



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP  
09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

[iniciacao@ufabc.edu.br](mailto:iniciacao@ufabc.edu.br)

Projeto de Iniciação Científica submetido  
para avaliação no Edital: 04/2022

**Título do projeto:** Análise da necroptose na retinose pigmentar, envolvendo a RIPK1, RIPK3 e caspase-8, em modelos animais C57Bl/6J e Rd1.

**Tema de atuação:** Neurobiologia, envolvendo as seguintes temáticas:

necroptose, RIPK1, RIPK3, caspase-8 e retinose pigmentar.

## RESUMO

A retina pode ser acometida por diversas patologias neurodegenerativas, e uma das mais recorrentes é a retinose pigmentar, uma doença com diversas mutações gênicas que pode afetar a funcionalidade dos fotorreceptores, envolvendo a perda progressiva de bastonetes, que geralmente é seguida pela morte de cones. Os mecanismos associados com a perda celular primária de bastonetes e secundária de cones ainda não são totalmente compreendidos. Neste contexto, a necroptose, um sistema de morte celular necrótica programada, controlada pela atividade quinase de RIPK1 e RIPK3, e relacionada a caspase-8, tem sido amplamente associada com a perda de fotorreceptores na retinose pigmentar. Tendo em vista que a inibição da necroptose pode se tornar uma opção para o tratamento de doenças neurodegenerativas, ela pode ser um alvo terapêutico promissor na prevenção e no retardo da degeneração dos fotorreceptores. O projeto aqui apresentado tem por intenção realizar uma análise dos mecanismos de morte celular por necroptose na patologia retinose pigmentar, utilizando modelos animais de camundongo com mutação na fosfodiesterase 6-beta e, portanto, portadores da retinose pigmentar. Além disso, pretendemos acompanhar o desenvolvimento de metodologias moleculares e celulares, visando propor, ao final da iniciação científica, possíveis intervenções para o tratamento desta retinopatia.

**Palavras-chaves:** Necroptose, retinose pigmentar, RIPK1, RIPK3 e caspase-8

## SUMÁRIO

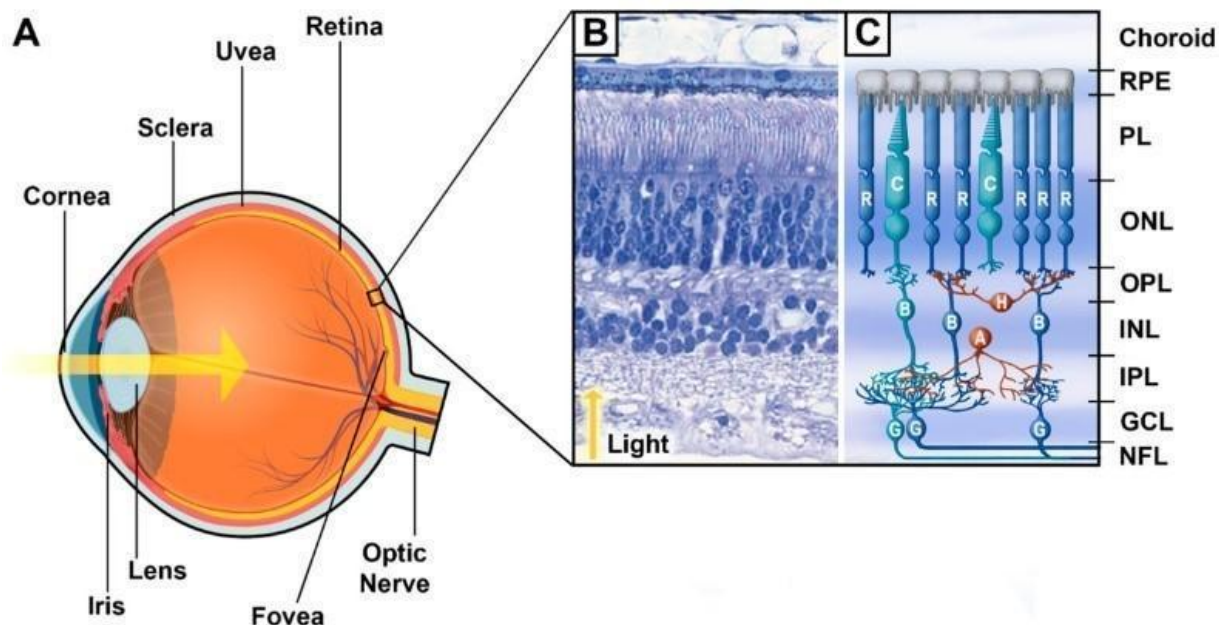
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>4</b>
1.1. Retinose pigmentar	4
1.2. Tipos de morte celular	6
1.3. Necroptose	8
1.4. Necroptose na retinose pigmentar	11
<b>2. Justificativa</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
3.1. Objetivos gerais	11
3.2. Objetivos específicos	12
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>11</b>
4.1. Animais	11
4.2. Imunofluorescência	12
4.3. TUNEL	13
4.4. Western blot	13
4.5. Análise de dados	14
<b>5. RESULTADOS PRELIMINARES</b>	<b>15</b>
<b>6. DESCRIÇÃO DA VIABILIDADE DO PROJETO</b>	<b>17</b>
<b>7. CRONOGRAMA</b>	<b>17</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>18</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Retinose pigmentar

O olho dos mamíferos é composto por três camadas concêntricas e distintas de tecido: a esclera, a úvea e a retina (**Figura 1, A**). Sendo a região mais interna do globo ocular, a retina tem uma organização laminar e nos mamíferos é um mosaico complexo composto por cinco classes de células especializadas em processar a informação visual recebida pelo olho, que são os fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontais e células amácrinas (**Figura 1 B, C**) <sup>(1)</sup>.

