



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA**

DANIELLA SENOS LOPES

**ANÁLISE DA EFICÁCIA PROTETORA DE COLÍRIO A
BASE DE MODULADORES DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE EM MODELO MURINO DE
RETINOSE PIGMENTAR**

Orientadores:

Profa. Dra. Lucianne Frangel Madeira

Profa. Dra. Helena Carla Castro



Niterói

2023

DANIELLA SENOS LOPES

**ANÁLISE DA EFICÁCIA PROTETORA DE COLÍRIO A
BASE DE MODULADORES DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE EM MODELO MURINO DE
RETINOSE PIGMENTAR**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Regeneração
Neural, Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF

Tese de Doutorado submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Biotecnologia da Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial para
obtenção de grau de Doutora em Ciência e
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucianne Fragel Madeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Carla Castro

Niterói

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV Gerada
com informações fornecidas pelo autor

L864a Lopes, Daniella Senos
ANÁLISE DA EFICÁCIA PROTETORA DE COLÍRIO A BASE
DE MODULADORES DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE EM
MODELO MURINO DE
RETINOSE PIGMENTAR / Daniella Senos Lopes. - 2023.
91 f.: il.

Orientador: Lucianne Fragel Madeira.

Coorientador: Helena Carla Castro.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de
Biologia, Niterói, 2023.

1. Retinose Pigmentar. 2. Sistema Endocanabinoide. 3. Produção
intelectual. I. Madeira, Lucianne Fragel, orientadora. II. Castro,
Helena Carla, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense.
Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

DANIELLA SENOS LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE UM COLÍRIO À BASE DE
MODULADORES DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE PARA
TRATAMENTO DA RETINOSE PIGMENTAR**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção de grau de Doutora em Ciência e Biotecnologia.

Niterói, 27 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Salabert Gonzalez

Universidade Federal Fluminense

Carlos Rangel Rodrigues

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Carlos Gustavo Garcia

Centro Universitário Anhanguera de Niterói

Daniel Souza Monteiro de Araújo

Universidade de Florença

Paula Campello Costa Lopes

Universidade Federal Fluminense

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento e Regeneração Neural, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia do Instituto de Biologia na Universidade Federal Fluminense, sob a orientação da Professora Dra. Lucianne Fragel Madeira, co-orientação da Professora Dra. Helena Carla Castro e na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), e pela Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal Fluminense (PROPPI/UFF).

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

Agradecimento, por si só, já é difícil de escrever quando se tem muito a agradecer. Às vezes a vida dá um sacode na gente e tira o pouco de agradecimento que a gente tem. Dois mil e vinte e três foi um ano de alto como o Everest e baixo como uma perfuração ao centro da Terra. Me pergunto há quatro meses como fui capaz de chegar aqui, e não digo “aqui” no doutorado, digo “aqui” na defesa. Encerrar um ciclo em um momento que não gostaria de estar pensando em pesquisa, nem sentada atrás de um computador compilando dados.

Dia 07 de agosto de 2023 foi o dia mais feliz da minha vida e dia 10 de agosto de 2023 o pior dia da minha vida. Eu ganhei a luz da minha vida, e em seguida a perdi. Não sei se vocês já tentaram escrever uma frase de luto, mas é uma tarefa extremamente difícil. Então, ao chegar aqui, hoje, escrevendo o que me parecia ser impossível, finalizando um ciclo que pretendia fazer com minha pequena no colo, eu agradeço.

Agradeço à Olívia Senos Chaves, minha princesa Olívia, minha estrela Olívia, minha luz Olívia, meu anjo Olívia, minha razão para continuar, minha Oli. Agradeço por você ter me escolhido para fazer parte da sua trajetória. Agradeço por você existir.

Os demais agradecimentos são pelo caminho, pelo processo.

Agradeço ao meu marido Paulo Vitor, pai da nossa pequena princesa, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, me incentivando, me sustentando em pé.

Agradeço à minha mãe Andréa (a mãe mais forte e orgulhosa desse mundo), ao meu pai Marcelo (o que mais ouviu sobre minhas hipóteses e discutiu meus resultados), ao meu pai Paulo (que mesmo longe sempre me acompanhou e me apoiou) e ao meu irmão Lucas (que sempre me ajudou o quanto pode).

Agradeço à minha mãe científica, Lucianne, que apesar das minhas birras, da minha falta de tempo, da minha correria e de passar uma vida tentando me fazer diminuir a quantidade de café, sempre esteve comigo e me apoiou, me entendeu, me ajudou.

Agradeço a todos do laboratório que estiveram comigo durante uma vida, Camila, Marinna, Rafa e Douglas. E aos que estiveram comigo nessa reta final, Milena, Aline e Maria, não tá escrito o quanto vocês me salvaram. Um parênteses especial para a Camila,

sem ela não teria defesa nenhuma. Suporte técnico e emocional. Suporte de corpo (empada, bolinho de churros e coquinha) e alma. Minha segunda mãe científica, minha eterna co-orientadora da vida.

