



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

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

Título do projeto: Estudo da relação da via Hippo com a dediferenciação e proliferação de células de Müller em ambientes citotóxicos

Palavras-chave do projeto: retinose pigmentar, YAP/TEAD, estresse oxidativo, ciclo celular

Área do conhecimento do projeto: Neurofisiologia, neurociência

Sumário

1 Resumo.....	2
2 Introdução e Justificativa	3
2.1 Retinose pigmentar.....	3
2.2 O papel das células de Müller neste cenário: da proteção à dediferenciação.....	5
2.3 Via Hippo	6
3 Justificativa	8
4 Objetivos	9
4.1 Objetivo geral.....	9
4.2 Objetivos específicos.....	9
5 Metodologia	9
5.1 Animais	9
5.2 Injeção subretiniana de Verteporfina	9
5.3 Cultura pura de células de Müller e tratamento com Verteporfina	10
5.4 Ensaio de proliferação BrdU	10
5.5 Imunofluorescência	11
5.6 Análise estatística e apresentação dos dados.....	11
6 Viabilidade	12
7 Cronograma de atividades.....	12
Referências	14

1 Resumo

A retinose pigmentar é uma doença degenerativa que atinge milhares de pessoas no mundo. Ainda sem cura ou tratamentos eficientes e que sejam acessíveis à população, o diagnóstico desse quadro leva a sentimento de desesperança no paciente. Durante o processo degenerativo, as principais células afetadas são os fotorreceptores do tipo bastonetes e cones, não havendo em mamíferos maneiras intrínsecas de substituir estas células perdidas. Entretanto, outras espécies, como peixes e anfíbios, apresentam uma cascata intracelular que caracterizam as glias radiais a terem uma capacidade de reprogramação celular, voltando à característica de progenitores neurais e, portanto, possibilidade de regenerar os subtipos perdidos. Entre as vias envolvidas neste processo, destaca-se a via Hippo, em especial as proteínas LATS e YAP. Portanto, o objetivo deste presente projeto é estudar a atuação desta via durante um modelo animal de retinose pigmentar autossômica recessiva (uso de camundongos C3H/HeJ), e observar se o

bloqueio da não-fosforilação da proteína YAP da via Hippo altera o padrão de proliferação e reprogramação celular das células de Müller em diferentes períodos pós-tratamento. Para isso, a proliferação das células de Müller será analisada pelo tratamento com o fármaco Verteporfina ou seu controle em culturas puras deste tipo celular frente ao estímulo de estresse oxidativo a fim de mimetizar um dos processos que ocorrem durante a progressão da retinose pigmentar. Ainda, estudos *in vivo* também estão sendo propostos através da injeção subretiniana do fármaco e observação de imunofluorescência dupla das células de Müller com marcadores de ciclo celular e proliferação 24 horas e sete dias depois da intervenção. Com isso, espera-se, ao final desta iniciação científica, observar as consequências da fosforilação do componente central da via Hippo em células de Müller, além de possíveis aplicações terapêuticas desta manipulação no tratamento da retinose pigmentar.

2 Introdução e Justificativa

2.1 Retinose pigmentar

Afetando mais de 41 milhões de pessoas em todo o mundo (GEORGIADIS; TSCHERNUTTER; BAINBRIDGE; ROBBIE *et al.*, 2010), a retinose pigmentar (RP) é uma das causas mais prevalentes de cegueira parcial ou total. Englobando diversas alterações gênicas diferentes, a RP é um grupo de doenças diferentes causas e possui assinaturas sindrômicas e não sindrômicas, englobando cerca de 60 genes diferentes e 240 mutações associadas (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017). Em ambos os casos, há semelhanças na progressão da doença, resultando em perda maciça de bastonetes e cones (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017; GREENWALD; CASHMAN; KUMAR-SINGH, 2013; ZHANG; WANG; WRIGHT; SURI *et al.*, 2006) que geralmente apresenta em humanos os primeiros sinais físicos entre 20 e 30 anos de idade (PARMEGGIANI; SATO; DE NADAI; ROMANO *et al.*, 2011). Os sintomas clínicos são geralmente classificados em estágios iniciais, intermediários e finais.