Os fotorreceptores são as células sensoriais da retina e responsáveis por transformar a luz em impulsos elétricos através da transdução. Há dois tipos de fotorreceptores: os bastonetes, localizados mais na área periférica da retina e que funcionam principalmente com pouca luz (visão noturna), fornecendo a visão preto e branco, e os cones, que estão mais concentrados no centro da retina (mácula) e funcionam em condições de boa iluminação, sendo responsáveis pela percepção das cores e pela visão de alta acuidade. Já as células bipolares, ganglionares, horizontais e amácrinas não respondem diretamente à luz, mas processam e transmitem as informações geradas a partir dos fotorreceptores <sup>(1)</sup>.



**Figura 1.** O olho e a estratificação da retina. (A) Uma seção sagital do olho (criada com Biorender.com). (B) Uma seção transversal corada com Hematoxilina e Eosina (H&E) de uma retina humana. (C) Organização esquemática das células da retina do epitélio pigmentar da retina até a camada de fibras nervosas. R, bastonetes; C, cones; H, células horizontais; B, células bipolares; A, células amácrinas; G, células ganglionares da retina; EPR, epitélio pigmentar da retina; PL, camada fotorreceptora; ONL, camada nuclear externa; OPL, camada plexiforme externa; INL, camada nuclear interna; IPL, camada plexiforme interna; GCL, camada de células ganglionares; NFL, camada de fibras nervosas. Figura modificada do Ptito (2021) <sup>(1)</sup>.

Ademais, uma das retinopatias mais comuns é a retinose pigmentar, uma doença hereditária e degenerativa dos olhos caracterizada pela perda progressiva de bastonetes, que geralmente é seguida pela perda de cones. Atualmente, estima-se que a retinose afeta cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo. Essa patologia, em humanos, é dividida em três estágios: no estágio inicial ocorre o começo da morte das células bastonetes na região periférica da retina, gerando a perda progressiva da visão noturna, já no estágio intermediário a cegueira noturna

se agrava, e surgem manchas na visão lateral e perda da acuidade visual, além da morte de bastonetes e de cones. Por fim, no estágio final, as manchas fundem-se e geram a chamada “visão de túnel”, e com a progressão da doença há perda da visão central e até cegueira eventual <sup>(2,4)</sup>.

Essa doença pode ser do tipo não-sindrômico, ou seja, ocorre sozinha e sem quaisquer outros achados clínicos, e do tipo sindrômico, com outros distúrbios neurosensoriais, anormalidades do desenvolvimento e achados clínicos complexos, ou secundária a outras doenças <sup>(3)</sup>. Além disso, por exibir grande heterogeneidade clínica e gênica, pode ser herdada como uma doença autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao cromossomo X ou adquirida pela mitocôndria, e são dependentes das mutações específicas do gene na geração dos pais <sup>(4)</sup>. Vale ressaltar ainda que mais de 90 genes foram associados a retinose pigmentar não-sindrômica, porém apenas cerca de 50% a 60% dos casos dessa retinopatia podem ser explicados por tais mutações, e os mecanismos patológicos e moleculares de alguns dos genes ainda são desconhecidos <sup>(5)</sup>.

O diagnóstico clínico baseia-se na presença de cegueira noturna e defeitos do campo visual periférico, lesões no fundo de olho, traçados hipovoltizados na eletrorretinografia e piora progressiva destes sinais. Mesmo que os resultados desses testes apoiem o diagnóstico, testes adicionais são necessários para confirmar outras características patológicas. Além disso, o histórico familiar auxilia a determinar o diagnóstico devido ao modo genético de herança da doença <sup>(4)</sup>.

Atualmente não há uma cura para retinose pigmentar, mas há diversos tratamentos que estão sendo avaliados, e as terapias atuais em ensaios clínicos para tal retinopatia incluem terapia gênica, terapia celular e próteses de retina <sup>(2)</sup>. Portanto, tratamentos futuros podem envolver transplantes de retina, implantes de retina artificial, células-tronco, suplementos nutricionais e/ou terapias medicamentosas <sup>(3)</sup>.