Agradeço aos membros da banca por aceitar esse desafio.

Agradeço a quem me apoiou e se fez presente, a quem sempre me incentivou e não me deixou desistir. A quem me viu quebrada e me ajudou a catar os meinhos.

Agradeço a todos, mas acima de tudo agradeço a você, minha Olívia. Te amo.

RESUMO

A Retinose Pigmentar é uma doença neurodegenerativa hereditária que causa a morte progressiva dos fotorreceptores e, apesar de amplamente conhecida e estudada, permanece sem cura. Um dos modelos utilizados para estudo dessa doença é o camundongo $PDE\beta^{rd10/rd10}$ (rd10). É visto, em diversas doenças neurodegenerativas, a alteração do sistema endocanabinoide. Nesse trabalho tivemos como objetivo o desenvolvimento de tratamento tópico baseado na manipulação do sistema endocanabinoide como alvo terapêutico da Retinose Pigmentar. As análises feitas após o tratamento tópico com antagonista CB2 não altera o número de fotorreceptores na idade de P19, mas aumenta o número de fotorreceptores quando comparado ao controle na idade de P23, porém esse aumento acontece apenas em alguns experimentos. O tratamento tópico com antagonista CB2 diminui o número de microglias na retina total quando comparado aos animais sem tratamento na idade de P23 e foi identificado a diminuição de TNF- α durante o período que antecede o pico de degeneração dos fotorreceptores, aumentando de forma gradual durante o período de degeneração. Apesar de apresentar positivas alterações celulares e moleculares, as mesmas não refletem em uma melhora na funcionalidade da retina. Para testar outras hipóteses, alguns outros dados preliminares foram adquiridos nesse processo e o tratamento intravítreo com antagonista do receptor CB2 parece aumentar o número de células recoverina positivas a curto e médio prazo, indicando que o fármaco possivelmente possui efeito benéfico na sobrevivência dos fotorreceptores. Já o tratamento intraperitoneal com inibidor da enzima FAAH tende a diminuir o número de células recoverina positivas enquanto o tratamento tópico com inibidor da enzima FAAH parece não alterar o número de fotorreceptores. Os experimentos realizados indicam que a modulação dos componentes do sistema endocanabinoide possuem, em sua maioria, efeito positivo no curso da doença, a depender da forma como é administrado.

Suporte Financeiro: Capes, FAPERJ, CNPq e Proppi-UFF

ABSTRACT

Retinitis Pigmentosa is a hereditary neurodegenerative disease that causes the progressive death of photoreceptors and, despite being widely known and studied, it remains without a cure. One of the murine models used to study this disease is the $PDE\beta^{rd10/rd10}$ (rd10) mouse. Alteration of the endocannabinoid system is seen in several neurodegenerative diseases. In this work, we aimed to develop a topical treatment based on the manipulation of the endocannabinoid system as a therapeutic target for Retinitis Pigmentosa. Analyses carried out after topical treatment with CB2 antagonist do not change the number of photoreceptors at the age of P19, but the number of photoreceptors increases when compared to the control at the age of P23, however this increase only occurs in some experiments. Topical treatment with CB2 antagonist decreases the number of microglia in the total retina when compared to animals without treatment at the age of P23 and a decrease in TNF- α was identified during the period preceding the peak of photoreceptor degeneration, gradually increasing during the period of degeneration. Despite presenting positive cellular and molecular changes, they do not result in an improvement in the functionality of the retina. To test other hypotheses, some other preliminary data were acquired in this process and intravitreal treatment with a CB2 receptor antagonist appears to increase the number of recoverin-positive cells in the short and medium term, indicating that the drug possibly has a beneficial effect on photoreceptor survival. Intraperitoneal treatment with a FAAH enzyme inhibitor tends to reduce the number of recoverin-positive cells, while topical treatment with a FAAH enzyme inhibitor does not seem to change the number of photoreceptors. The experiments carried out indicate that the modulation of the components of the endocannabinoid system has, for the most part, a positive effect on the course of the disease, depending on the way it is administered.

Financial Support: Capes, FAPERJ, CNPq and Proppi-UFF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Componentes do Sistema Endocanabinóide.....	4
Figura 2:	Presença do sistema endocanabinóide na retina murina.....	8
Figura 3:	Constituição do globo ocular.....	10
Figura 4:	Ilustração da retina de um vertebrado adulto.....	12
Figura 5:	Características da Retinose Pigmentar.....	19
Figura 6:	Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630.....	34
Figura 7:	Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630.....	36
Figura 8:	Quantificação de células Iba-1+ na retina murina de animais rd10 com 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630.....	38
Figura 9:	Quantificação da citocina TNF α na ontogênese de animais C57Black/6 e rd10.....	40
Figura 10:	Quantificação da citocina TNF α no tratamento tópico com AM630 em animais com 23 dias pós-natal.....	41
Figura 11:	Quantificação do tempo gasto no campo claro no teste de acuidade visual caixa claro-escuro em animais rd10 com 19 e 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630.....	42
Figura 12:	Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intravítreo agudo com AM630.....	44
Figura 13:	Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intravítreo agudo com AM630.....	46
Figura 14:	Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intraperitoneal com N-NONYL.....	48