Na fase inicial, os pacientes relatam perda de acuidade visual noturna devido ao início da morte dos bastonetes (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017; YU; GRZYWACZ; LEE; FIELD, 2017). Entretanto, a visão de cores se mantém regular, o que poderia explicar a alta taxa de negligência da doença nos seus estágios iniciais (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017). O estágio intermediário é caracterizado pela perda progressiva da visão noturna e da visão periférica durante o dia (ALI; RAHMAN; CAO;

YUAN, 2017). Vale ressaltar que essa fase também é caracterizada pelo início da morte das células fotorreceptoras do tipo cone (YU; GRZYWACZ; LEE; FIELD, 2017). Por fim, na fase final, os pacientes apresentam perda total da visão periférica, dificuldade de leitura mesmo com óculos e quadros graves de fotofobia (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017), progredindo lentamente para uma condição de cegueira total (YU; GRZYWACZ; LEE; FIELD, 2017). Esses sintomas característicos relacionam-se a alterações fisiológicas, como ausência de ondas alfa e beta em exames de eletrorretinograma, alterações de fundo de retina (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017; KABIR; ULLAH; ALI; GOTTSCH *et al.*, 2016; PUNZO; KORNACKER; CEPKO, 2009; YU; GRZYWACZ; LEE; FIELD, 2017), retração dos dendritos das células bipolares, diminuição da espessura da camada nuclear externa (ONL), alterações do receptor de glutamato e migração celular (YU; GRZYWACZ; LEE; FIELD, 2017).

De acordo com a origem da mutação, a RP pode ser do tipo autossômica recessiva, autossômica dominante, e ligada ao cromossomo X. No tipo autossômico recessivo mais prevalente, a perda de bastonetes está relacionada à mutação da enzima fosfodiesterase (Pde). Essa enzima está localizada no segmento externo dos fotorreceptores bastonetes, e desempenha um papel crucial na cascata de fototransdução após a hidrólise de cGMP. O Pde tem três isoformas diferentes: Pde6A, -B, -G. Quando a mutação é observada em Pde6a ou Pde6b, a enzima se apresenta em níveis baixos, aumentando o influxo de cálcio, causando a morte inicial dos bastonetes por excitotoxicidade (ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017; FERRARI; DI IORIO; BARBARO; PONZIN *et al.*, 2011). Embora o conhecimento sobre sintomas de RP e achados patológicos sejam amplamente estudados (PUNZO; KORNACKER; CEPKO, 2009), os processos subjacentes à perda do cone posterior permanecem em debate (ADLER, 1996; AHERNE; KENNAN; KENNA; MCNALLY *et al.*, 2006; ALI; RAHMAN; CAO; YUAN, 2017; CAMPOCHIARO; MIR, 2018; FERRARI; DI IORIO; BARBARO; PONZIN *et al.*, 2011; HURLEY; CHAO, 2015; PUNZO; KORNACKER; CEPKO, 2009). A hipótese sustenta o papel de uma resposta inflamatória crônica e estresse oxidativo após o distúrbio do bastonete (HE; SUN; CHEN; XU, 2017; MURAKAMI; IKEDA; NAKATAKE; FUJIWARA *et al.*, 2017; XU; WANG; JIN; HU *et al.*, 2017), desencadeando alterações no estado normal das células gliais de Müller, o que leva a reações reativas gliose (XU; WANG; JIN; HU *et al.*, 2017). De fato, a gliose reativa das células de Müller foi proposta como estando diretamente relacionada à perda de células cone, influenciando a diminuição da nutrição

das células cone após a morte dos bastonetes (XU; WANG; JIN; HU *et al.*, 2017). A gliose reativa também foi relacionada à hiperexcitabilidade neuronal e toxicidade glutamatérgica (HE; SUN; CHEN; XU, 2017; ROESCH; STADLER; CEPKO, 2012). Ainda mais, em processos degenerativos, em algumas espécies esse tipo de glia radial retiniana possui a capacidade de se dediferenciar e substituir o tipo celular perdido, habilidade perdida, durante a evolução, em mamíferos.

2.2 O papel das células de Müller neste cenário: da proteção à dediferenciação

As células de Müller são as células gliais mais abundantes da retina, desempenhando papéis centrais na homeostase do tecido, suporte neuronal, defesa imune e, em algumas espécies, capacidade regenerativa [18]. Diversos estudos relatam que, durante o processo degenerativo da RP em mamíferos, as células de Müller tendem a passar por um processo de gliose reativa (MARTIN; POCHE, 2019), podendo levar à liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias que podem auxiliar no processo de degeneração, em especial da morte secundária de cones. Essa morte secundária de cones leva a uma maior ativação pró-inflamatória deste tipo glial, levando, portanto, a uma cascata autoalimentada de probabilidade de morte celular nesta patologia (BEACH; WANG; OTTESON, 2017; MARTIN; POCHE, 2019). Embora pouco se saiba da ordem de ativação das células, a literatura traz vias de co-ativação de células de Müller e microglia nesta doença (WANG; MA; ZHAO; FARISS *et al.*, 2011). Pela própria característica no sistema imune, tratamentos que visem este tipo celular podem ser interessantes para minimizar as consequências em distrofias retinianas pensando em terapias para pacientes que já tenham ou venham a desenvolver o quadro de RP. Entretanto, esta célula também pode ser um alvo especialmente interessante devido a uma característica perdida nos mamíferos mas presente em outras espécies, como peixes e anfíbios: a capacidade de dediferenciação em células progenitoras e rediferenciação no tipo celular perdido (BERNARDOS; BARTHEL; MEYERS; RAYMOND, 2007; FISCHER; REH, 2001).