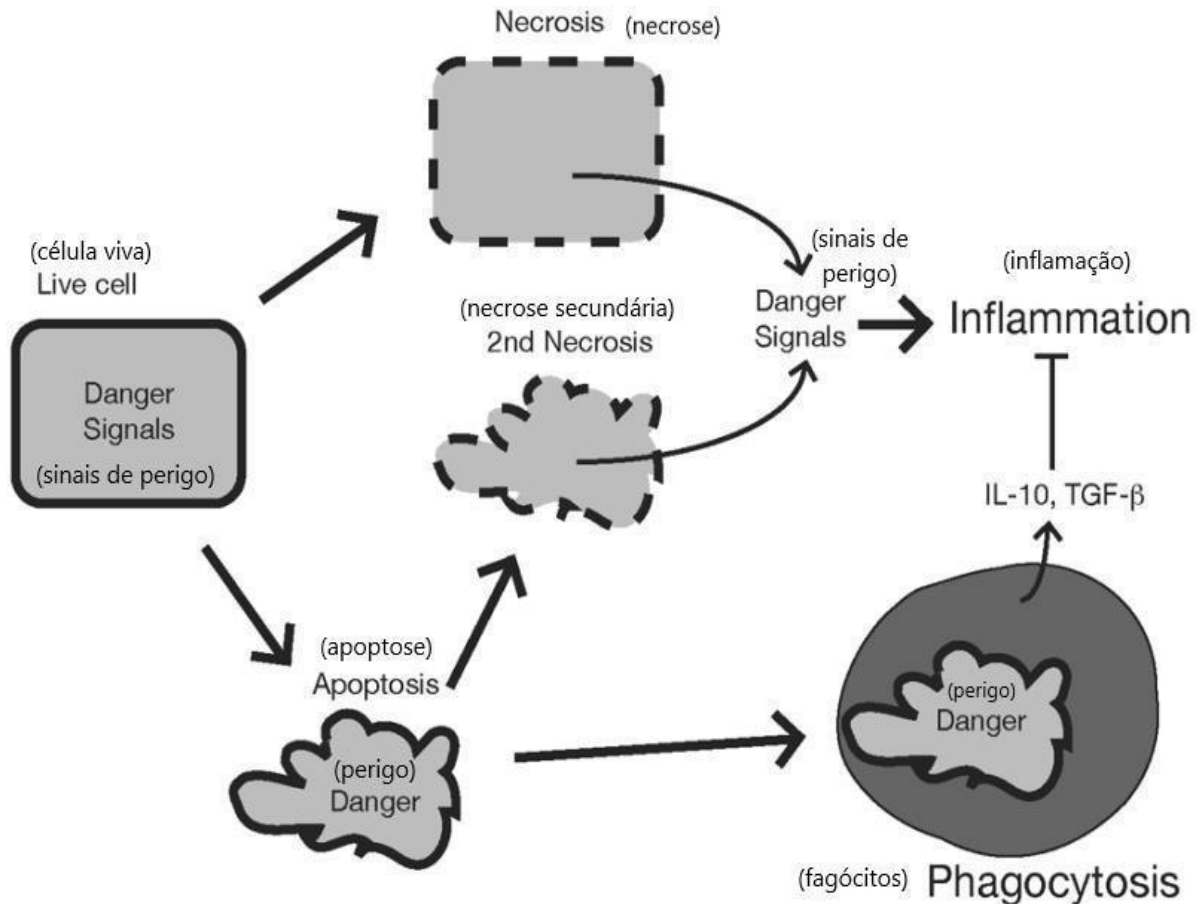
## **1.2. Tipos de morte celular**

A morte celular é um processo fundamental que controla o organismo, o desenvolvimento e homeostase, regulando o número de células e a eliminação de células danificadas ou infectadas, pode ocorrer através de vários mecanismos diferentes. Os dois principais tipos de morte celular são a apoptose e a necrose <sup>(6)</sup>.

A apoptose, um processo genético de destruição programada de células que não são mais desejadas, é a principal forma de morte celular regulada que contribui para a patologia em diversas doenças humanas, tem como mecanismo regulatório predominante a ativação das caspases, e morfologicamente, as células apoptóticas encolhem e inicialmente mantêm a integridade de sua membrana plasmática <sup>(6,7)</sup>. Já a necrose ocorre em resposta a insultos, como trauma e toxinas, e é morfologicamente definida por lise celular com liberação de conteúdo intracelular no espaço extracelular, e que ocorre acidentalmente, decorrente de eventos que interrompem o funcionamento celular normal, além disso ela é um dos principais pilares da inflamação **(Figura 2)** <sup>(6)</sup>.

Ademais, a partir de estudos subsequentes sobre tais processos de morte celular, foi levantado o questionamento se haveria um mecanismo regulado que intervisse na execução da necrose, semelhante à das caspases na mediação da apoptose, e foram estabelecidos alguns exemplos de tal mecanismo, como a ferroptose, caracterizada pelo acúmulo de ferro intracelular ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e desregulação do metabolismo do glutamato, a piroptose, descrita como uma forma alternativa de apoptose que resulta em lise da membrana celular e resposta inflamatória, a piroptose, iniciada quando a proteína gasdermina D ou a gasdermina E são clivadas pela caspase-1 pró-inflamatória, o parthanatos, gerada pelo acúmulo de poli-ADP-ribose polimerase (PARP) e a translocação nuclear do fator indutor de apoptose (AIF) das mitocôndrias, e a necroptose <sup>(8,12)</sup>.



