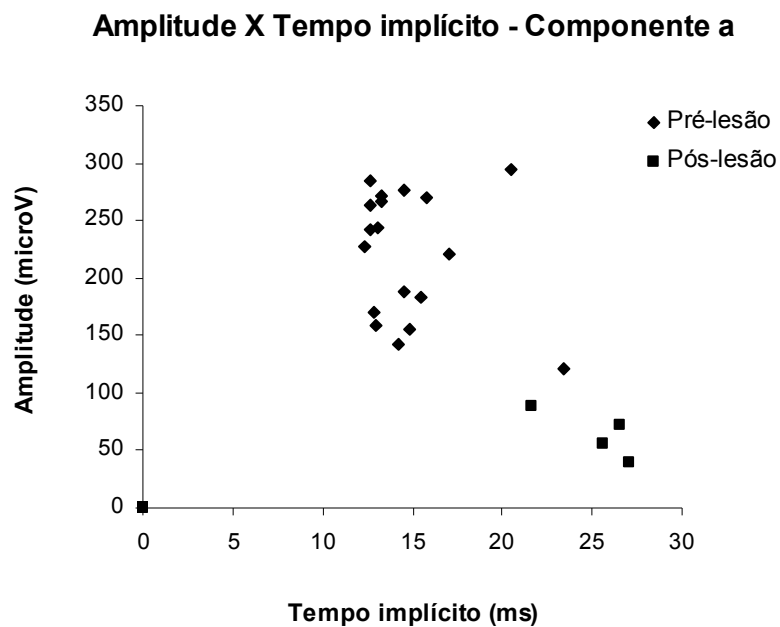


Figura 12- Comparação dos parâmetros amplitude e tempo implícito da componente a antes e após a indução de lesão. Os valores referem-se a ERGs do olho direito de todos os animais. Intensidade do estímulo III. Os valores de amplitude Pré e Pós-lesão foram significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$ %).

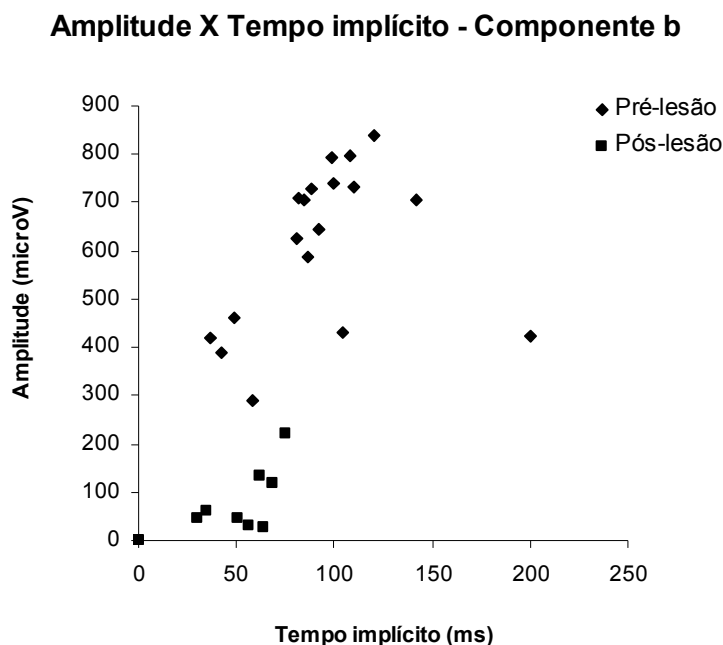


Figura 13- Comparação do parâmetros amplitude e tempo implícito da componente b antes e após a indução de lesão. Os valores referem-se a ERGs do olho direito de todos os animais. Intensidade do estímulo III. Os valores de amplitude Pré e Pós-lesão foram significativamente diferentes ($\alpha = 0,05 \%$).

4.4 ELETORRETINOGRAMAS PÓS-TRANSPLANTE

Para avaliar o efeito do transplante de CMMOs e CMMOs lisadas, foram realizados testes de eletrorretinografia em dois períodos, no 7º e no 16º dia após a infusão intracarotídea.

Sete dias após os tratamentos CMMOs, CMMOs lisadas ou salina, os testes mostraram maior ausência de respostas que a observada na avaliação pós-lesão (n=12).

Registros obtidos dos três grupos apresentaram leves alterações negativas na linha de base, com uma deflexão máxima em torno de 200 ms após o estímulo (figuras 11 e 12).

Nesse período, o ERG de um animal do grupo CMMOs lisadas apresentou recuperação da componente c, em ambos os olhos, em resposta ao estímulo III (figura 13).

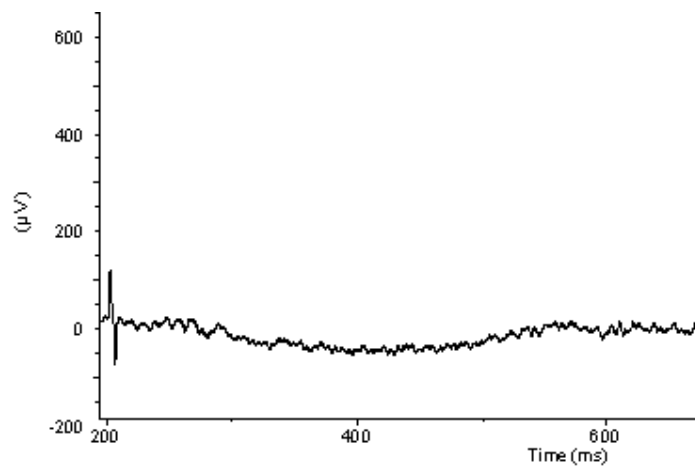


Figura 14- Registro obtido no 7º dia após a infusão de CMMOs lisadas. O registro apresenta apenas uma deflexão negativa.

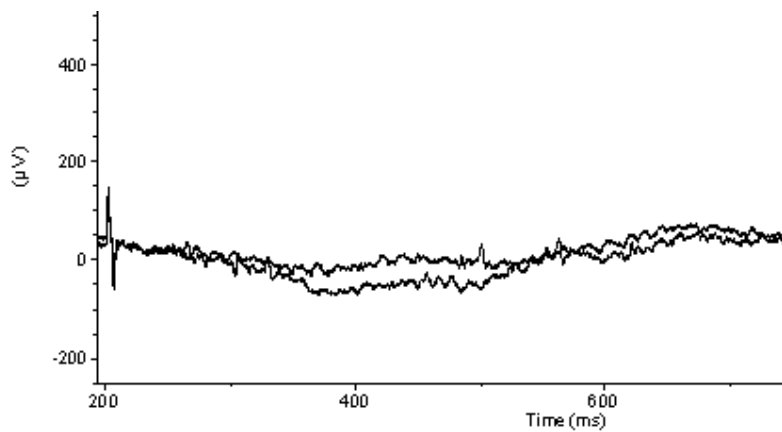


Figura 15- Registros obtido no 7º dia após a infusão de CMMOs. O registro apresenta apenas uma deflexão negativa.

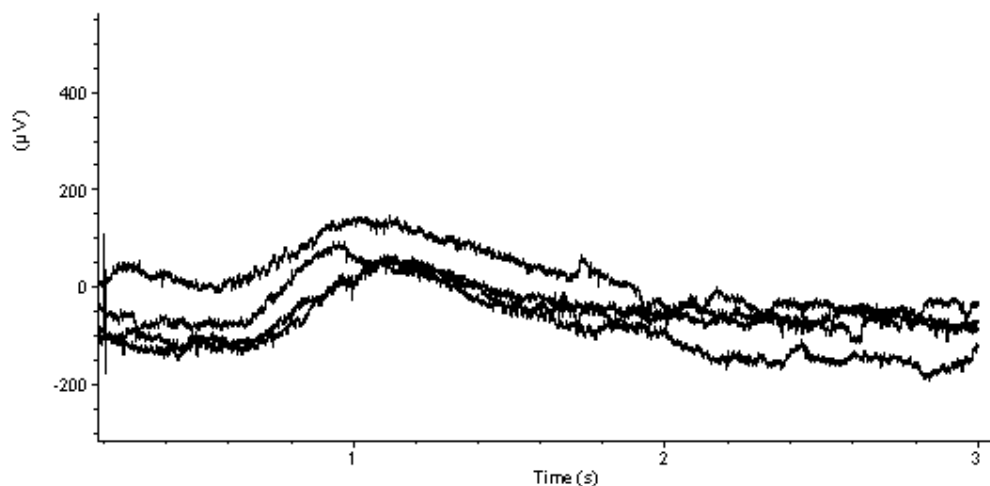


Figura 16- ERGs obtidos no 7º dia após a infusão de CMMOs lisadas. Os registros mostram a recuperação da componente **c**. Intensidades do estímulo II e III.

Os registros obtidos no 16º dia foram semelhantes aos do 7º dia. Os ERGs dos mesmos animais (n=6) permaneceram com as respostas preservadas. A figura 14 mostra os ERGs de um animal do grupo CMMOs lisadas.

Nesse período foi possível registrar a recuperação da componente **c** no ERG de três animais, um de cada grupo.

Devido à ausência da componente **a** na maioria dos registros após as injeções intracarotídeas, a análise estatística dos dados foi realizada com os parâmetros da componente **b**. As médias dos valores de amplitude e tempo implícito não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos nos períodos 7º e 16º dias após a infusão, bem como entre as médias dos períodos pós-lesão, quando comparadas com 7º e 16º dias após a infusão ($p > 0,05$).

As médias obtidas da componente **b**, de ambos os olhos, foram comparadas entre si e não apresentaram diferença significativa em nenhum dos períodos de teste ($p > 0,05$) (Tabela 2).

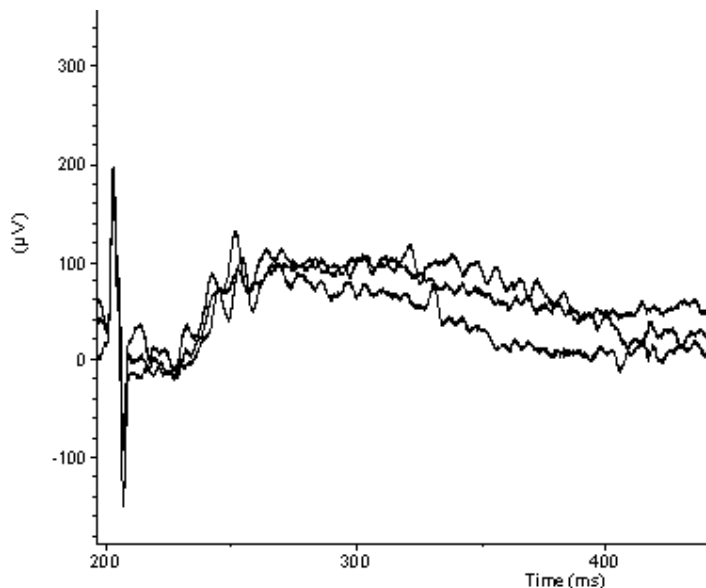


Figura 17- ERGs obtidos no 16º dia após a infusão de CMMOs lisadas. Os registros mostram a manutenção parcial da componente **b**. Intensidades II e III.