Ao notar o estímulo de morte celular e perda de fotorreceptores, as células de Müller nessas espécies podem retornar ao estágio de progenitoras neurais por ativação de diversas cascatas específicas, e se re-diferenciar no tipo celular danificado (BERNARDOS; BARTHEL; MEYERS; RAYMOND, 2007; FISCHER; REH, 2001). Esta restauração de fotorreceptores já foi demonstrada em diversos estágios da distrofia retiniana, e as células novas formadas neste processo possuem suas habilidades funcionais

preservadas (como a capacidade de fototransdução). Entretanto, embora altamente discutido, o motivo pelo qual os mamíferos perderam essa habilidade durante o processo evolucionário não é totalmente conhecido (BEACH; WANG; OTTESON, 2017; CHUA; NIVISON-SMITH; FLETCHER; TRENHOLM *et al.*, 2013; CONEDERA; ENZMANN, 2023), e trazer novamente essa assinatura das células de Müller para pacientes e modelos animais com este tipo de distrofia retiniana pode representar uma possibilidade de cura ou tratamento para a perda visual. Entre as vias envolvidas neste processo, destaca-se a via Hippo.

2.3 Via Hippo

Além da alteração genética ser a principal causa de morte de bastonetes (ADLER, 1996), a RP também é caracterizada por alterações fisiológicas e moleculares que podem desencadear ou suportar a morte celular secundária em fotorreceptores cone. Uma dessas alterações envolve a via de sinalização Hippo. Essa via atua através de uma cascata intracelular de proteínas quinase (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017) que fosforilam cofatores de transcrição como a proteína de associação YAP e coativador transcricional de ligação a PDZ (TAZ) (CSIBI; BLENIS, 2012) na região amino-terminal do resíduo de serina específico (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017). Esses cofatores são conhecidos como efetores de regulação negativa na via Hippo. YAP/TAZ são codependentes, e ambas as proteínas possuem características diferentes relacionadas à sensibilidade ao estresse oxidativo (CSIBI; BLENIS, 2012). Quando a via Hippo está ativa (*on*), a proteína YAP é fosforilada pela serina 127 através da quinase serina denominada LATS1 que irá reter essa proteína no citoplasma, atuando em algumas atividades celulares como transdução de sinal, expressão gênica, ativação enzimática e divisão celular. No estado *off*, o complexo proteico formado por YAP e TAZ perde sua fosforilação (KIM; FINLAY; BAGULEY, 2013), transloca-se para o núcleo e interage com uma família de fatores transcricionais do domínio TEA (TEAD), regulando genes envolvidos na proliferação celular e diferenciação (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017).

A via Hippo parece desempenhar diferentes papéis durante o desenvolvimento e durante o percurso de patologias (CSIBI; BLENIS, 2012), sendo bem conservada ao longo da evolução filogenética (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017).

Especificamente durante o desenvolvimento da retina, sabe-se que o complexo YAP/TEAD atua nas células progenitoras (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017), enquanto na retina adulta essa via atua na regeneração do tecido danificado através das células gliais de Müller, regulação da homeostase e metabolismo do glutamato (HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017). De fato, estudos anteriores mostraram que a via Hippo está alterada na doença RP, sugerindo que sua regulação está envolvida na manutenção fisiológica e patológica de bastonetes e cones. Corroborando essa hipótese, vários estudos têm demonstrado que os alvos direto e indireto da via Hippo são alterados na RP. Por exemplo, especula-se que a via mTOR realiza *crosstalk* com a Hippo mediada por miR-29 (JOMARY; CULLEN; JONES, 2006; PUNZO; KORNACKER; CEPKO, 2009). Curiosamente, estudos mostraram que o estímulo de insulina/mTOR na RP autossômica recessiva resulta na morte tardia do fotorreceptor cone (PUNZO; KORNACKER; CEPKO, 2009). Além disso, achados recentes corroboram essa relação, indicando que a via mTOR estaria diminuída ou inibida nesta doença (MA; VENKATESH; LANGELLOTTO; LE *et al.*, 2015). Ainda, foi demonstrado que a via de secreção do fator de sinalização extracelular Wnt está aumentada em RP, hipotetizando uma correlação com a apoptose de fotorreceptores (LAD; CHESHER; KALANI, 2009; YI; NAKAMURA; MOHAMED; DUFORT *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado *crosstalk* das vias Wnt e Hippo através da proteína FOXM1 (EISINGER-MATHASON; MUCAJ; BIJU; NAKAZAWA *et al.*, 2015), possivelmente um dos alvos alterados da via Hippo na doença RP.