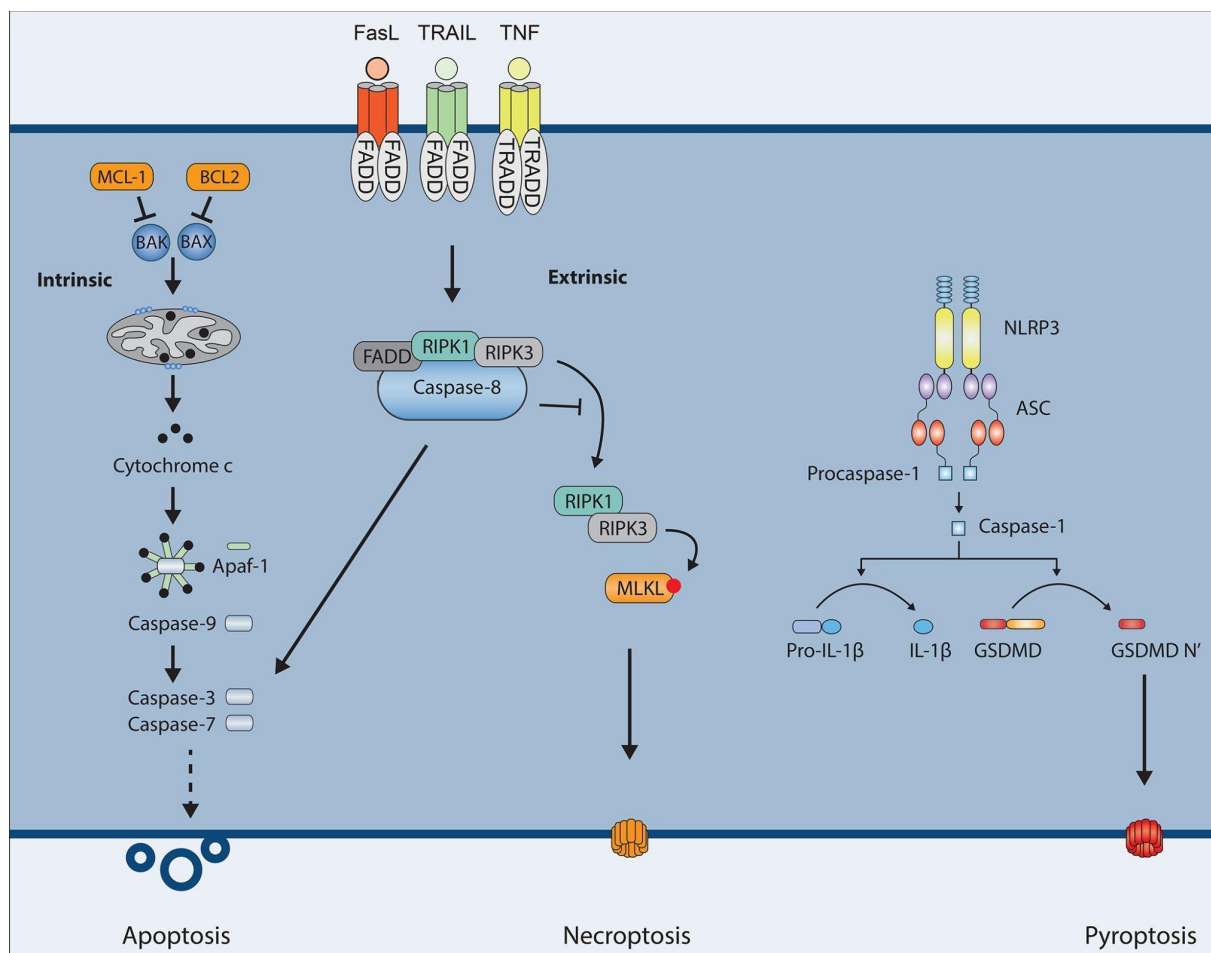


**Figura 2.** Representação esquematizada de respostas a diferentes formas de morte celular. As células em necrose perdem a integridade da membrana e vazam seus componentes intracelulares, sinalizando perigo e estimulando processos de inflamação. As células apoptóticas podem não estimular a inflamação se forem ingeridas pelos fagócitos antes de liberarem seu conteúdo intracelular, além de que podem estimular os fagócitos a produzir citocinas anti-inflamatórias. Porém, se não eliminadas rapidamente, as células apoptóticas liberam sinais de perigo quando prosseguem para a necrose secundária. Figura modificada do Rock (2008) <sup>(6)</sup>.

### 1.3. Necroptose

A necroptose, um tipo de morte celular programada, possui morfologia necrótica e pode ser ativada sob condições deficientes em apoptose, além de ocorrer em diversos processos biológicos, como na resposta imune, inflamação, desenvolvimento embrionário e nas anormalidades metabólicas. Necroptose é dependente de uma via de sinalização mediada pelas proteínas RIPK1 (do inglês “*Receptor- interacting Protein Kinase*”) e RIPK3, que formam um complexo capaz de

ativar a fosforilação e a oligomerização da pseudoquinase MLKL (do inglês "*Mixed Lineage Kinase Domain-Like*") e esses oligômeros formam poros da membrana, resultando na perda da integridade da membrana celular <sup>(8,12)</sup>. **(Figura 3)**

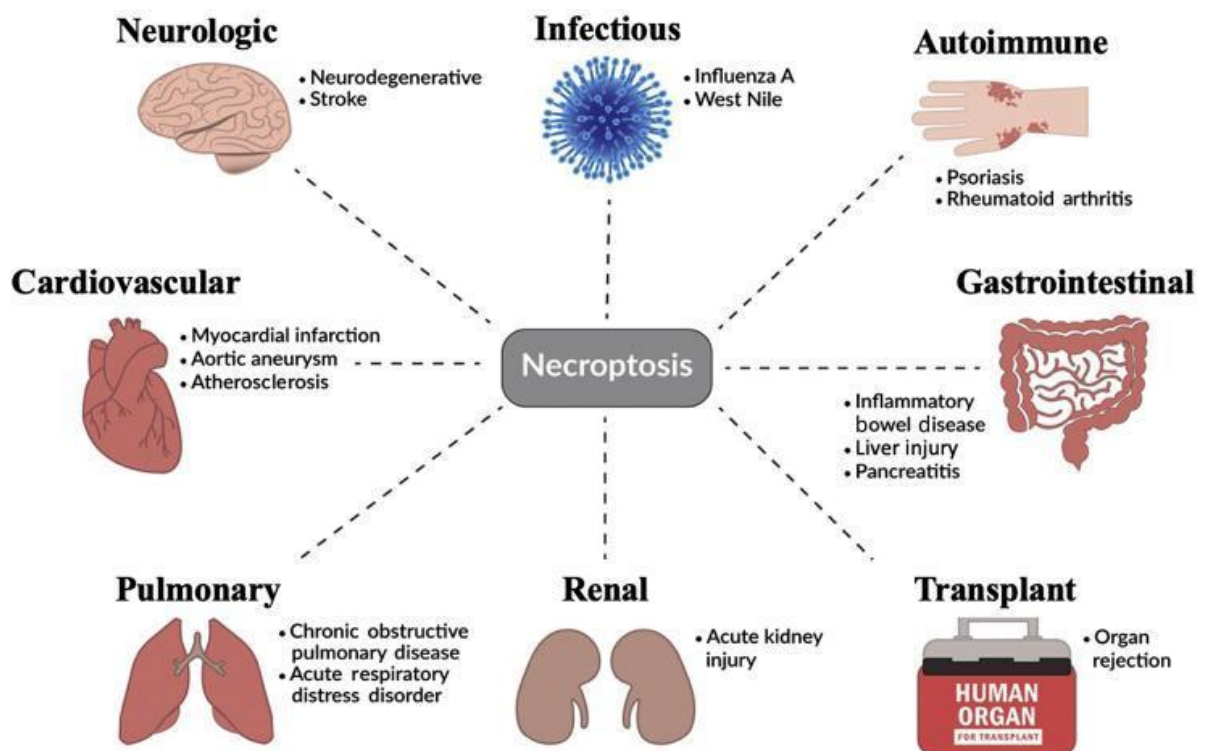


**Figura 3.** Esquematização dos diferentes tipos de morte celular programada. As vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas resultam na ativação de caspase-3 e 7, levando à morte celular. A caspase-8 também inibe a morte celular necroptótica induzida pela RIPK3 do inglês "*Receptor- interacting Protein Kinase*") e MLKL (do inglês "*Mixed Lineage Kinase Domain-Like*"). A ativação dos inflamassomas leva à piroptose induzida pela Gasdermin D (GSDMD). Figura do Orning (2021) <sup>(14)</sup>.