Tabela 2 - Parâmetros da componente **b obtidos após a infusão intracarotídea de salina, CMMOs e lisado.**

ERG	Dia 7 mediana (mínimo e máximo)			Dia 16 mediana (mínimo e máximo)			<i>p</i>
	Salina	CMMOs	Lisado	Salina	CMMOs	Lisado	
Amplitude b (E) ^a	0,0 (0,0 a 106,8)	0,0 (0,0 a 43,90)	0,0 (0,0 a 79,30)	0,0 (0,0 a 150,1)	0,0 (0,0 a 57,35)	0,0 (0,0 a 80,60)	0,5199
Amplitude b (D) ^b	0,0 (0,0 a 136,8)	46,98 (0,0 a 66,20)	0,0 (0,0 a 80,60)	0,0 (0,0 a 123,9)	25,25 (0,0 a 91,55)	0,0 (0,0 a 114,1)	0,5199
Tempo implicito b (E)	0,0 (0,0 a 105,0)	0,0 (0,0 a 57,40)	0,0 (0,0 a 53,00)	0,0 (0,0 a 51,10)	0,0 (0,0 a 85,85)	0,0 (0,0 a 43,60)	0,3330
Tempo implicito b (D)	0,0 (0,0 a 75,60)	45,73 (0,0 a 79,25)	0,0 (0,0 a 40,70)	0,0 (0,0 a 66,30)	56,90 (0,0 a 87,45)	0,0 (0,0 a 51,80)	0,3330

As variáveis foram comparadas com o teste Friedman. $\alpha = 0,05$.

^a E: valores obtidos dos olhos esquerdos.

^b D: valores obtidos dos olhos direitos.

4.5 HISTOLOGIA

Para melhor caracterização da lesão da retina, induzida pelo iodato de sódio, no 16º dia após o transplante os animais foram eutanasiados para processamento histológico. A lesão foi permanente em toda a retina central (figura 15-B1), extinguindo a camada nuclear externa. Apenas segmentos da retina periférica mantiveram a estrutura normal (figura 15-B2). As camadas internas não apresentaram redução severa.

Alguns animais (n=10) mostraram uma área maior de preservação dos fotorreceptores. No entanto essa observação não pode ser correlacionada com a preservação dos registros eletroretinográficos.

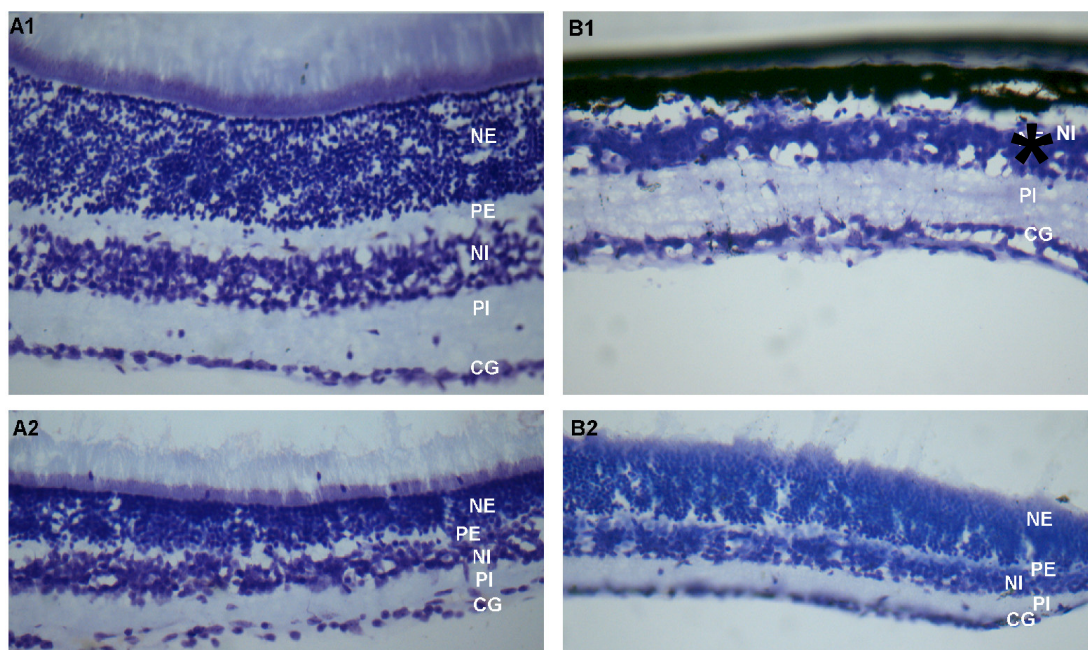


Figura 18 - Secções transversais da retina de camundongos. A- Retina não lesionada com NaIO_3 : retina central (A1) e retina periférica (A2). B. Retina lesionada com NaIO_3 : B1. 16 dias após a infusão intracarotídea a retina central redução quase total de fotorreceptores. A camada nuclear interna (asterisco) fica em contato com o epitélio pigmentar. B2. A retina periférica foi menos acometida e mostra preservação da camada de fotorreceptores. Espaços entre as células são artefatos do processamento. As secções foram coradas com Nissl. NE- Camada nuclear externa, NI- Camada nuclear interna, PE- Camada plexiforme externa, PI- Camada plexiforme interna, CG- Camada de células ganglionares. Aumento: 40x.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi induzida a degeneração da retina pela administração intracarotídea de 25 mg/kg de iodato de sódio. Dois dias depois, foram obtidos ERGs dos animais, para caracterização da lesão. O iodato de sódio é um composto tóxico para retina, e provoca lesões severas quando administrado em doses elevadas (ENZMANN et al., 2006). A presença de pelo menos uma das componentes do ERG em 13 dos 18 animais está de acordo com dados da literatura, que mostram respostas preservadas no 3º dia após administração de 20 mg/kg, enquanto que 40 mg/kg extinguiram os eletrorretinogramas nesse mesmo período (MACHALINSKA et al., 2010).

O atraso no tempo implícito da componente **a**, no 2º dia após a indução da lesão, foi estatisticamente significativo para os registros obtidos dos olhos esquerdos. A alteração no tempo implícito é uma das características deste modelo de lesão retiniana (ADACHI-USAMI et al., 1992). Em pacientes com retinose pigmentar, o ERG mostra-se não só reduzido em amplitude, como também apresenta atraso no tempo implícito das componentes, diferentemente do que ocorre em pacientes com doenças estacionárias, que apresentam amplitudes reduzidas, mas mantêm o padrão de tempo implícito (BERSON, 2007).

Os valores de tempo implícito da componente **b** apresentaram diferença significativa em relação ao controle; no entanto, foram reduzidos. Os ERGs obtidos pré e pós-injúria apresentaram potenciais oscilatórios (resposta de células da retina interna registradas na porção ascendente da componente **b**) que ultrapassavam o pico máximo da componente **b**. Assim, os picos máximos, escolhidos para medição, abrangeram também os valores de tempo implícito dos potenciais oscilatórios.

O modelo de lesão retiniana utilizando doses baixas de iodato de sódio em camundongos foi descrito recentemente. Sabe-se que a resposta eletrorretinográfica pode não se extinguir totalmente e permanecer com uma atenuação estável por até 28 dias, devido à preservação de áreas intactas na periferia da retina (MACHALINSKA et al., 2010). No entanto, neste trabalho, utilizando 25 mg/kg para induzir a lesão, não foi possível detectar os ERGs de vários animais após 9 e 18 dias da administração.

Esse resultado pode diferir dos dados da literatura, por razões relacionadas ao protocolo de indução de lesão e ao sistema de montagem utilizado para estimulação e registro dos ERGs. Em MACHALINSKA et al. (2010), que registrou resposta estável, foram

utilizados 20 mg/kg de iodato de sódio, administrado via plexo venoso orbital. Apesar de parecer pequena, essa diferença na dosagem pode ser significativa nesse modelo.

A infusão intracarotídea foi realizada no 3º dia após a administração do iodato de sódio. Esse período já foi descrito como o período de maior taxa de apoptose dos fotorreceptores (MACHALINSKA et al., 2010; KIUCHI et al., 2002) e como o período de maior expressão do fator SDF-1, uma importante quimiocina relacionada à migração de células-tronco para sítios de lesão (LI et al., 2006). O resultado da PCR foi positivo para 1 hora após transplante, constatando-se que as CMMOs migraram para os locais de lesão. Foi positivo também para 16 dias após o transplante, mostrando que as células transplantadas permaneceram incorporadas ao tecido. Uma das conseqüências da injúria produzida ao epitélio pigmentar pelo iodato de sódio é o rompimento da barreira sangue-retina (SEN et al., 1992). O vazamento de fluoresceína sódica foi detectado em coelhos tratados com NaIO₃ por um período de sete dias, concomitante com a restauração natural do epitélio (KORTE et al., 1984). No presente trabalho, o transplante das células foi realizado três dias após a administração de NaIO₃. É provável que nesse período a barreira sangue-retina não tenha sido restaurada. Dessa forma, a administração intra-arterial de CMMOs possibilita a incorporação dessas células nas áreas lesionadas pelo iodato de sódio, como visto pelos resultados da PCR.

Foram utilizados os olhos inteiros, e não as retinas isoladas, como amostras para a PCR, o que impede a afirmação de que as células encontravam-se na retina neural. No entanto, já foi descrito que células-tronco transplantadas sistemicamente, no modelo de NaIO₃, migraram para espaço subretinal (LI et al., 2006). Além disso, este modelo é descrito como lesivo apenas à retina e à coróide, sendo esses os únicos alvos oculares da migração das células-tronco transplantadas.

Para avaliar o efeito dos tratamentos entre os grupos CMMOs, CMMOs lisadas e Salina, foram realizados testes eletrorretinográficos em dois períodos após a infusão intracarotídea. As médias dos valores de amplitude e tempo implícito não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos nos períodos 7º e 16º dias após a infusão, bem como entre as médias dos períodos pós-lesão quando comparadas com 7º e 16º dia após a infusão.