Ainda, a via Hippo parece estar envolvida no processo de proliferação e retorno à capacidade progenitora das células de Müller em processos regenerativos (RUEDA; HALL; HILL; SWINTON *et al.*, 2019), em especial das proteínas LAST1/2 e YAP. Portanto, alterar essas células da cascata Hippo pode aumentar a capacidade proliferativa e de dediferenciação destas células frente ao estresse da distrofia. Neste contexto, um fármaco já aprovado pela FDA para o tratamento quimioterápico pode ter um mecanismo de ação interessante neste processo. A Verteporfina (VP) é um monoácido derivado da benzoporfina (SCOTT; GOA, 2000) e atualmente utilizado em terapias fotodinâmicas com alta eficiência.

A VP mostra resultados eficazes para o tratamento da doença macular relacionada a idade (AMD), tanto em ensaios pré-clínicos quanto clínicos, mesmo sem ativação da luz (BRODOWSKA; AL-MOUJAHED; MARMALIDOU; MEYER ZU HORSTE *et al.*,

2014), causando menos efeitos colaterais fototóxicos nos pacientes (GIBAULT; BAILLY; CORVAISIER; COEVOET *et al.*, 2017). Embora a VP esteja relacionada com a oligomerização de p62 e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, portanto, na autofagia (GIBAULT; CORVAISIER; BAILLY; HUET *et al.*, 2016), a ação da VP pode estar relacionada com inibição de YAP/TEAD (AL-MOUJAHED; BRODOWSKA; STRYJEWSKI; EFSTATHIOU *et al.*, 2017), impedindo a transcrição dependente desse complexo (GIBAULT; CORVAISIER; BAILLY; HUET *et al.*, 2016). Sem a ativação da luz, o VP demonstrou alterar os níveis de proteína das moléculas de sinalização a jusante do Hippo (AL-MOUJAHED; BRODOWSKA; STRYJEWSKI; EFSTATHIOU *et al.*, 2017; HAMON; MASSON; BITARD; GIESER *et al.*, 2017). Curiosamente, estudos mostraram que VP não altera as vias Akt e mTOR que são reguladas negativamente na RP, tornando VP um candidato a controlar a via YAP/TEAD (AL-MOUJAHED; BRODOWSKA; STRYJEWSKI; EFSTATHIOU *et al.*, 2017).

3 Justificativa

A RP é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das causas mais prevalentes de cegueira. Embora vários estudos tenham como objetivo o tratamento da RP, até o momento não há tratamento eficaz, levando a uma sensação de desamparo junto com seu diagnóstico. As terapias genéticas têm demonstrado um atraso ou prevenção bem-sucedidos da morte dos bastonetes. Entretanto, mesmo com auxílio da terapia genética, nem todos os bastonetes podem ser transfectados, levando a uma morte secundária de células cone.

Nesse contexto, a utilização de fármacos que atuam em vias desreguladas durante esse processo degenerativo, como a via Hippo podem ser interessantes para o tratamento e até mesmo a cura dessa patologia. Essa via, além de estar relacionada com a morte de cones pela relação de YAP/TEAD com a gliose reativa, também já foi descrita como importante para o processo de regeneração de fotorreceptores através da reprogramação de células de Müller em espécies como anfíbios e peixes. Portanto, esse trabalho visa investigar se a alteração da via Hippo pelo fármaco Verteporfina, um fármaco de ação de bloqueio da não-fosforilação da proteína YAP, em marcadores de diferenciação e proliferação retinianas durante o processo da Retinose Pigmentar.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Observar a possível relação entre o controle da via Hippo com as características de proliferação e reprogramação das células de Müller retinianas em situações patológicas degenerativas, como a retinose pigmentar.

4.2 Objetivos específicos

1. Padronizar os marcadores de imunofluorescência de ciclo celular (Ciclina B1 e D1) e proliferação (PCNA), bem como o ensaio de BrdU, em tecidos retinianos;
2. Analisar aspectos de proliferação *in vivo* e *in vitro* após o tratamento com o fármaco Verteporfina (VP);
3. Realizar imunofluorescências duplas de marcadores de células de Müller (Glutamina Sintetase ou Vimentina) com marcadores de ciclo celular/diferenciação (Ciclina B1, Ciclina D1, PCNA e Nestina) após tratamento de VP em animais com retinose pigmentar.