A necroptose compartilha semelhanças morfológicas com a necrose passiva, visto que as células que sofrem necroptose ficam hipertróficas e rompem a sua membrana, levando à liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês "*Damage-Associated Molecular Pattern*"). Vale ressaltar que a protease aspártica de cisteína 8, a caspase-8, atua na regulação da ativação da

morte celular programada mediada por receptor de morte, como TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa) na necroptose, e pode clivar RIPK1 e RIPK3 prevenindo a necroptose, além de ser criticamente importante para o desenvolvimento e imunidade de mamíferos <sup>(10,13,14)</sup>.

Com isso, estudos sobre as necrostatinas - moléculas inibitórias que bloquearam a morte celular necrótica induzida pelo TNF- $\alpha$  - revelaram um papel fundamental da proteína RIPK1 como um alvo farmacológico para inibir necroptose, o que torna a sua inibição uma opção para o tratamento de doenças crônicas. Vale considerar ainda que a necroptose descomedida pode gerar letalidade embrionária e diversos processos patológicos, como lesão cerebral isquêmica, distúrbios do sistema imunológico, lesões hepáticas, doenças cardiovasculares, neurodegeneração e doenças retinianas, como a retinose pigmentar **(Figura 4)** <sup>(8, 9, 11)</sup>.



**Figura 4.** Imagem esquematizada sobre a necroptose em diversas patologias. A necroptose desempenha um papel na patogênese de várias doenças por todo o corpo humano, relacionada a alterações no sistema neurológico, cardiovascular, pulmonar e

gastrointestinal. Além disso, desempenha um papel em doenças infecciosas e autoimunes, e como mediadora da rejeição de órgãos em aloenxertos cardíacos e renais. Figura modificada do Khoury (2019) <sup>(11)</sup>.

#### **1.4. Necroptose na retinose pigmentar**

Embora a morte de fotorreceptores por apoptose tenha sido relatada em modelos animais de degeneração da retina, estudos recentes apontam que a morte de fotorreceptores de cones na retinose pigmentar está sendo amplamente considerada como um mecanismo necroptótico. Além disso, observaram que a expressão de RIPK3 foi elevada em retinas de camundongos Rd10 (*retinal degeneration 10*) na fase de morte celular do cone, foi visto que essa com a inibição desta proteína quinase pode ser determinante na proteção de tais fotorreceptores. Pesquisas revelaram também que RIPK1/RIPK3 acelerou a degeneração de fotorreceptores de cone e bastonete em camundongos *Irpb*<sup>-/-</sup> (do inglês “*Interphotoreceptor retinoid-binding protein*”) <sup>(10,15,17)</sup>.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Portanto, com base em estudos atuais, a RIPK1/RIPK3 são possíveis alvos terapêuticos na prevenção e no retardo da degeneração dos fotorreceptores em pacientes com retinose pigmentar. Dessarte, é notória a necessidade de uma maior compreensão sobre a necroptose e os eventos moleculares que a regulam, dentre eles a interação das proteínas RIPK1/RIPK3 com a caspase-8 no bastonetes de modelos animais Rd1 (camundongos com mutação em Pde6B, C3H/HeJ), a fim de se elaborar uma estratégia terapêutica que possa direcionar ou inibir esse processo de morte celular, gerando assim um potencial tratamento para tal retinopatia <sup>(15, 16,17)</sup>

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivos gerais**

- Analisar a necroptose na retinose pigmentar, envolvendo a RIPK1, RIPK3 e caspase-8, utilizando camundongos C57Bl/6J e Rd1.

### 3.2. Objetivos específicos

- Coletar retinas de camundongos C57Bl/6J e C3H em idades P5, P7, P14, P21, P60, a fim de acompanhar a evolução da degeneração;
- Realizar imunofluorescência (IF) com os anticorpos de interesse para analisar suas marcações na retina;
- Utilizar o *Western blot* para acompanhar o desenvolvimento da degeneração e observar os picos dos marcadores RIPK1, RIPK3, caspase-3 clivada, e caspase-8 clivada;
- IF para colocalizar a marcação de fotorreceptor (rodopsina) com RIPK3 para observação de morte por necroptose em célula específica;
- Colocalização de microglia (Iba1) com RIPK3 para observação de morte celular em célula específica;
- Realização de TUNEL para avaliar e observar a localização da morte celular durante a progressão da distrofia retiniana, além de comparar o padrão de morte observado com o das proteínas da via RIPK e as caspases;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Os camundongos C57Bl/6J (C57) e Rd1 (camundongos com mutação em Pde6B, C3H/HeJ) serão mantidos em ciclo claro/ escuro com comida e bebida *ad libitum*, e todos os procedimentos serão realizados considerando guias da NIH (do inglês "*National Institute of Health*"), Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório, e aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC. A eutanásia dos animais será realizada por decapitação direta em neonatos, e nos demais animais será por injeção intraperitoneal de uretana. A retina será removida, tratada e utilizada nos métodos descritos no presente projeto.

### 4.2. Imunofluorescência

Para a coleta do tecido para imunofluorescência, o animal será sacrificado, e os olhos enucleados, e a retina isolada e fixada em paraformaldeído (PFA) 4% durante 4 horas. Após, o PFA será removido e o tecido criopreservado em

concentrações seriadas de sacarose (10-30%). Os olhos serão cortados em criostato (12 µm), e postos em lâminas gelatinizadas. Após secadas *overnight* a 37°C, as lâminas serão lavadas duas vezes de três minutos com PB 0,1M. Após, o tecido será incubado *overnigh* com o anticorpo primário (Tabela 1) diluído em PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e 5% de NDS. Após o período de incubação, o tecido será novamente lavado com PB 0,1M, e ocorrerá a incubação com o anticorpo secundário acoplado com fluorescência (Alexa 1:5000) e DAPI (1:60000) diluídos em 0,5% triton x-100 e PB 0,1M por 2 horas. Para dupla marcação, ambos os anticorpos, produzidos em animais diferentes, serão colocados na mesma solução de primário, e os respectivos anticorpos secundários também serão incubados juntos no segundo dia de experimento. As lâminas serão posteriormente fechadas para análise em microscópio.