Um dos desfechos esperados para a terapia com células-tronco é a neuroproteção do tecido após o transplante. No trabalho de LU et al. (2010) os benefícios das CMOs oferecido à retina nos primeiros dias após transplante em ratos *Royal College of Surgeons* (RCS) permitiram a manutenção da função visual por um longo período, mesmo não havendo mais permanência das células transplantadas. Esse efeito neuroprotetor também tem sido observado

após a administração de fatores tróficos (CHEN et al., 2009; OBATA et al., 2005, OHTAKA et al., 2006). No presente trabalho, entretanto, a lesão produzida pelo NaIO_3 na retina dos camundongos foi bastante extensa e severa, o que provavelmente não permitiu a recuperação da funcionalidade do tecido.

No trabalho de FRANCO et al. (2009), 15 mg/kg de iodato de sódio promoveram a redução da camada nuclear externa apenas 3 meses após a administração, e com 25 mg/kg a diminuição não foi significativa no 7º dia, mas apenas no 14º dia. Apesar disso, no presente trabalho, apenas na periferia da retina a camada nuclear externa permaneceu preservada no 19º. Essa maior resistência ao iodato de sódio da retina periférica já foi descrito na literatura (MACHALINSKA et al., 2010; MIZOTA e ADACHI-USAMI, 1997; OHTAKA et al., 2006).

Apesar de nossa pesquisa não demonstrar normalização do ERG de animais submetidos à lesão da retina com iodato de sódio e transplantados com células mononucleares da medula óssea, o fato de termos estabelecido o modelo de lesão retiniana de maior extensão e gravidade e de detectarmos a presença das CMMOs na retina descortina várias possibilidades tais como: (1) a indução de graus menores de lesão retiniana que permitam uma graduação das respostas no ERG (2) a consolidação da via intracarotídea para continuarmos avaliando o potencial terapêutico destas células o que poderá facilitar a pesquisa translacional futura com seres humanos.

6 CONCLUSÕES

Após a indução da degeneração retiniana em camundongos com o NaIO_3 , verificamos no presente trabalho que:

1. Ocorreram migração e incorporação das células mononucleares da medula óssea de camundongos doadores injetadas via artéria carótida comum direita nas áreas retinianas lesionada quando avaliadas por PCR.
2. Não foi identificada recuperação eletrorretinográfica significativa nos animais transplantados com células mononucleares da medula óssea.
3. Também não ocorreu recuperação eletrorretinográfica com a infusão das células lisadas sendo os resultados negativos semelhantes aos verificados com as CMMOs.

Na investigação realizada não evidenciamos recuperação dos potenciais do ERG após o transplante com células mononucleares da medula óssea. Por outro lado, o modelo de degeneração retiniana utilizado se mostrou capaz de induzir lesão retiniana de grande extensão e gravidade gerando alterações irreversíveis na retina. A presença das CMMOs na retina injetadas via carotídea incentiva-nos a continuar a investigação da possibilidade de regeneração retiniana com estas células e do seu potencial terapêutico.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O número de células transplantadas que se incorporam ao tecido é um ponto-chave para possibilitar a recuperação da lesão. Por essa razão, foi investigado aqui o transplante intra-arterial, pela artéria carótida comum direita. No modelo utilizado, a degeneração é severa e rápida. Sendo assim, a atuação de moléculas e fatores protetores pode ter efeito significativo apenas quando administrados no início da lesão ou previamente a ela. No entanto, para possibilitar a migração de células-tronco transplantadas sistemicamente, é preciso que o tecido esteja lesionado devido à presença de agentes quimiotáticos.

Considerando esses fatores, pode-se concluir que, apesar do modelo com NaIO₃ ser um bom modelo, para estudos de doenças como a degeneração macular relacionada à idade, a rápida progressão das lesões não permite que a ação das células-tronco revertam ou interrompam a degeneração em um intervalo curto de tempo, anterior à diminuição da camada nuclear externa. Assim, pretendemos em estudos futuros, utilizar doses inferiores a 25 mg/kg nas investigações de regeneração da retina com células-tronco em camundongos C57Bl/6. Assim, talvez induzindo lesões menos extensas e graves possamos identificar o potencial efeito regenerativo das CMMOs transplantadas por via intracarotídea nestes animais. Também está em nossas perspectivas a utilização de anti-oxidantes que poderiam eventualmente garantir maior sobrevida e eficácias das células transplantadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI-USAMI, E., A. MIZOTA, et al. Transient increase of b-wave in the mouse retina after sodium iodate injection. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.33, n.11, Oct, p.3109-13. 1992.

ASHBURN, F. S., Jr., A. R. PILKERTON, et al. The effects of iodate and iodoacetate on the retinal adhesion. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.19, n.12, Dec, p.1427-32. 1980.

AZEVEDO, D. F. G. de. Automated imaging dark adaptometry in human retina. 1996. 192 f. (Doutorado em Filosofia)-University of Miami, Coral Gales, 1996.

BERSON, E. L. Long-term visual prognoses in patients with retinitis pigmentosa: the Ludwig von Sallmann lecture. Exp Eye Res, v.85, n.1, Jul, p.7-14. 2007.

BRESSLER, S. B. Introduction: Understanding the Role of Angiogenesis and Antiangiogenic Agents in Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology, v.116, n.10, Suppl, Oct, S1-S7. 2009.

CASTANHEIRA, P., L. TORQUETTI, et al. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. Arq Bras Oftalmol, v.71, n.5, Sep-Oct, p.644-50. 2008.

CHEN, W., M. YU, et al. Non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor reduces retinal degeneration induced by sodium iodate. J Ocul Pharmacol Ther, v.25, n.4, Aug, p.315-20. 2009.

DAVIS, R. P., A. C. SCHEFLER, et al. Concomitant bilateral intravitreal anti-VEGF injections for the treatment of exudative age-related macular degeneration. Clin Ophthalmol, v.4, p.703-7. 2010.

DEMARCO, P. J., Jr., Y. KATAGIRI, et al. An adaptive ERG technique to measure normal and altered dark adaptation in the mouse. Doc Ophthalmol, v.115, n.3, Nov, p.155-63. 2007.

DRYJA, T. P., T. L. MCGEE, et al. Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.13, Mar 29, p.4884-9. 2005.

ENZMANN, V., R. M. HOWARD, et al. Enhanced induction of RPE lineage markers in pluripotent neural stem cells engrafted into the adult rat subretinal space. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.44, n.12, Dec, p.5417-22. 2003.

ENZMANN, V., B. W. ROW, et al. Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. Exp Eye Res, v.82, n.3, Mar, p.441-8. 2006.

FELMY, F., T. PANNICKE, et al. Electrophysiological properties of rat retinal Muller (glial) cells in postnatally developing and in pathologically altered retinae. Glia, v.34, n.3, May, p.190-9. 2001.

FRANCO, L. M., R. ZULLIGER, et al. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.50, n.8, Aug, p.4004-10. 2009.

GOURAS, P. e B. EKESTEN. Why do mice have ultra-violet vision? Exp Eye Res, v.79, n.6, Dec, p.887-92. 2004.

GUALDONI, S., M. BARON, et al. Adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells with potential for retinal repair, fail to differentiate into new rod photoreceptors. STEM CELLS, v.28, p.1048–1059. 2010.

HARRIS, J. R., G. A. BROWN, et al. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.47, n.5, May, p.2108-13. 2006.

HARTONG, D. T., E. L. BERSON, et al. Retinitis pigmentosa. Lancet, v.368, n.9549, Nov 18, p.1795-809. 2006.

IANDIEV, I., T. PANNICKE, et al. Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina. Neurosci Lett, v.408, n.2, Nov 13, p.108-12. 2006.

JACOBSON, S. G., A. V. CIDECIYAN, et al. Photoreceptor Function in Heterozygotes With Insertion or Deletion Mutations in the *RDS* Gene. Invest Ophthalmol Vis Sci, vol.37, n. 81, July, p. 1662-1674. 1996.

JONES, B. W. e R. E. MARC. Retinal remodeling during retinal degeneration. Exp Eye Res, v.81, n.2, Aug, p.123-37. 2005.

JOYCE, N., G. ANNETT, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. Regen Med, v.5, n.6, Nov, p.933-46. 2010.

KEMP, C. M., S. G. JACOBSON, et al. RDS Gene Mutations Causing Retinitis Pigmentosa or Macular Degeneration Lead to the Same Abnormality in Photoreceptor Function. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.35, n.8, Jul, p.3154-3162. 1994.

KLASSEN, H. Transplantation of cultured progenitor cells to the mammalian retina. Expert Opin Biol Ther, v.5, n.6, May, p.443-51. 2006.

KIUCHI, K., K. YOSHIZAWA, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. Curr Eye Res, v.25, n.6, Dec, p.373-9. 2002.

KOLB, H. e D. MARSHAK. The midget pathways of the primate retina. Doc Ophthalmol, v.106, n.1, Jan, p.67-81. 2003.

KORBLING, M., Z. ESTROV, *et al.* Adult stem cells and tissue repair. Bone Marrow Transplant, v.32 Suppl 1, Aug, p.S23-4. 2003.

KORTE, G. E., V. REPPUCCI, et al. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.25, n.10, Oct, p.1135-45. 1984.

KORTE, G. E. Choriocapillaris regeneration in the rabbit. Ultrastructure of new endothelial tube formation. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.30, n.9, Sep, p.1938-50. 1989.

KORTE, G. E. e M. C. WANDERMAN. Distribution of Na⁺ K(+)-ATPase in regenerating retinal pigment epithelium in the rabbit. A study by electron microscopic cytochemistry. Exp Eye Res, v.56, n.2, Feb, p.219-29. 1993.

KORTE, G. E., J. I. PERLMAN, et al. Regeneration of mammalian retinal pigment epithelium. Int Rev Cytol, v.152, p.223-63. 1994.

KORTE, G. E., E. MROWIEC, et al. Reorganization of actin microfilaments and microtubules in regenerating retinal pigment epithelium. Exp Eye Res, v.61, n.2, Aug, p.189-203. 1995.

KRAUSE, D. S., N. D. THEISE, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell, v.105, n.3, May 4, p.369-77. 2001.

LAPIDOT, T. e I. PETIT. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol, v.30, n.9, Sep, p.973-81. 2002.

LI, Y., R. G. RECA, et al. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.47, n.4, Apr, p.1646-52. 2006.

LU, B., S. Wang, et al. Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. Exp Eye Res, v.91, p.449-445. 2010.

LYUBARSKY, A. L., B. FALSINI, et al. UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. J Neurosci, v.19, n.1, Jan 1, p.442-55. 1999.

MACHALINSKA, A., W. LUBINSKI, et al. Sodium iodate selectively injures the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. Neurochem Res, v.35, n.11, Nov, p.1819-27. 2010.

MARC, R. E., B. W. JONES, et al. Neural remodeling in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res, v.22, n.5, Sep, p.607-55. 2003.

MAYER, E. J., D. A. CARTER. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. Br J Ophthalmol, v.89, n.1, Jan, p.102-106. 2005.