5 Metodologia

5.1 Animais

Camundongos de linhagens homozigotas C3H/HeJ (machos e fêmeas) (rd/rd, Universidade de São Paulo, SP) serão utilizados para os experimentos deste projeto. Camundongos C57/Bl6 (Universidade Federal do ABC, SBC) serão utilizados como grupo controle. Os animais serão mantidos em um ciclo 12h claro/escuro com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos serão feitos de acordo com as normas do NIH e do Comitê de Ética em Uso de Animais da UFABC. Todos os procedimentos cirúrgicos serão realizados sob anestesia inalatória, e todos os esforços serão feitos a fim de minimizar o sofrimento do animal. Para a eutanásia, os animais receberão sobredose de uretana (25%) e posterior decapitação. As retinas serão removidas para diferentes metodologias.

5.2 Injeção subretiniana de Verteporfina

Os camundongos C3H/HeJ e C57/Bl6 no nono dia pós-natal (P9) e décimo quarto (P14) dia pós-natal serão submetidos à injeção subretiniana de 1 uL de Verteporfina (Vidusyne,

SML0534 – Sigma, 1uM), ou seu veículo (PBS + DMSO). Todos os procedimentos serão feitos por anestesia inalatória isoflorano. Para isso, capilares de vidro aquecidas em equipamentos apropriados (Puller-Narishige) serão utilizados para produzir agulhas bem finas, que serão acopladas à agulha Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV). As pálpebras serão cortadas e separadas com pinças curvas para facilitar a manipulação do olho. Os animais serão sacrificados após 24h e 7 dias para imunofluorescência e análise de BrdU.

5.3 Cultura pura de células de Müller e tratamento com Verteporfina

Para o estabelecimento da cultura pura de células de Müller, serão utilizados camundongos neonatos de 0 a 4 dias (P0 a P4), que serão sacrificados por decapitação direta. Os olhos serão enucleados, e deixados em solução etanol 70% por 10 segundos a fim de diminuir as chances de contaminação. As retinas serão isoladas em solução fisiológica, e levadas ao fluxo laminar previamente limpo e esterilizado com luz UV por 15 min. As retinas sofrerão digestão química (tripsina 2,5%) e mecânica (homogeneização por micropipeta), e posteriormente centrifugadas por 10 min a 720 rpm. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* será ressuscitado e as células postas em uma barca T-75 onde serão mantidas, e uma co-cultura de células de Müller e microglia será formada. O meio será trocado a cada 7 dias, e após 14 dias de incubação as células de Müller serão isoladas por agitação a 37 °C por 1 h, o sobrenadante descartado (composto pelas células micróglias), e as células de Müller desprendidas da T-75 por tripsina/EDTA por 15 min dentro da incubadora. As células serão então plaqueadas em placas de 24 poços previamente tratadas com Poli-D-Lisina, e após 48 h as células serão tratadas com Verteporfina 100 nM ou seu controle. Após 24 h de incubação, as células serão fixadas com paraformaldeído 4%, e realizado o processo de pré-bloqueio (albumina 1% diluída em PBS) e incubação de primário (Vimentina 1:500 + NDS 5% + 0,3% Triton X-100) e secundário (Alexa 1:2500 + 0,3% Triton X-100 + DAPI) de forma similar ao descrito em 4.5. Para as células tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a metodologia será similar ao descrito em (DE SOUSA; MOVIO; DE LIMA-VASCONCELLOS; DOS SANTOS *et al.*, 2022).

5.4 Ensaio de proliferação BrdU

BrdU (Life Technologies, B3512B) diluído em 0,007N NaOH será injetado intraperitonealmente (60 mg/kg) usando uma agulha estéril (30,5 G) e uma seringa de 1

mL. Após a injeção de BrdU, a injeção subretiniana será realizada com o fármaco VP conforme descrito anteriormente. Após 24 h e 7 dias, as retinas serão dissecadas. Para a marcação anti-BrdU, os olhos serão fixados em uma solução de sacarose 4% com paraformaldeído (PFA) 4% (1:1) durante 1 h, seguindo do protocolo de imunofluorescência normal, com adição de um passo de pré-tratamento com 1N de HCl por 30 min a 37° C.

5.5 Imunofluorescência

Os olhos enucleados (estimamos um 'n' mínimo de 7) serão fixados em PFA 4% diluído em tampão fosfato (PB) 0,1M pH 7,4, e crioprotetidos em diluições seriadas de sacarose (10% - 30%) a 4 °C. Após congelamento em OCT, o material será cortado no eixo córnea-nervo óptico (12 um) em um criostato. Após obtenção das lâminas, as mesmas serão armazenadas a 37 °C por 12 h, e incubadas *overnight* com o anticorpo primário diluído em PB 0,1M, 5% de soro normal de burro (NDS), e 0,5% de Triton X-100 a temperatura ambiente. Após lavagens com PB 0,1M, as lâminas serão incubadas com o anticorpo secundário acoplado ao componente fluorescente (Alexa 1:500) e marcador nuclear DAPI (1:60000) diluídos em 0,5% Triton X-100 e PB 0,1M por duas horas em temperatura ambiente. Para esse estudo, serão utilizados os seguintes marcadores: PCNA (Millipore, MAB4078, conc. estimada: 1:200), Nestina (Abcam, AB221660, conc. estimada 1:100), Glutamina Sintetase (Abcam, ab64613, conc. estimada 1:100), Ciclina B1 (Santa Cruz, GNS1, conc. estimada 1:100) Ciclina D1 (Santa Cruz, SC20044, conc. estimada 1:100), BrdU (Invitrogen, B35128, conc. estimada 1:100) e Vimentina (Abcam, AB1620, conc. estimada 1:50). As secções retinianas serão analisadas através de um microscópio de fluorescência (DM 5500, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera para imageamento (DFC 365 FX, Leica Microsystems, Alemanha).