#### **4.3. TUNEL**

Para avaliar a morte celular, e observar a localização das mesmas durante a progressão da distrofia retiniana, bem como comparar o padrão de morte observado com o das proteínas da via RIPK e as caspases, iremos utilizar o kit “*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*” (TUNEL) Para isso, será utilizado um kit de detecção de morte celular *in situ*, TMR Red (Roche, EUA) nas lâminas previamente coletadas a partir do tecido cortado em criostato. O tecido será lavado duas vezes de dois minutos com PBS 0,1M. Após secagem, será adicionado 50 µl da mistura da reação de TUNEL em cada lâmina, que será mantida no escuro por 60 minutos a 37 °C. Após, a lâmina será lavada, incubada com solução de DAPI (1:65000) por 5 minutos, novamente lavada e fechada. Para dupla marcação, a incubação com o anticorpo de interesse será realizada após o ensaio de TUNEL, e antes do fechamento da lâmina. As análises serão feitas em microscópio de fluorescência.

#### **4.4. Western blot**

O experimento de *Western blot* (WB) será realizado para acompanhar o desenvolvimento da degeneração, bem como observar os picos dos marcadores RIPK1, RIPK3, caspase-3 clivada, e caspase-8 clivada. Brevemente, o tecido será coletado em tampão de lise, e dissociado por meio de um sonificador. Após, o

isolamento das proteínas será realizado de acordo com o protocolo do fabricante, e as amostras quantificadas pelo método BCA. As proteínas serão separadas por eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas serão bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão TBST por 2 horas à temperatura ambiente, posteriormente lavadas em TBST e com anticorpo primário (**Tabela 1**) durante a noite a 4 °C em agitação. Em seguida, as membranas serão lavadas em TBST e incubadas com anti-peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente. A detecção de proteínas marcadas irá ser obtida usando o transluminador (kit ECL; Amersham), que serão capturadas via Uvitec D8514-50. Medições de densidades ópticas (OD) realizadas usando o software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA). O anticorpo anti-beta actina (Millipore; Cat n: # MAB1501) será usado como um normalizador.

**Tabela 1:** Anticorpos a serem usados nos experimentos.

Proteína	Fabricante	Catálogo
RIPK1	SC Biotechnology	SC133102
RIPK3	Cell Signaling	91702
Caspase-3	Cell Signaling	9664
Caspase-8	Cell Signaling	8592

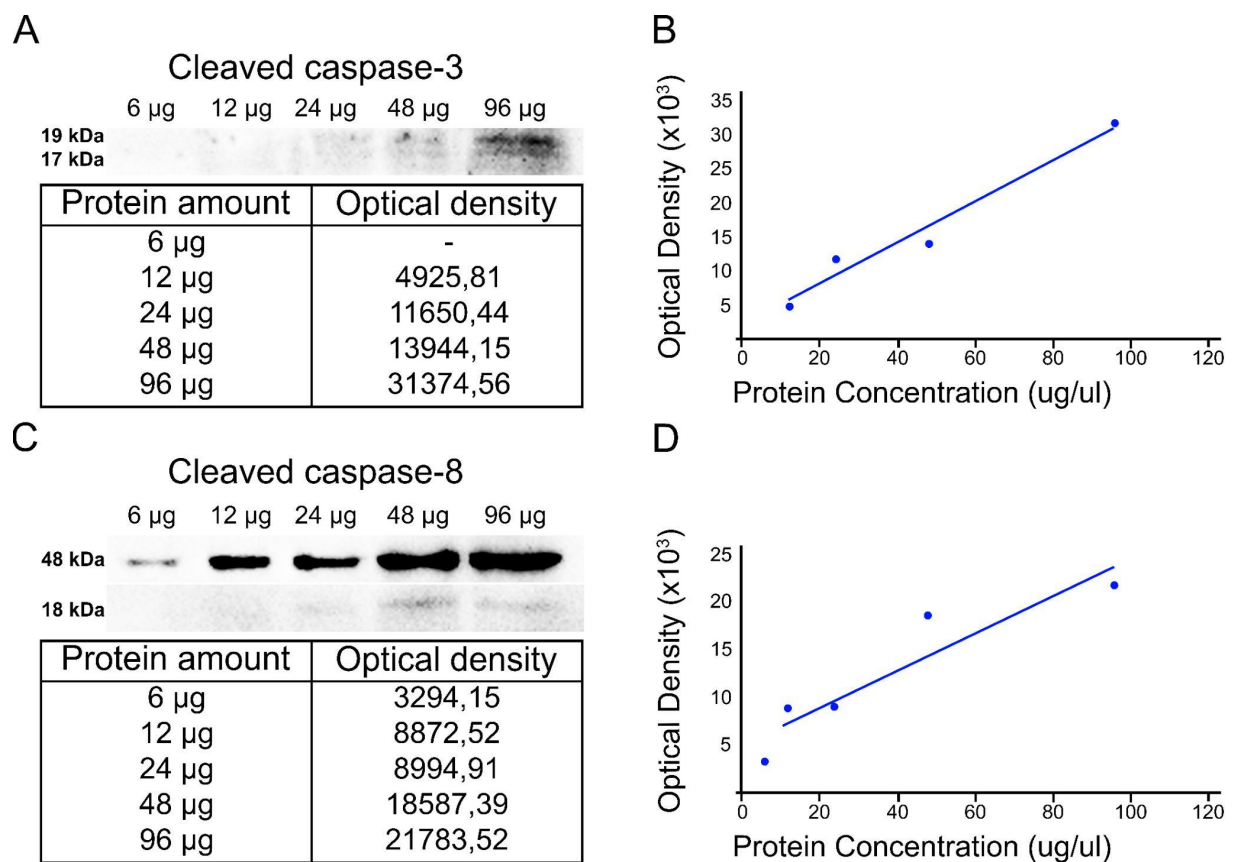
#### 4.5. Análise de dados

As imagens serão capturadas com microscópio fluorescente Nikon (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA), acoplada a uma câmera para captura de imagem (DFC 365 FX, Leica Microsystems, Alemanha). A análise de imagem será realizada com auxílio do software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA) usando múltiplos plugins. Para contagem de células, será usado o plugin Cell Counter. Os painéis das figuras serão montados usando o programa Adobe Photoshop CC 2014 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA), e

a manipulação da imagem será restrita apenas a ajustes de brilho e contraste. Análises estatísticas serão feitas com auxílio do software SPSS com p-valor fixo em 5% (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