MECKLENBURG, L. e U. SCHRAERMEYER. An overview on the toxic morphological changes in the retinal pigment epithelium after systemic compound administration. Toxicol Pathol, v.35, n.2, p.252-67. 2007.

MIZOTA, A. e E. ADACHI-USAMI. Functional recovery of retina after sodium iodate injection in mice. Vision Res, v.37, n.14, Jul, p.1859-65. 1997.

MORRISON, S. J., N. M. SHAH, et al. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell, v.88, n.3, Feb 7, p.287-98. 1997.

NILSSON, S. E. From basic to clinical research: a journey with the retina, the retinal pigment epithelium, the cornea, age-related macular degeneration and hereditary degenerations, as seen in the rear view mirror. Acta Ophthalmol Scand, v.84, n.4, Aug, p.452-65; 451. 2006.

NOELL, W. K. Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. Am J Ophthalmol, v.36, n.6:2, Jun, p.103-16. 1953.

OBATA, R., Y. YANAGI, et al. Retinal degeneration is delayed by tissue factor pathway inhibitor-2 in RCS rats and a sodium-iodate-induced model in rabbits. Eye (Lond), v.19, n.4, Apr, p.464-8. 2005.

OHTAKA, K., S. MACHIDA, et al. Protective effect of hepatocyte growth factor against degeneration of the retinal pigment epithelium and photoreceptor in sodium iodate-injected rats. Curr Eye Res, v.31, n.4, Apr, p.347-55. 2006.

OTANI, A., K. KINDER, et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. Nat Med. v.8, n.9, Sep, p.1004-10. 2002.

OTANI, A., M.I. DORRELL, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. J. Clin. Invest. v.114, n.5, Sep, p.765-774. 2004.

PEACHEY, N. S. e S. L. BALL. Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice. Doc Ophthalmol, v.107, n.1, Jul, p.13-36. 2003.

PHELAN, J. K. e D. BOK. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. Mol Vis, v.6, Jul 8, p.116-24. 2000.

REDFERN, W. S., S. STOREY, et al. Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: Effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice. J Pharmacol Toxicol Methods, Jul 7. 2010.

RICHARDS, A., A. A. EMONDI, et al. Long-term ERG analysis in the partially light-damaged mouse retina reveals regressive and compensatory changes. Vis Neurosci. v.23, n.1, Jan-Feb, p.91-7. 2006.

SASZIK, S. M., J. G. ROBSON, et al. The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. J Physiol, v.543, n.Pt 3, Sep 15, p.899-916. 2002.

SEN, H. A., BERKOWITZ, B. A., et al. In vivo imaging of breakdown of the inner and outer blood-retinal barriers. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.13, Dec 33, p.3507-12. 1992.

SHINTANI, K., D. L. SHECHTMAN, et al. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. Optometry, v.80, n.7, Jul, p.384-401. 2009.

SKEIE, J. M. e V. B. MAHAJAN. (2011) Dissection of human vitreous body elements for proteomic analysis. JoVE, 47. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2455>, doi: 10.3791/2455.

SULLIVAN, R., P. PENFOLD, *et al.* Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.44, n.2, Feb, p.856-65. 2003.

TAARNHOJ, J. e A. ALM. The effect of sodium iodate on the blood-retinal and blood-brain barriers. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, v.230, n.6, p.589-91. 1992.

TOMITA, M., Y. ADACHI, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. Stem Cells, v.20, n.4, p.279-83. 2002.

TOMITA, M., T. MORI, et al. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. Stem Cells, v.24, n.10, Oct, p.2270-8. 2006.

TROPEPE, V., B. L. K. COLES, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. SCIENCE, v. 287, n.17, Mar, p.2032-2036. 2000.

WALCZAK, P., J. ZHANG, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. Stroke, v.39, n.5, May, p.1569-74. 2008.

WALKER, P. A., S. K. SHAH, et al. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. Dis Model Mech, v.2, n.1-2, Jan-Feb, p.23-38. 2009.

WASSLE, H. e B. B. BOYCOTT. Functional architecture of the mammalian retina. Physiol Rev, v.71, n.2, Apr, p.447-80. 1991.

WEYMOUTH, A. E. e A. J. VINGRYS. Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. Prog Retin Eye Res, v.27, n.1, Jan, p.1-44. 2008.

WU, J., N. S. PEACHEY, et al. Light-evoked responses of the mouse retinal pigment epithelium. J Neurophysiol, v.91, n.3, Mar, p.1134-42. 2004.

WU, S., A. SASAKI, et al. Neural stem cells improve learning and memory in rats with Alzheimer's disease. Pathobiology, v.75, n.3, p.186-94. 2008.

YASUHARA, T., N. MATSUKAWA, et al. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci, v.26, n.48, Nov 29, p.12497-511. 2006.

YUAN, X., X. GU, et al. Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes. Mol Cell Proteomics, v.9, n.6, Jun, p.1031-46. 2010.

ZHANG, M., H. XIN, et al. Murine cytomegalovirus (MCMV) spreads to and replicates in the retina after endotoxin-induced disruption of the blood-retinal barrier of immunosuppressed BALB/c mice. J Neurovirol, v.11, n.4, Aug, p.365-75. 2005.

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Intracarotid delivered bone marrow mononuclear cells can be detected into eyes of sodium iodate lesioned mice

França, B.M.L.^a, de Paula, S.^a, Marinowic, D.R.^a, Azevedo, D.F.G. de^a, Almeida, A.C.G.^b,
DaCosta, J.C.^{a,*}

^a Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Instituto do Cérebro (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Neurociências Experimental e Computacional, Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), São João del-Rei, Brazil.

* Corresponding author: Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD.

Instituto do Cérebro (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre,
RS, Brazil. Tel.: +5551 33202173; Fax: +5551 33203312
E-mail: jcc@puers.br

Abbreviations. BMMCs: bone marrow mononuclear cells

Abstract

Therapeutic strategies using stem cell transplantation generates great expectation for treatment of retinal degeneration, a serious condition that results in progressive vision loss. We evaluated if bone marrow mononuclear cells (BMMCs) can migrate and improve visual function after intracarotid infusion in a mice model of retinal degeneration. The BMMCs were obtained from GFP⁺ transgenic mice. The retinal degeneration was induced by intravenous administration of NaIO₃ (25 mg/kg) in C57Bl/6 mice. Three days after NaIO₃ injection, the animals received intracarotid infusion of BMMCs or BMMCs-derived lysate. The animals that served as control subjects were infused with saline solution. Electroretinography was performed for assessing retinal function. The migration and incorporation of transplanted cells were evaluated with PCR. On day 16 after infusion, animals were euthanatized for qualitative morphological analysis of retinal injury. BMMCs could be detected 1 hour and 16 days after intracarotid infusion. Two days after sodium iodate injection, electroretinograms (ERG) showed significant reduction as compared to pre-injury records. After intracarotid infusion of BMMCs and BMMCs-derived lysate, no significant difference was detected in ERG between groups or at different times in each group. Morphological analysis showed severe reduction of photoreceptor nuclei in central retina and preservation in the periphery. In conclusion, the presence of BMMCs in injury sites after intracarotid infusion encourages further studies to investigate the possibility of retinal regeneration using the intra-arterial route to deliver stem cells or cell vectors for the synthesis and/or release of neurotrophic factors for the clinical use. The NaIO₃ dosage used was capable of inducing extensive retinal damage. These impairments were not attenuated by the BMMCs transplantation. However, they reveal other possibilities such as to induce lesser degrees of lesion, which allow a degree of ERG responses, to continue investigating the BMMCs therapeutic potential.

Keywords: retina, age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa, bone marrow mononuclear cells, intracarotid infusion, electroretinogram, mice.

1. Introduction

Retinal degenerative diseases involve progressive and irreversible loss of vision. Retinitis pigmentosa (RP) is the term given to a group of inherited disorders, characterized primarily by the degeneration of photoreceptors (rods and cones) and the retinal pigment epithelium (RPE) (Berkowitz et al., 2004). Worldwide prevalence of RP is 1:4000. There is considerable variability in the prognosis: some patients become blind at around 30 years old and most of them is considered legally blind at 60. Typically, patients develop difficulty with dark adaptation and even night blindness in adolescence, loss of peripheral vision in young adulthood and loss of central vision at the advanced stages (Berson, 2007). Age-related macular degeneration (AMD) is another degenerative disease of the retina. It is the leading cause of blindness worldwide. The progression of AMD involves multiple genetic and environmental factors. The accumulation of debris not phagocytosed by RPE, in the region of the macula, is the first evidence of early AMD (Yuan et al., 2010). AMD may manifest slowly, when RPE degenerates in the region of the macula (dry AMD), or an immediate loss of vision can occur in locations that new blood vessels arising from the choroid are disrupted (exudative AMD) (Nilsson, 2006). Therapeutic strategies employed in RP or AMD may slow down the degeneration and improve the patient's quality of life. However, there is still no established treatment that definitely saves or restores the visual function (Hartong et al., 2006).

Stem cell transplantation generates great expectation for treatment of retinal degeneration. Bone marrow-derived mononuclear cells (BMMCs) include mesenchymal stem cells (MSCs), which can originate cells of different tissues (Joyce et al., 2010), hematopoietic stem cells (HSCs), responsible for generating all types of blood cells, and the endothelial progenitor cells (EPCs) (Korbling et al., 2003). The BMMCs hold characteristics for potential success of cell therapy in retinal diseases such as high differentiation capacity, easy availability and expansion, important migration to injured areas and low risk of rejection (Lu et al., 2010; Wang et al., 2010). In addition to the differentiation capacity of bone marrow-derived stem cells (Atmaca-Sonmez et al., 2006; Kicic et al., 2003; Li et al., 2006; Tomita et al., 2002, 2006; Wang, H.C., et al., 2010), the expected outcomes of stem cell therapy include tissue neuroprotection by mechanisms such as the release of trophic factors and the inflammatory modulation (de Paula et al., 2010; Inoue et al., 2007; Keimpema et al., 2009). Lu et al. (2010) showed that the benefits of MSCs to the retina, in the first days after transplantation in rats, allowed the maintenance of visual function for 80 days, even with very

few long-term surviving transplanted cells. Otani et al. (2004) reported that Lin⁻ HSCs (lineage negative subpopulation) could rescue retinal vessels and photoreceptors cells, by vasculotrophic and neurotrophic effects, in mice retinal degeneration.