5.6 Análise estatística e apresentação dos dados

Todas as fotos derivadas de análises de imunofluorescência serão avaliadas em sua totalidade (centro e periferia). O 'n' estimado para cada experimento será baseado na seguinte fórmula: $N = [4 \cdot 2(z_{crit} + z_{pwr})^2] / D^2$, onde N é o número de amostras, ? o desvio padrão assumido para cada grupo (assumimos 20%), z_{crit} é correspondente ao critério de significância (igual a 0,05, que é 1,960), z_{pwr} é o valor correspondente ao poder estatístico (igual a 0,9, portanto 1,282), e D é a diferença mínima esperada entre duas médias (que assumimos 50%). De acordo com esses parâmetros, o número de

amostras deverá ser 6,72, ou 7 amostras por grupo. Cada 'n' descrito será composto por 3 a 4 secções por retina (espessura de 12µm). Após quantificação, a mediana de cada animal será determinada para realizar a análise estatística.

Todas as micrografias serão capturadas com microscópio de fluorescência acima citado. A análise das imagens será feita utilizando o *software* ImageJ (*National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*), utilizando múltiplos *plug-ins*. Os painéis serão montados utilizando o Adobe Photoshop CC 2014 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), e a manipulação das imagens será restrita à ajustes de brilho e contraste. Testes estatísticos serão realizados com o *software* SPSS com p-valor fixado em 5%, e o teste de post-hoc definido com base nas características da amostra. Todos os dados serão dados de acordo com a média da diferença e erro padrão da média. Análises qualitativas, como descrições morfológicas, serão feitas de forma cega sempre que possível.

6 Viabilidade

Este projeto foi desenhado pensando na viabilidade de execução de todos os objetivos propostos. O projeto é vinculado a uma ideia de intervenção para a retinose pigmentar, e complementa um projeto de pós-graduação atualmente em desenvolvimento no grupo de pesquisa que a discente faz parte e, portanto, haverá apoio de alunos experientes para o desenvolvimento da pesquisa. Ainda, todas as técnicas supracitadas (exceto a concentração e protocolo particulares de cada anticorpo que serão padronizados pela discente) já se encontram padronizados no laboratório, e com pessoas experientes tanto nos métodos *in vivo* como *in vitro* propostos. Ainda, por complementar um projeto já em andamento, o fármaco já foi adquirido e as concentrações (tanto entregue via subretiniana como em cultura de células) já foram padronizadas. O protocolo de ética em uso de animais (CEUA – UFABC) já está aprovado. O laboratório contém infraestrutura e espaço disponíveis para o desenvolvimento do projeto, e pretende-se realizar reuniões quinzenais para a discussão dos resultados e da literatura levantada.

7 Cronograma de atividades

1. Padronização dos experimentos a serem realizados

- a. Etapa 1.a.: padronização dos marcadores de imunofluorescência Ciclina B1, Ciclina D1, Nestina e PCNA
 - b. Etapa 1.b.: padronização da entrega de BrdU *in vivo* (concentração e tempo de administração), bem como a marcação por imunofluorescência do anticorpo anti-BrdU
2. Observação da capacidade proliferativa das células de Müller em cultura pura com e sem o estímulo de estresse oxidativo
 - a. Etapa 2.a.: Comparação de padrão proliferativo destas células com e sem o estímulo de H₂O₂ (50uM)
 - b. Etapa 2.b.: Comparação das células tratadas com H₂O₂ conjugado ao tratamento de Verteporfina
3. Análise de marcadores de diferenciação e proliferação em animais com retinose pigmentar tratados com o fármaco ou seu controle
 - a. Etapa 3.a.: Injeção da droga Verteporfina em animais com a distrofia retiniana
 - b. Etapa 3.b.: Coleta do material e pré-processamento do tecido
 - c. Etapa 3.c.: Imunofluorescência dupla com os marcadores de diferenciação e proliferação
4. Análise de processos proliferativos com o marcador BrdU
 - a. Etapa 4.a.: injeção intraperitoneal de BrdU com posterior tratamento com Verteporfina (ou seu veículo)
 - b. Realização dos experimentos
5. Análise dos dados de imunofluorescência e procedimento estatístico
6. Escrita de relatórios e formação do pôster para apresentação no Simpósio de Iniciação Científica