## 5. RESULTADOS PRELIMINARES

Para os experimentos de WB foi realizada a padronização dos anticorpos a serem usados. Com isso, foram coletadas retinas de animais portadores da retinose pigmentar C3H/HeJ em idade 17 dias pós-natal (P'17), e as proteínas foram extraídas segundo descrito em metodologia, tópico 4.4. As proteínas foram quantificadas pelo método BCA e foram pipetadas concentrações seriadas de proteínas (6 µg, 12 µg, 24 µg, 48 µg e 96 µg) no gel de poli-acrilamida. A leitura da densidade óptica foi realizada pelo ImageJ. Nossos dados sugerem que, em experimentos futuros, a Caspase-8 clivada utilizada será em amostras carregadas a 12 µg de proteínas, enquanto pouco se consegue extrair com o experimento de Caspase-3 clivada, que deverá ser realizado novamente para otimização da marcação (**Figura 5**).

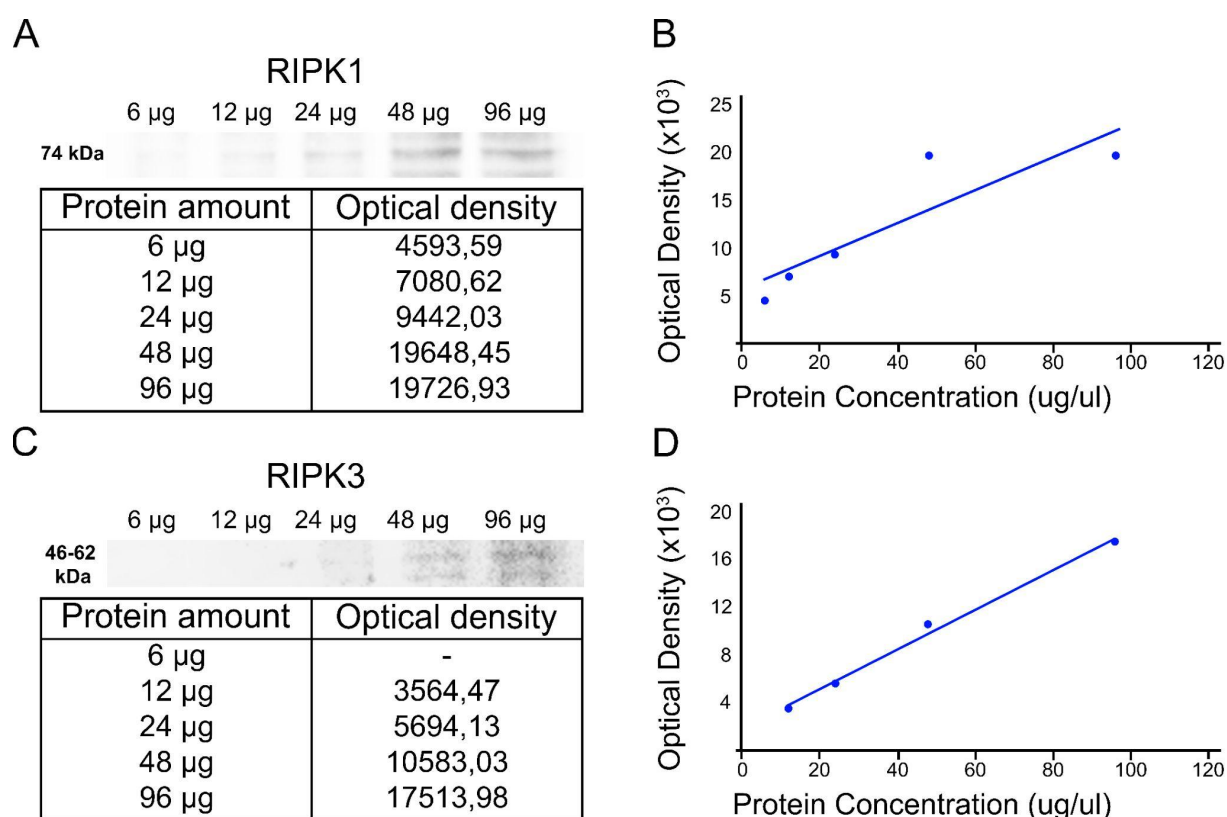


**Figura 5. Padronização dos anticorpos Cleaved caspase-3 e Cleaved caspase-8. (A)**



Imagem de Western blot (Wb) representativa de membrana detectada com quimioluminescência, para padronização do anticorpo, onde foram pipetados 6, 12, 24, 48 e 96  $\mu\text{g}$  da amostra, apresentando peso molecular de 19 e 17 kDa, e a tabela mostra o resultado da densidade óptica (OD) em cada concentração de amostra. (B) Curva padrão de valores em relação a OD e a concentração de proteína para a padronização da cleaved caspase-3. (C) Imagem de Wb para estimar a abundância total de proteína na padronização do anticorpo de cleaved caspase-8, onde foram pipetados 6, 12, 24, 48 e 96  $\mu\text{g}$  da amostra, apresentando peso molecular de 48 e 18 kDa, com uma tabela mostrando o resultado da OD em cada concentração de amostra. (D) Curva padrão de valores em relação a OD e a concentração de proteína para a padronização da cleaved caspase-8.