The low rate of stem cell migration into the central nervous system after transplantation is an important concern when considering the efficacy of cell-based therapies (de Paula et al., 2009; Li et al., 2006). The use of venous access for the transplant of stem cells provides a dispersion of cells by systemic organs such as liver, spleen and lung (Atmaca-Sonmez et al., 2006). In contrast, the intracarotid infusion of stem cells enables higher levels of migration to the central nervous system than the intravenous injection (Walczak et al., 2008). Another important problem surrounding stem cell therapy is that delivered cells may not be able to penetrate the blood-retinal barrier (BRB) when administered systemically. However, the BRB breakdown and subsequent increase in vascular permeability are related to some retinal disorders such as retinal edema and inflammatory process (Cummings and Cunha-Vaz, 2008; Gardener et al., 1999). These conditions, in turn, may be observed in diseases such as AMD, retinitis pigmentosa, hypertension, uveitis and diabetic retinopathy (Catier et al., 2005; Cummings and Cunha-Vaz, 2008; Gardener et al., 1999). Moreover, the knowledge of BRB structure and function allows the investigations of BRB temporary control to adapt to effective therapies (Campbell et al., 2009; Gardener et al., 1999). So, it is important to investigate a more selective route to deliver stem cells such as the intra-arterial, which can be potentially useful in ocular diseases.

The sodium iodate (NaIO₃) can be employed as a chemical-induced model of retinal degeneration that results in RPE necrosis (Kiuchi et al., 2002), blood-retinal barrier disruption (Sen et al., 1992), and following photoreceptor degeneration (Machalinska et al., 2010) and choroidal atrophy (Korte et al., 1984). Moreover, this model has been used in the study of retinal degenerative diseases and cell-based therapy (Atmaca-Sonmez et al., 2006; Enzman et al., 2003; Harris et al., 2006; Li et al., 2006). Thus, the aim of the present study is to evaluate if BMNCs can migrate and provide acute effects on visual function after intracarotid infusion in a NaIO₃ model of retinal degeneration. Additionally, we used intracarotid infusion of BMNCs-derived lysate to evaluate the potential action of the BMNCs cellular contents.

2. Methods

2.1. Animals

Eighteen male mice C57Bl/6 (8 to 12 weeks of age) were used to evaluate cell transplantation and four C57Bl/6 GFP⁺ (green fluorescent protein) were used as donors of BMMCs. Mice were divided in three groups (n=6 for each group) that received BMMCs, BMMCs-derived lysate or saline infusion. Additional animals were used for histological control (n=1), PCR analysis (n=5) and flow cytometry (n=1). Animals were maintained in a room with an air-conditioned environment (21 ± 1 °C), a light-dark cycle of 12 hours and water and food *ad libitum*. All of the procedures were performed in accordance with the ARVO Resolution on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and all protocols used were approved by the Ethics Committee for Animal Use at PUCRS under 09/00110 registration number.

2.2. Induction of retinal degeneration

A single dose of 1% sodium iodate (Sigma, USA) in saline was delivered into the animal's tail vein, as described previously (Enzmann et al., 2006). In brief, a dose of 25 mg/kg of NaIO₃ was used for each animal. The mice were anesthetized with ketamine (40 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) before injection.

2.3. Preparation of BMMCs

BMMCs were obtained from C57Bl/6 mice expressing EGFP, which is used as a reporter of transplanted cells (Okabe et al., 1997). Fresh bone marrow was extracted from humeri, femurs and tibiae with a 26G needle containing heparin (10.000U in 50 ml of DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline). The material was centrifuged at 1500 rpm (400 g) for 10 minutes. The cell pellet was resuspended with the Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium and fractionated on a density gradient generated by centrifugation at 400 g over a Ficoll-Paque solution (Histopaque 11191 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque layer was collected and washed twice with DPBS. Cell concentrations were determined with a Neubauer-counting chamber. The number of

viable cells was determined by trypan blue exclusion. BMMCs were prepared in aliquots of 1×10^6 cells in DPBS.

2.4. Preparation of BMMCs-derived lysate

In addition to the BMMCs, BMMCs-derived lysate was used to intracarotid infusion. The same protocol to cell preparation of subsection 2.3. was used. The 1×10^6 BMMCs aliquots were embedded in liquid nitrogen (-196°C), macerated, resuspended and prepared in an entire volume of $50 \mu\text{L}$ in DPBS.

2.5. Phenotyping of BMMCs

For the evaluation of surface antigens, mononuclear cells from the bone marrow of a C57Bl/6 mouse were incubated for 30 minutes at 4°C with a specific antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE). The antibodies used were anti-CD19, CD45, CD117, CD34 and Sca-1 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). The samples were washed with DBPS to remove excess antibodies and fixed with paraformaldehyde at 3.6%. The samples were washed again with DBPS and resuspended in buffer sodium azide 0.01%. The detection of cells labeled with FITC and PE was performed by flow cytometry FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) equipped with argon laser 488 nm, using CellQuest software. Ten thousand events were collected for each measurement.

2.6. Intracarotid infusion

The infusion of BMMCs, BMMCs-derived lysate or saline - NaCl 9% - was performed on the third day after NaIO_3 -induced injury. The mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xilazine (16 mg/kg). An anterior midline incision was made in the neck to dissect the right common carotid artery. With the use of silk thread 7.0, the most caudal portion of the vessel was pulled in order to reduce the amount of bleeding after arterial puncture, with was made with an ultra thin wall needle (34G; 0.20mm/0.10mm - Outer diameter/Inner diameter) connected to an insulin syringe. During surgery, the animals were kept warm with a blanket,

and the eyes stayed hydrated with saline solution. An entire volume of 50 μ L was used in all the infusions.

2.7. PCR analysis

Two days after NaIO₃ injection, five additional animals received intracarotid infusion of BMMCs. To evaluate BMMCs migration in eye mice, PCR analysis for EGFP gene was performed at 1 hour (n=1) and 16 days (n=4) after transplantation. The animals were euthanatized and the eyes enucleated for samples. We used forward primer 5'-TTGAATTCGCCACCATGGTGAGC-3' and reverse primer 5'TTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3' complimentary to an EGFP DNA sequence and forward primer 5'-GGGCACAAGCTGGAGTACA-3' and reverse primer 5'-ATGTTGTGGCGGATCTTGA-3' for reamplification with the Nested-PCR technique (Okabe et al., 1997). A positive control sample (EGFP+ DNA extracted from C57Bl/6-EGFP mice) and a negative control sample (without any DNA) were essayed along with experimental samples in every reaction. Amplified products were detected by gel electrophoresis (agarose 2% containing ethidium bromide) and visualized under ultraviolet light.

2.8. Electroretinography

The mice were dark adapted overnight and all the testing procedures were performed under illumination of red LEDs. 1% tropicamide and 2.5% phenylephrine hydrochloride were used for mydriasis. The mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) and fixed in a stereotaxic apparatus. During testing, the body temperature was kept between 37 - 38 °C using a heating pad. Both eyes were tested and the eye contralateral to the test remained covered by an opaque contact lens filled with 0.1% carboxymethylcellulose. A custom-made recording electrode was built from a transparent micropipette tip, with a 2mm hole, a 1 cm length, and then filled with saline. The Ag-AgCl wire was inserted in the anterior tip and the posterior portion was coupled to 2 mm LED white light for photo stimulation. The ground electrode consisted of an Ag-AgCl wire covered with cotton moistened with a saline solution inserted into the mouth. The signal was conditioned by the amplification system CyberAmp 320 (Axon Instruments Inc), adjusted to a final gain of 1000X and limited in frequency by a low pass filter with a cutoff frequency of 200 Hz and notch filter setting to off. Points of interest for taking amplitude and implicit time were obtained from the average

between the peaks of maximum and minimum values of the sinusoid noise recorded on the ERG. After being conditioned with a Digidata 1322nd (Axon Instruments, USA), the signal was digitized using software AxoScope 9 (Axon Instruments, USA) and sampled at a rate of 10 kHz. Stimulus with 4 ms durations at intervals of 3 min were used in three luminance levels: 826 photopic cd/m², 13 x 10³ photopic cd/m² and 200 x 10³ photopic cd/m². The luminance was measured using a Luminance Meter LS-110 (Konica Minolta, Japan) with close-up lens No. 110. The position of the recording electrode was varied three times at each stimulus intensity and maximum recording elicited was chosen for further analysis.

2.9. Qualitative morphological analysis

Sixteen days after cell transplantation, mice from all three groups were euthanized by decapitation and the eyes were enucleated. Excess muscle and tissue were removed around the eyes and were then immersed in 4% paraformaldehyde at -4 °C (overnight). After the fixation, the eyes remained in 30% sucrose (24 hours) and were frozen at -20 °C for cryostat processing. Cross-sections of 20 µm were stained with cresyl violet using the Nissl method. Digitized images of the transversal sections were obtained with a video camera installed in an Olympus BX40 microscope interfaced by a software (Image Pro-plus 6.1, Media Cybernetics) run on a personal computer.

2.10. Statistical analysis

ERGs pre-injury and post-injury were compared using the Wilcoxon test. For the evaluation of treatments with BMBCs, lysate or saline, the Friedman test was performed to *b*-wave amplitude and implicit time measurements. ERGs of both the right and left eye were compared using the *t* test pre-injury, and the Mann-Whitney at other time periods. Time and treatment were evaluated using two-way ANOVAs to *b*-wave amplitude and implicit time. A statistics significance level of $\alpha = 0.05$ and $p < 0.05$ was applied to all tests.

3. Results

3.1. Characterization of BMMCs population

The mononuclear fraction of harvested bone marrow cells was positive for the following markers: CD34, CD19, CD45 and CD117 (data not shown).

3.2. BMMCs detection

We used five additional mice for evaluation of cell migration and incorporation of BMMCs after intracarotid infusion. PCR analysis revealed the presence of EGFP⁺ gene one hour after infusion, in the both right and left eyes of one animal. At 16 days after infusion, the results were positive for one animal, in both eyes, and for one animal only in the left eye (Fig. 1).

3.3. Electretinography

Electretinography was performed to evaluate the visual function after BMMCs and BMMCs-derived lysate. The ERGs obtained from each animal before the administration of NaIO₃ was used as the control measure (Fig. 2A). Two days after sodium iodate administration, electretinography was performed for injury characterization. At this time, the amplitudes of both *a*-wave and *b*-wave were significantly lower when compared to control records for both eyes ($p < 0.05$) (Fig. 2B). The ERG was abolished in five animals (of total 18): one BMMC-treated mouse, two saline-treated mice and two lysate-treated mice. The implicit time for both *a*-wave and *b*-wave showed significant difference in the left eyes ($p < 0.05$), while from right eyes, *a*-wave implicit time showed no difference ($p > 0.05$). The data are summarized in Table 1. Electretinography was conducted with three light stimulus intensities. At 826 photopic cd/m², when a rod-specific response could be elicited (Fig. 2A lower), the ERG was responsive in only one animal. At 13×10^3 photopic cd/m² flash intensity, the ERG responses were extinguished in ten animals (of total 18). Thus, we used the responses elicited by 200×10^3 photopic cd/m² stimulus for statistical analysis after intracarotid infusion.