Tabela 1 – Cronograma de atividades previstas para o referente projeto

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X	X	X									
1.b.		X	X	X								
2.a.	X	X	X									
2.b.			X	X								
3.a.		X				X			X			
3.b.		X	X			X	X		X	X		

3.c.			X	X			X	X		X	X	
4.a/b.					X	X	X			X		
5.				X	X		X	X			X	X
6.					X	X					X	X

Referências

ADLER, R. Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of the 21st century? **Arch Ophthalmol**, 114, n. 1, p. 79-83, Jan 1996.

AHERNE, A.; KENNAN, A.; KENNA, P. F.; MCNALLY, N. *et al.* Molecular mechanisms of photoreceptor degeneration in RP caused by IMPDH1 mutations. **Adv Exp Med Biol**, 572, p. 81-87, 2006.

AL-MOUJAHED, A.; BRODOWSKA, K.; STRYJEWSKI, T. P.; EFSTATHIOU, N. E. *et al.* Verteporfin inhibits growth of human glioma in vitro without light activation. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 7602, Aug 8 2017.

ALI, M. U.; RAHMAN, M. S. U.; CAO, J.; YUAN, P. X. Genetic characterization and disease mechanism of retinitis pigmentosa; current scenario. **3 Biotech**, 7, n. 4, p. 251, Aug 2017.

BEACH, K. M.; WANG, J.; OTTESON, D. C. Regulation of Stem Cell Properties of Muller Glia by JAK/STAT and MAPK Signaling in the Mammalian Retina. **Stem Cells Int**, 2017, p. 1610691, 2017.

BERNARDOS, R. L.; BARTHEL, L. K.; MEYERS, J. R.; RAYMOND, P. A. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. **J Neurosci**, 27, n. 26, p. 7028-7040, Jun 27 2007.

BRODOWSKA, K.; AL-MOUJAHED, A.; MARMALIDOU, A.; MEYER ZU HORSTE, M. *et al.* The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. **Exp Eye Res**, 124, p. 67-73, Jul 2014.

CAMPOCHIARO, P. A.; MIR, T. A. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. **Prog Retin Eye Res**, 62, p. 24-37, Jan 2018.

CHUA, J.; NIVISON-SMITH, L.; FLETCHER, E. L.; TRENHOLM, S. *et al.* Early remodeling of Muller cells in the rd/rd mouse model of retinal dystrophy. **J Comp Neurol**, 521, n. 11, p. 2439-2453, Aug 1 2013.

CONEDERA, F. M.; ENZMANN, V. Regenerative capacity of Müller cells and their modulation as a tool to treat retinal degenerations. **Neural Regeneration Research**, 18, n. 1, p. 139-140, 2023.

CSIBI, A.; BLENIS, J. Hippo-YAP and mTOR pathways collaborate to regulate organ size. **Nat Cell Biol**, 14, n. 12, p. 1244-1245, Dec 2012.

DE SOUSA, E.; MOVIO, M. I.; DE LIMA-VASCONCELLOS, T. H.; DOS SANTOS, G. B. *et al.* VDAC1 regulates neuronal cell loss after retinal trauma injury by a mitochondria-independent pathway. **Cell Death Dis**, 13, n. 4, p. 393, Apr 21 2022.

EISINGER-MATHASON, T. S.; MUCAJ, V.; BIJU, K. M.; NAKAZAWA, M. S. *et al.* Deregulation of the Hippo pathway in soft-tissue sarcoma promotes FOXM1 expression and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, n. 26, p. E3402-3411, Jun 30 2015.

FERRARI, S.; DI IORIO, E.; BARBARO, V.; PONZIN, D. *et al.* Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. **Curr Genomics**, 12, n. 4, p. 238-249, Jun 2011.

FISCHER, A. J.; REH, T. A. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. **Nat Neurosci**, 4, n. 3, p. 247-252, Mar 2001.

GEORGIADIS, A.; TSCHERNUTTER, M.; BAINBRIDGE, J. W.; ROBBIE, S. J. *et al.* AAV-mediated knockdown of peripherin-2 in vivo using miRNA-based hairpins. **Gene Ther**, 17, n. 4, p. 486-493, Apr 2010.

GIBAULT, F.; BAILLY, F.; CORVAISIER, M.; COEVOET, M. *et al.* Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. **ChemMedChem**, 12, n. 12, p. 954-961, Jun 21 2017.

GIBAULT, F.; CORVAISIER, M.; BAILLY, F.; HUET, G. *et al.* Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. **Curr Med Chem**, 23, n. 11, p. 1171-1184, 2016.