Além disso, o mesmo experimento foi realizado para padronizar os anticorpos de RIPK1 e RIPK3. Foi observado a presença de proteínas nas membranas, mas a marcação com anticorpos ainda precisa ser otimizado (**Figura 6**). Preliminarmente, a concentração de 48  $\mu\text{g}$  e 96  $\mu\text{g}$ , respectivamente para RIPK1 e RIPK3, parecem ser as melhores observadas.



**Figura 6. Padronização dos anticorpos RIPK1/3.** (A) Imagem de Western blot (Wb)

representativa de membrana detectada com quimioluminescência, para padronização do anticorpo RIPK1, onde foram pipetados 6, 12, 24, 48 e 96  $\mu$ g da amostra, apresentando peso molecular de 74 kDa, e a tabela mostra o resultado da densidade óptica (OD) em cada concentração de amostra. (B) Curva padrão de valores em relação a OD e a concentração de proteína para a padronização do RIPK1. (C) Imagem de Wb para estimar a abundância total de proteína na padronização do anticorpo de cleaved caspase-8, onde foram pipetados 6, 12, 24, 48 e 96  $\mu$ g da amostra, apresentando peso molecular de 46-62 kDa, com uma tabela mostrando o resultado da densidade óptica OD em cada concentração de amostra. (D) Curva padrão de valores em relação a OD e a concentração de proteína para a padronização do RIPK3.

## 6. DESCRIÇÃO DA VIABILIDADE DO PROJETO

O projeto aqui descrito será realizado em um laboratório especializado nos temas de retina e neurobiologia, que dispõe de uma sala de cirurgia e de biologia molecular equipadas, materiais e todos os equipamentos necessários para execução das atividades previstas. Vale considerar que já possuímos prática experimental em todas as áreas necessárias para o desenvolvimento da pesquisa e nas técnicas descritas na metodologia. Dessarte, estima-se que o projeto tenha, além de viabilidade, tempo hábil para a sua conclusão com resultados confiáveis e que ajudem a comunidade científica a se aproximar de tratamentos efetivos para paciente com retinose pigmentar.

## 7. CRONOGRAMA

Ago/Set/Out	(I) Leitura de protocolo e aprimoramento de técnicas; (II) Coleta de material para a imunofluorescência; (III) Realização de imunofluorescência com os anticorpos; (IV) Coleta de material para a Wb;
Nov/Dez/Jan	(I) Realização de Wb e observação de picos de morte com os marcadores RIPK1, RIPK3, caspase-3 clivada, e caspase-8 clivada; (II) Colocalização de Rodopsina e Iba1 com RIPK3 para observação de morte por necroptose;

Fev/Mar/Abril	(I) Realização de TUNEL, para observar e localizar a morte celular; (II) Comparação do padrão de morte observado com proteínas da via RIPK e as caspases; (III) Elaboração e entrega do relatório parcial;
Maio/Jun/Jul/Ago	(I) Análise de dados obtidos durante a pesquisa; (II) Elaboração e entrega do relatório final; (III) Elaboração de painel a ser apresentado no Simpósio de Iniciação Científica da UFABC.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Ptito M, Bleau M, Bouskila J. The Retina: A Window into the Brain. *Cells*. 2021 Nov 23;10(12):3269. doi: 10.3390/cells10123269. PMID: 34943777; PMCID: PMC8699497.
2. Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha A Jr, Woo SJ, Kwon YJ. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res*. 2018Mar;63:107-131. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.10.004. Epub 2017 Oct 31. Erratum in: *Prog Retin Eye Res*. 2018 Sep;66:220-221. PMID: 29097191.
3. Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet*. 2013 Aug;84(2):132-41. doi: 10.1111/cge.12203. Epub 2013 Jun 19. PMID: 23701314; PMCID: PMC3856531.
4. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Oct 11;1:40. doi: 10.1186/1750-1172-1-40. PMID: 17032466; PMCID: PMC1621055.
5. Zhou Y, Tian W, Jiang X, Yang H, Jiang Z, Li X, Jiang D, Sun K, Yang Y, Liu W, Zhu X. Deletion of *Asrgl1* Leads to Photoreceptor Degeneration in Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jan 18;9:783547. doi: 10.3389/fcell.2021.783547. PMID: 35118070; PMCID: PMC8805730.
6. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Path* 2008;3:99-126. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456. PMID: 18039143; PMCID: PMC3094097.

7. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
8. Degterev A, Ofengeim D, Yuan J. Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 14;116(20):9714- 9722. doi: 10.1073/pnas.1901179116. Epub 2019 May 2. PMID: 31048504; PMCID: PMC6525537.
9. Cao L, Mu W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacol Res.* 2021 Jan;163:105297. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105297. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33181319; PMCID: PMC7962892.
10. Orozco S, Oberst A. RIPK3 in cell death and inflammation: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Rev.* 2017 May;277(1):102-112. doi: 10.1111/imr.12536. PMID: 28462521; PMCID: PMC5419046.
11. Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol.* 2020 Feb;190(2):272-285. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.10.012. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31783008; PMCID: PMC6983729.
12. Newton F, Megaw R. Mechanisms of photoreceptor death in retinitis pigmentosa. *Genes (Basel).* September 24, 2020;11(10):1120. doi: 10.3390/genes11101120. PMID: 32987769; PMCID: PMC7598671.
13. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.* 2017 May;277(1):76-89. doi: 10.1111/imr.12541. PMID: 28462525; PMCID: PMC5417704.
14. Orning P, Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2021 Jan;109(1):121-141. doi: 10.1002/JLB.3MR0420-305R. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32531842; PMCID: PMC8664275.
15. Liu C, Li Y, Peng M, Laties AM, Wen R. Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J Neurosci.* 1999 Jun 15;19(12):4778-85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-12-04778.1999. PMID: 10366612; PMCID: PMC6782664.

16. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2019 Sep;44(3):771-786. doi: 10.3892/ijmm.2019.4244. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31198981; PMCID: PMC6658002.
17. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, Qi D, Lin C, Tong R, Wang Y. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2019 Sep;44(3):771-786. doi: 10.3892/ijmm.2019.4244. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31198981; PMCID: PMC6658002.