Seven and 16 days after intracarotid infusion, the ERG responses were observed in the four animals of the BMMCs group. On the other side, for each BMMCs-derived lysate and

saline group only one animal showed ERG response. Figures 2C and 2D show representative ERGs obtained at day 7 and day 16. The amplitude and implicit time showed no significant difference between treatments or when compared two days after injury with the 7 and 16 days measurements after transplantation ($p > 0.05$) (Table 2).

The comparison of *a*-wave and *b*-wave parameters (pre-injury) or *b*-wave (post-injury, 7d and 16d) between right and left eyes showed no significant difference ($p > 0.05$). Figure 3 represents a comparison between *b*-wave amplitude (Fig. 3A) and *b*-wave implicit time (Fig. 3B) from the both eyes.

3.4. Retinal damage - qualitative evaluation

Sixteen days after transplantation the mice were euthanatized for morphological analysis to evaluate the retinal damage induced by sodium iodate. Figure 4 shows a comparison between control (Fig. 4A) and damaged retina (Fig. 4B). In most of animals, the sodium iodate induced severe injury across the central retina, where the outer nuclear layer was completely reduced (Fig. 4-B1), and only the peripheral retina maintained the normal structure (Figure 4-B2). Few remaining photoreceptor nuclei were observed around disc optic (data not shown). The inner retinal layer showed no severe changes. In some animals, we found a relatively degree of photoreceptor preservation in central retina. However, the nuclei was reduced in few rows (data not shown).

4. Discussion

From a clinical perspective BMMCs are attractive, since they represent an endogenous source of stem cells which are easily harvested from bone marrow thus allowing autologous transplantation. However, efficient cell delivery and survival are major barriers to successful cellular transplantation in the retina. We demonstrate here for the first time, the migration and incorporation of intracarotid delivered BMMCs in the retinal injury sites of a retinal degeneration model. Using PCR analysis the BMMCs/GFP⁺ could be detected at one hour and 16 days after intra-arterial administration. These data indicate robust migration in injury sites and survival for 16 days.

Important clinical studies have been performed to improve the intra-arterial approach to treatments of ophthalmic diseases like chemotherapy for retinoblastoma, due to high selectivity of this route for the target of treatment, whereas the venous administration is less specific (Brodie et al., 2009). The remaining problem surrounding systemically transplanted cells for retinal degeneration treatment is that cells are not able to penetrate the blood-retinal barrier. The BRB consists of the inner-blood retinal barrier, comprised of the retinal vascular endothelium in retinal plexiform layers, and the outer blood-retinal barrier, comprised of the RPE cells and the vascular endothelium cells. Both, inner and outer barriers regulate the barrier permeability by tight junctions between cells (Vinores, 1985). In a NaIO₃ model, one of the consequences of the RPE cells destruction is the disruption of BRB (Sen et al., 1992). In rabbits, the fluorescein leakage through the RPE was detected by angiography from 24 hours to seven days after NaIO₃ administration, a concurrent final period with the intrinsic restoration of the RPE (Korte et al., 1984). In the present study, we administered BMMCs three days after NaIO₃-induced injury, at this time the outer BRB breakdown was not probably restored yet. Therefore, the intra-arterial administration of BMMCs allows the incorporation of cells in the NaIO₃-induced injury sites, as seen by PCR results. The mechanisms and factors underlying the migration and homing of BMMCs to the lesioned area are not fully understood. Higher amounts of cytokines and chemokines from the injured tissue have been reported to function as chemoattractants for these cells (Li et al., 2006; Harris et al., 2009).

ERG studies were undertaken to evaluate if the magnitude of the migration and homing of transplanted BMMCs were sufficient to the regenerated retinal cells become electrophysiologically functional after acute damage. Two days after NaIO₃ administration, electroretinography was performed to assess retinal damage. The persistence of ERG in most

of animals (13 of 18). This observation is consistent with literature data, which show preserved ERGs three days after administration of a low dose of sodium iodate (20 mg/kg), whereas a larger dose (40 mg/kg) extinguished the ERG in the same period (Machalinska et al., 2010). After carotid infusion, we compared the *b*-wave parameters between groups and between day 7 and day 16 in each group. However, despite of migration and incorporation of BMSCs, there was no significant difference in the ERG between BMSCs, BMSCs-derivate lysate or saline-solution-treated mice.

An acute protective effect on retinal function was described after non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor (nm-haFGF) administration in NaIO₃-treated Wistar rat (Chen et al., 2009). However, no difference was observed in relation to control on ERG records at day 21 after nm-haFGF administration (Chen et al., 2009). The human hepatocyte growth factor (HGF) also has a protective effect after NaIO₃ treatment in Sprague-Dawley rats, when administered two days before injury (Ohtaka et al., 2006). In this case, the authors observed that RPE was preserved after NaIO₃ administration, when comparing HGF-treated eyes with untreated, explaining the larger ERG amplitudes from treated eyes. Therefore, systemic (Wang et al., 2010) and subretinal (Inoue et al., 2007; Lu et al., 2010) transplantation of MSCs promote neuroprotection in the RCS rats, which present a slower degeneration than the sodium iodate model. In the present study, the severe damage induced by NaIO₃ may indicate a photoreceptor degeneration stage, at infusion time, in which is late to expressive neuroprotection or functional restoration. The secretion of neurotrophic factors by transplanted BMSCs might be used to stimulate resident quiescent stem cells located in the peripheral ciliary margin to regenerate retina cells and to protect the surviving neurons (Tropepe et al., 2000; Otani et al., 2002, 2004). It is becoming increasingly evident that to restore the function interaction between cell types in the damaged retina is necessary. ERG evaluation showed that the transplanted BMSCs were insufficient for restore the retinal functionality. Since the damaged retina is not a permissive milieu in which transplanted or locally proliferating cells could easily integrate, it's possible that the functional cell integration could be insufficient to recover the ERG in most animals, reflecting the net effect of surviving cells and cell-to-cell communication.

At day 16 after intacarotid transplantation, in most of animals the outer nuclear layer was absent in central retina, and remained preserved only in the peripheral regions, with a few nuclei in the optic disc surroundings. The greater resistance to sodium iodate of the periphery has been described in the literature (Korte et al., 1994; Mizota and Adachi-Usami, 1997; Machalinska et al., 2010) and may be related to vascular anatomy, metabolism differences, or

more regenerative potential of the RPE in peripheral regions (Machalinska et al., 2010). Machalinska et al. (2010) described ERG records up to 28 days after injury-induced by 20 mg/kg of NaIO₃ administered via orbital venous plexus in mice, suggesting that remained peripheral regions retain the function observed in ERG. This observation, differ from the extinguished ERGs observed in our study possibly due to reasons like sodium iodate over dosage or method for the injury induction.

Interestingly, 16 days after intracarotid infusion of BMMCs, four animals maintained ERGs recordable, whereas only one of each group BMMCs-derived lysate and Saline presented ERG detectable. Retinal regeneration by stem cells transplantation, special consideration should be given to the environment in which these cells are to be transplanted. Following NaIO₃ exposure widespread damage to RPE cells is visible as massive necrosis and breakdown of the blood-retina barrier. These processes may be accompanied by inflammation (Machalinska et al., 2010). The inflammatory response induced by chemical injury although have been implicated in signaling migratory pathways for progenitor cells, can also adversely affect cell proliferation and induce cell death (Belmadani et al., 2006). On the other hand the transplanted BMMCs could switch the retinal microenvironment to cell proliferation permissiveness (de Paula et al., 2010). So, in spite of all these potential adverse effects we were able to detect donor cells into the retina of lesioned mice 16 days after the transplantation suggesting that the balance between cell proliferation and cell death in the milieu are more complex than at first indicated. Therefore, it would be of great interest to elucidate the mechanism underlying our observation.

In conclusion, our findings about the migration and survival of cells after intracarotid infusion encourages further studies using the intraarterial route to deliver stem cells or cell vectors for the synthesis and/or release of neurotrophic factors. Moreover, experimental aspects such as injury size, cellular type and delivery timing need to be optimized in order to continue investigating the possibility of potential of BMMCs transplantation for retinal regeneration.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Pandurata Ltda. B.M.L. França received a Master's scholarship from CAPES. J.C. da Costa and A.C.G. Almeida are researchers of the National Council of Scientific and Technological Development.

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interests.

All authors approved the final article.

Author Contributions

França, B.M.L., de Paula, S. and DaCosta, J.C. participated in research design. França, B.M.L., de Paula, S., Marinowic, R.V. and Azevedo, D.F.G. de participated in the performance of the research. França, B.M.L., Almeida, A.C.G. and DaCosta, J.C. participated in data analysis. França, B.M.L., de Paula, S., Marinowic, R.V., Azevedo, D.F.G. de, Almeida A.C.G. and DaCosta, J.C. participated in the writing of the article.

References

- Atmaca-Sonmez, P., Li, Y., Yamauchi, Y., Schanie, C.L., Ildstad, S.T., Kaplan, H.J., Enzmann, V., 2006. Systemically transferred hematopoietic stem cells home to the subretinal space and express RPE-65 in a mouse model of retinal pigment epithelium damage. *Exp. Eye Res.* 83, 1-8.
- Adachi-Usami, E., Mizota, A., Ikeda, H., Hanawa, T., Kimura, T., 1992. Transient increase of b-wave in the mouse retina after sodium iodate injection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 3109-3113.
- Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., Miller, R.J., 2005. The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J. Neurosci.* 25, 3995-4003.
- Berkowitz, B.A., Roberts, R., Luan, H., Peysakhov, J., Mao, X., Thomas, K.A., 2004. Dynamic contrast-enhanced MRI measurements of passive permeability through blood retinal barrier in diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2391-2398.
- Berson, E.L., 2007. Long-term visual prognoses in patients with retinitis pigmentosa: the Ludwig von Sallmann lecture. *Exp. Eye Res.* 85, 7-14.
- Brodie, S.E., Pierre, Gobin. Y., Dunkel, I.J., Kim, J.W., Abramson, D.H. 2009. Persistence of retinal function after selective ophthalmic artery chemotherapy infusion for retinoblastoma. *Doc. Ophthalmol.* 119, 13-22.
- Campbell, M., Nguyena, A.T.H., Kianga, A.-S., Tama, L.C.S., Gobbob, O.L., Kerskense, C., 2009. An experimental platform for systemic drug delivery to the retina. *PNAS.* 42, 17817-17822.
- Catier, A., Tadayoni, R., Paques, M., Erginay, A., Haouchine, B., Gaudric, A., Massin, P., 2005. Characterization of macular edema from various etiologies by optical coherence tomography. *Am. J. Ophthalmol.* 140, 200-6.
- Chen, W., Yu, M., Wang, Y., Peng, Y., Li, X., Lam, D.M., Chen, X., Liu, X., 2009. Non-mitogenic human acidic fibroblast growth factor reduces retinal degeneration induced by sodium iodate. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 25, 315-320.
- Cummings, M., Cunha-Vaz, J., 2008. Treatment of neovascular age-related macular degeneration in patients with diabetes. *Clin. Ophthalmol.* 2, 369-375.
- de Paula, S., Vitola, A.S., Greggio, S., de Paula, D., Mello, P.B., Lubianca, J.M., Xavier, L.L., Fiori, H.H., DaCosta, J.C., 2009. Hemispheric brain injury and behavioral deficits

- induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatric Research*. 6, 631-635.
- de Paula, S., Greggio, S., DaCosta, J.C., 2010. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J. Pediatr*. 6, 451-464.
- Enzmann, V., Howard, R.M., Yamauchi, Y., Whittemore, S.R., Kaplan, H.J., 2003. Enhanced induction of RPE lineage markers in pluripotent neural stem cells engrafted into the adult rat subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44, 5417-5422.
- Enzmann, V., Row, B.W., Yamauchi, Y., Kheirandish, L., Gozal, D., Kaplan, H.J., McCall, M.A., 2006. Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. *Exp. Eye Res*. 82, 441-448.
- Franco, L.M., Zulliger, R., Wolf-Schnurrbusch, U.E., Katagiri, Y., Kaplan, H.J., Wolf, S., Enzmann, V., 2009. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 50, 4004-4010.
- Gardner, T.W., Antonetti, D.A., Barber, A.J., Lieth, E., Tarbell, J.A., and The Penn State Retina Research Group, 1999. The molecular structure and function of the inner blood-retinal barrier. *Documenta Ophthalmologica*. 97, 229-237.
- Harris, J.R., Brown, G.A., Jorgensen, M., Kaushal, S., Ellis, E.A., Grant, M.B., Scott, E.W., 2006. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 47, 2108-2113.
- Harris, J.R., Fisher, R., Jorgensen, M., Kaushal, S., Scott, E.W., 2009. CD133 Progenitor Cells from the Bone Marrow Contribute to Retinal Pigment Epithelium Repair. *Stem Cells*. 27, 457-466.
- Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 368, 1795-1809.
- Inoue, Y., Iriyama, A., Ueno, S., Takahashi, H., Kondo, M., Tamaki, Y., Araie, M., Yanagi, Y., 2007. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp. Eye Res*. 85, 234-241.
- Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G., Nolta, J.A., 2010. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med*. 5, 933-946.
- Keimpema, E., Fokkens, M.R., Nagy, Z., Agoston, V., Luiten, P.G., Nyakas, C., Boddeke, H.W., Copray, J.C., 2009. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 35, 89-102.

- Kicic, A., Shen, W-Y., Wilson, A.S., Constable, J.J., Robertson, T., Rakoczy, P.E., 2003. Differentiation of Marrow Stromal Cells into Photoreceptors in the Rat Eye. *J. Neurosci.* 23, 7742–7749.
- Kiuchi, K., Yoshizawa, K., Shikata, N., Moriguchi, K., Tsubura, A., 2002. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr. Eye Res.* 25, 373-379.
- Korbling, M., Estrov, Z., Champlin, R., 2003. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant.* 32, S23-24.
- Korte, G.E., Reppucci, V., Henkind, P., 1984. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 1135-1145.
- Korte, G.E., Perlman, J.I., Pollack, A., 1994. Regeneration of mammalian retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 152, 223-263.
- Li, Y., Reza, R.G., Atmaca-Sonmez, P., Ratajczak, M.Z., Ildstad, S.T., Kaplan, H.J., Enzmann, V., 2006. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1646-1652.
- Lu, B., Wang, S., Girman, S., McGill, T., Ragaglia, V., Lund, R., 2010. Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 91, 449-445.
- Machalinska, A., Lubinski, W., Klos, P., Kawa, M., Baumert, B., Penkala, K., Grzegorzolka, R., Karczewicz, D., Wiszniewska, B., Machalinski, B., 2010. Sodium iodate selectively injures the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. *Neurochem. Res.* 35, 1819-1827.
- Mizota, A., Adachi-Usami, E., 1997. Functional recovery of retina after sodium iodate injection in mice. *Vision. Res.* 37, 1859-1865.
- Nilsson, S.E., 2006. From basic to clinical research: a journey with the retina, the retinal pigment epithelium, the cornea, age-related macular degeneration and hereditary degenerations, as seen in the rear view mirror. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 84, 452-465; 451.
- Ohtaka, K., Machida, S., Ohzeki, T., Tanaka, M., Kurosaka, D., Masuda, T., Ishii, T., 2006. Protective effect of hepatocyte growth factor against degeneration of the retinal pigment epithelium and photoreceptor in sodium iodate-injected rats. *Curr. Eye Res.* 4, 347-55.

- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y., 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 5, 313-9.
- Otani, A., Kinder, K., Ewalt, K., Otero, F.J., Schimmel, P., Friedlander, M., 2002. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med.* 8, 1004-10.
- Otani, A., Dorrell, M.I., Kinder, K., Moreno, S.K., Nusinowitz, S., Banin, E., Heckenlively, J., Friedlander, M., 2004. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* 114, 765-774.
- Sen, H.A., Berkowitz, B.A., Ando, N., de Juan E, Jr., 1992. In vivo imaging of breakdown of the inner and outer blood-retinal barriers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 3507-12.
- Tomita, M., Adachi, Y., Yamada, H., Takahashi, K., Kiuchi, K., Oyaizu, H., Ikebukuro, K., Kaneda, H., Matsumura, M., Ikehara, S., 2002. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells.* 20, 279-283.
- Tomita, M., Mori, T., Maruyama, K., Zahir, T., Ward, M., Umezawa, A., Young, M.J., 2006. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells.* 24, 2270-78.
- Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R., van der Kooy, D., 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 287, 2032-6.
- Vinore, S.A., 1995. Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histol. Histopath.* 10, 141-154.
- Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A.A., Kedziorek, D.A., Ruiz-Cabello, J., Young, R.G., Pittenger, M.F., van Zijl, P.C., Huang, J., Bulte, J.W., 2008. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke.* 39, 1569-1574.
- Wang, H.C., Brown, J., Alayon, H., Stuck, B.E., 2010. Transplantation of quantum dot-labelled bone marrow-derived stem cells into the vitreous of mice with laser-induced retinal injury: Survival, integration and differentiation. *Vision Research.* 50, 665-673.
- Wang, S., Lu, B., Girman, S., Duan, J., McFarland, T., Zhang, Q.-S., Grompe, M., Adamus, G., Appukuttan, B., Lund, R., 2010. Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS ONE.* 5, 1-9.
- Yuan, X., Gu, X., Crabb, J.S., Yue, X., Shadrach, K., Hollyfield, J.G., Crabb, J.W., 2010. Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid

complex from age-related macular degeneration and normal eyes. *Mol. Cell. Proteomics*. 9, 1031-1046.

Figure legends

Fig. 1. PCR analysis. Amplified eGFP DNA was found in both periods evaluated after intracarotid infusion: at 1 hour in the both right and left eyes (top right); at day 16 in the left eye for one animal (top left) and in both eyes for one animal (lower). C1. Positive control sample. C2. Negative control sample.

Fig. 2. Representative ERG waveforms recorded at each experimental time periods from both eyes. The left columns of A to D represent the records from the left eyes. A. ERGs obtained pre-injury induction. Stimulus intensities were I: 826, II: 13×10^3 and III: 200×10^3 photopic cd/m^2 . B. ERGs obtained 2 days after NaIO_3 injection. C, D. ERGs obtained at 7 and 16 days, respectively, after intracarotid infusion of saline (upper), BMMCs (middle) and BMMCs-derived lysate (below). Four animals of BMMCs showed maintenance of ERG at day 16, whereas only one from each other groups presented records. B-D stimulus intensity was 200×10^3 photopic cd/m^2 . The positive and negative spikes at the beginning of records are stimulus artifacts.

Fig. 3. Comparison of the *b*-wave parameters between left and right eyes. The data are the values obtained from each animal in response a 200×10^3 photopic cd/m^2 flash intensity across all experimental time periods. The values of (A) amplitude and (B) implicit time showed no significant difference between the both eyes in pre-injury, post-injury and in day 7 and day 16 after intracarotid infusion.

Fig. 4. Digitized image of transversal sections of the mouse retina. A. Control mouse untreated with NaIO_3 : central retina (A1) and peripheral retina (A2). B. NaIO_3 treated mice: sixteen days after intracarotid infusion the central retina presents complete reduction of ONL (B1). Peripheral retina was less committed and show preserved ONL (B2). Spaces between cells are artifacts of processing. Sections were stained with Nissl. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GL: ganglionar layer. Scale bar = $25\mu\text{m}$.