GREENWALD, D. L.; CASHMAN, S. M.; KUMAR-SINGH, R. Mutation-independent rescue of a novel mouse model of Retinitis Pigmentosa. **Gene Ther**, 20, n. 4, p. 425-434, Apr 2013.

HAMON, A.; MASSON, C.; BITARD, J.; GIESER, L. *et al.* Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Muller Cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 58, n. 4, p. 1941-1953, Apr 01 2017.

HE, X.; SUN, D.; CHEN, S.; XU, H. Activation of liver X receptor delayed the retinal degeneration of rd1 mice through modulation of the immunological function of glia. **Oncotarget**, 8, n. 19, p. 32068-32082, May 09 2017.

HURLEY, J. B.; CHAO, J. R. It's never too late to save a photoreceptor. **J Clin Invest**, 125, n. 9, p. 3424-3426, Sep 2015.

JOMARY, C.; CULLEN, J.; JONES, S. E. Inactivation of the Akt survival pathway during photoreceptor apoptosis in the retinal degeneration mouse. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 47, n. 4, p. 1620-1629, Apr 2006.

KABIR, F.; ULLAH, I.; ALI, S.; GOTTSCH, A. D. *et al.* Loss of function mutations in RP1 are responsible for retinitis pigmentosa in consanguineous familial cases. **Mol Vis**, 22, p. 610-625, 2016.

KIM, J. E.; FINLAY, G. J.; BAGULEY, B. C. The role of the hippo pathway in melanocytes and melanoma. **Front Oncol**, 3, p. 123, 2013.

LAD, E. M.; CHESHER, S. H.; KALANI, M. Y. Wnt-signaling in retinal development and disease. **Stem Cells Dev**, 18, n. 1, p. 7-16, Jan-Feb 2009.

MA, S.; VENKATESH, A.; LANGELLOTTO, F.; LE, Y. Z. *et al.* Loss of mTOR signaling affects cone function, cone structure and expression of cone specific proteins without affecting cone survival. **Exp Eye Res**, 135, p. 1-13, Jun 2015.

MARTIN, J. F.; POCHE, R. A. Awakening the regenerative potential of the mammalian retina. **Development**, 146, n. 23, Dec 2 2019.

MURAKAMI, Y.; IKEDA, Y.; NAKATAKE, S.; FUJIWARA, K. *et al.* C-Reactive protein and progression of vision loss in retinitis pigmentosa. **Acta Ophthalmol**, Jun 21 2017.

PARMEGGIANI, F.; SATO, G.; DE NADAI, K.; ROMANO, M. R. *et al.* Clinical and Rehabilitative Management of Retinitis Pigmentosa: Up-to-Date. **Curr Genomics**, 12, n. 4, p. 250-259, Jun 2011.

PUNZO, C.; KORNACKER, K.; CEPKO, C. L. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. **Nat Neurosci**, 12, n. 1, p. 44-52, Jan 2009.

ROESCH, K.; STADLER, M. B.; CEPKO, C. L. Gene expression changes within Muller glial cells in retinitis pigmentosa. **Mol Vis**, 18, p. 1197-1214, 2012.

RUEDA, E. M.; HALL, B. M.; HILL, M. C.; SWINTON, P. G. *et al.* The Hippo Pathway Blocks Mammalian Retinal Muller Glial Cell Reprogramming. **Cell Rep**, 27, n. 6, p. 1637-1649 e1636, May 7 2019.

SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Verteporfin. **Drugs Aging**, 16, n. 2, p. 139-146; discussion 147-138, Feb 2000.

WANG, M.; MA, W.; ZHAO, L.; FARISS, R. N. *et al.* Adaptive Muller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. **J Neuroinflammation**, 8, p. 173, Dec 7 2011.

XU, X. J.; WANG, S. M.; JIN, Y.; HU, Y. T. *et al.* Melatonin delays photoreceptor degeneration in a mouse model of autosomal recessive retinitis pigmentosa. **J Pineal Res**, 63, n. 3, Oct 2017.

YI, H.; NAKAMURA, R. E.; MOHAMED, O.; DUFORT, D. *et al.* Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 48, n. 12, p. 5733-5741, Dec 2007.

YU, W. Q.; GRZYWACZ, N. M.; LEE, E. J.; FIELD, G. D. Cell type-specific changes in retinal ganglion cell function induced by rod death and cone reorganization in rats. **J Neurophysiol**, 118, n. 1, p. 434-454, Jul 01 2017.

ZHANG, L.; WANG, T.; WRIGHT, A. F.; SURI, M. *et al.* A microdeletion in Xp11.3 accounts for co-segregation of retinitis pigmentosa and mental retardation in a large kindred. **Am J Med Genet A**, 140, n. 4, p. 349-357, Feb 15 2006.