Figure 1

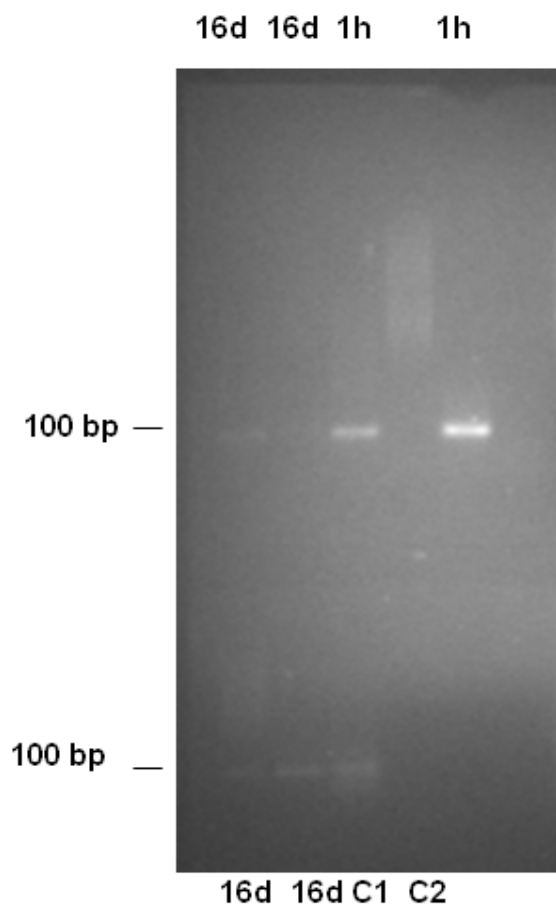


Figure 2

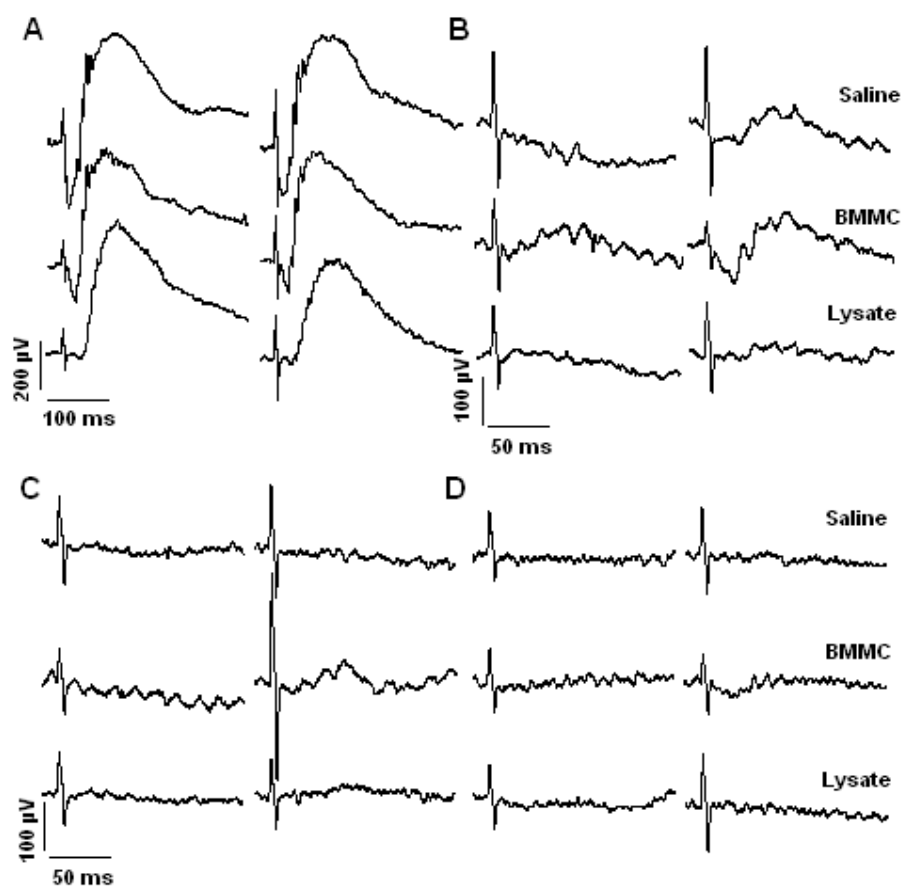


Figure 3

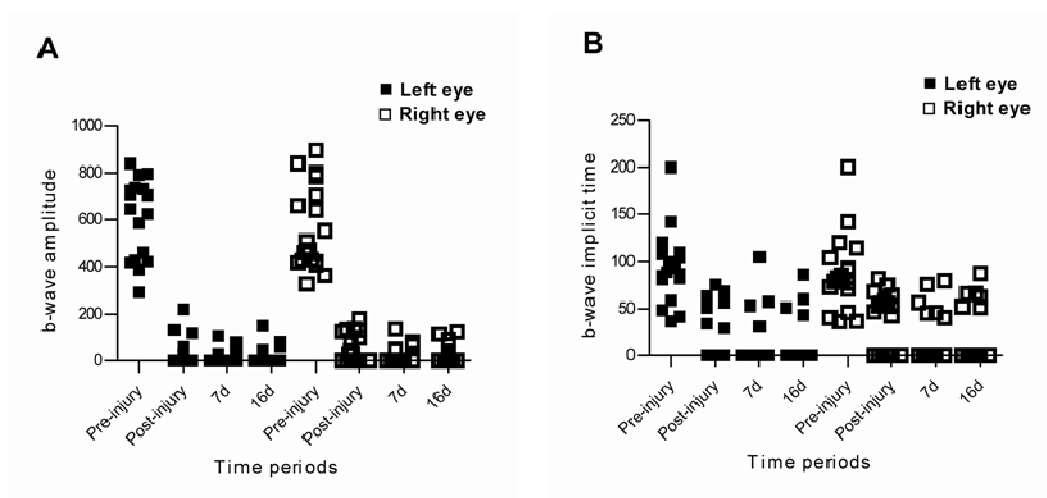


Figure 4

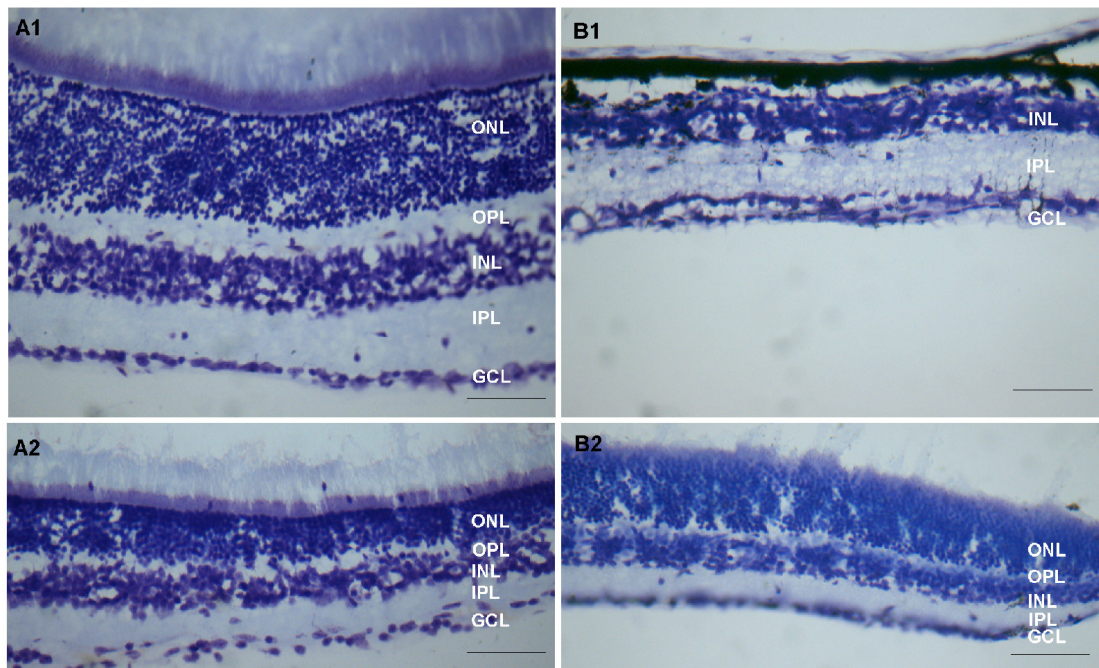


Table 1

ERGs obtained at pre and post-injury, before intracarotid infusion.

ERG	Pre NaIO ₃ mean ± SD		Post NaIO ₃ median (minimum and maximum)		<i>p</i> ^a
	Left eye	Right eye	Left eye	Right eye	
<i>a</i> -wave amplitude (μV)	221.1 ± 55.15a	198.9 ± 50.30	0.0 (0.0 to 88.20)	32.70 (0.0 to 75.40)	0.0002/0.0002
<i>a</i> -wave implicit time (ms)	14.79 ± 2.94b	14.09 ± 1.94	0.0 (0.0 to 27.19)	0.0 (0.0 to 31.90)	0.0065/0.1385
<i>b</i> -wave amplitude (μV)	612.0 ± 166.7c	562.9 ± 178.8	0.0 (0.0 to 221.6)	0.0 (0.0 to 180.4)	0.0002/0.0002
<i>b</i> -wave implicit time (ms)	93.65 ± 38.00d	87.45 ± 40.31	0.0 (0.0 to 75.10)	53.10 (0.0 to 81.60)	0.005/0.0011

Variables were compared using the Wilcoxon test. $\alpha = 0.05$.^a Pre NaIO₃ versus Post NaIO₃: left eye / right eye.

Table 2

ERG parameters at 7 and 16 days after intracarotid infusion of saline, BMMC and lysate.

ERG	Day 7 median (minimum and maximum)			Day 16 median (minimum and maximum)			<i>p</i>
	Saline	BMMC	Lysate	Saline	BMMC	Lysate	
<i>b</i> -wave amplitude (Left) ^a	0.0 (0.0 to 106.8)	0.0 (0.0 to 43.90)	0.0 (0.0 to 79.30)	0.0 (0.0 to 150.1)	0.0 (0.0 to 57.35)	0.0 (0.0 to 80.60)	0.5199
<i>b</i> -wave amplitude (Right) ^b	0.0 (0.0 to 136.8)	46.98 (0.0 to 66.20)	0.0 (0.0 to 80.60)	0.0 (0.0 to 123.9)	25.25 (0.0 to 91.55)	0.0 (0.0 to 114.1)	0.5199
<i>b</i> -wave implicit time (Left) ^a	0.0 (0.0 to 105.0)	0.0 (0.0 to 57.40)	0.0 (0.0 to 53.00)	0.0 (0.0 to 51.10)	0.0 (0.0 to 85.85)	0.0 (0.0 to 43.60)	0.3330
<i>b</i> -wave implicit time (Right) ^b	0.0 (0.0 to 75.60)	45.73 (0.0 to 79.25)	0.0 (0.0 to 40.70)	0.0 (0.0 to 66.30)	56.90 (0.0 to 87.45)	0.0 (0.0 to 51.80)	0.3330

Variables were compared using the Friedman test. $\alpha = 0.05$.^a Left: data obtained from the left eyes.^b Right: data obtained from the right eyes.

ANEXO A — Confirmação da submissão do artigo científico

-----Mensagem original-----

De: ees.yexer.0.f3aaa.62cfabc2@eesmail.elsevier.com em nome de Experimental Eye Research

Enviada: qua 2/16/2011 14:03

Para: Jaderson Costa da Costa

Assunto: Submission Confirmation

Experimental Eye Research

Title: Intracarotid delivered bone marrow mononuclear cells can be detected into eyes of sodium iodate lesioned mice

Authors: Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD; Bibiana M França; Simone de Paula, MSc;

Daniel R Marinowic; Dario F Azevedo, PhD; Antônio-Carlos G Almeida, MSc, PhD

Article Type: Research Article

Dear Mr DaCosta,

Your submission referenced above has been received by Experimental Eye Research.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an Author. The URL is <http://ees.elsevier.com/yexer/>.

Your username is: DaCosta

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to Experimental Eye Research.

Yours sincerely,

Experimental Eye Research

ANEXO B — Carta de aprovação do projeto pelo CEU-PUCRS

Luiziano

Recebido em 31/10/09




Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 095/09 – CEUA Porto Alegre, 22 de outubro de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00110, intitulado: **"Efeito do transplante de células-tronco em retina de camundongos após indução de lesão com NaIO₃"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Anamaria Feijó
Prof.ª Dr. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60 sala 314
CEP: 91610-100
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br