Figura 15: Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento tópico com N-NONYL..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Anticorpos Primários.....	27
Tabela 2:	Anticorpos Secundários.....	28
Tabela 3:	Composição oftálmica da formulação controle e do fármaco N-Nonyl.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
Δ 9-THC/ THC	Δ 9-Tetrahydrocannabinol
AEA	Araquidonoil etanolamida, Anandamida
AM630	6-Iodopravadolina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CB1	Receptor Canabinóide do Tipo 1
CB2	Receptor Canabinóide do Tipo 2
CBD	Canabidiol
CCG	Camada de Células Ganglionares
CNE	Camada Nuclear Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Nuclear Interna
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol Lipase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ECB	Endocanabinoide
FAAH	Amido Hidrolase de Ácidos Graxos
GC	Guanilato Ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosa
GPR-55	Receptor acoplado a proteína G-55

2-AG	2-araquidonoil glicerol
MAG-L	Monoacil Glicerol Lipase
NAAA	N-aciletanolamida ácido amidase
NADA	N-araquidonil dopamina
NAPE	N-araquidonil fosfatidil etanolamida
N-Nonyl	4-(n-nonyl) Benzenboronic Acid (N-nonyl),
OEA	N-oleoil etanolamida
P(x)	Animal com X dias pós-natal
PEA	N-palmitoil etanolamida
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PDE	Fosfodiesterase
PLA	Fosfolipase A
PLC	Fosfolipase C
PCD	Fosfolipase D
Rd10	<i>Retinal Degeneration 10</i>
SI	Segmento interno dos fotorreceptores
SE	Segmento externo dos fotorreceptores
SNC	Sistema Nervoso Central
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
URB597	(3'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-cyclohexylcarbamate

1. Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	SISTEMA ENDOCANABINÓIDE	1
1.1.1.	O SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA RETINA.....	6
1.2.	O SISTEMA VISUAL	8
1.2.1.	A RETINA	10
1.3.	RETINOSE PIGMENTAR.....	16
1.3.1.	O MODELO PDE6 $\beta^{rd10/rd10}$	19
1.4.	TRATAMENTOS PARA RETINOPATIAS.....	21
2.	OBJETIVO	25
2.1.	OBJETIVOS GERAIS	25
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1.	ANIMAIS	26
3.2.	PREPARAÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO	26
3.3.	IMUNOFLUORESCÊNCIA	27
3.4.	TRATAMENTO OFTÁLMICO	28
3.5.	TRATAMENTO INTRAVÍTREO.....	29
3.6.	TRATAMENTO INTRAPERITONEAL.....	30
3.7.	TESTE CAIXA CLARO-ESCURO	30
3.8.	PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ELISA	30
3.9.	ELISA.....	31
3.10.	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS	31
3.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4.	RESULTADOS.....	33
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÃO.....	59
7.	REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

O Sistema Endocanabinoide é um sistema neuromodulador recentemente descrito e estudado, mas amplamente distribuído pelos sistemas fisiológicos. Através de sinalização lipídica, está envolvido na regulação do desenvolvimento do cérebro, controle motor, cognição, respostas emocionais e homeostasia (Monory & Lutz, 2009).

O início dos estudos a respeito da sinalização canabinoide foi marcado pela descoberta do Δ^9 -Tetraidrocanabinol (THC), uma substância psicoativa derivada da planta *Cannabis sp.*, por Gaoni e Mechoulam, em 1964 (Gaoni e Mechoulam, 1964; Mechoulam e Gaoni, 1967). A caracterização desse ativo levou a identificação dos receptores canabinoides e seus ligantes endógenos, consolidando o Sistema Endocanabinoide.

A identificação do THC foi seguida pela descoberta do canabidiol (CBD), também extraído da planta *Cannabis sp.* Como são derivados da planta, o THC e CBD são denominados fitocanabinoides. Enquanto o THC é responsável pelo efeito eufórico decorrente do uso da cannabis, o CBD apresenta potencial terapêutico por possuir propriedades anti-inflamatórias, anti-náusea, anti-tumorais e anti-psicóticas, sendo assim, uma substância de grande interesse clínico (Pauli e cols., 2020). Dessa forma, o THC e CBD passaram a ser estudados extensivamente na tentativa de entender seus mecanismos de ação no organismo e como esse potencial poderia ser explorado terapêuticamente.

Os estudos mais aprofundados sobre o tema começaram com a identificação e clonagem dos receptores CB1 (Devane e cols., 1988; Matsuda e cols., 1990) e CB2 (Munro e cols., 1993) e identificação dos dois principais ligantes endógenos, Anandamida (Devane e cols., 1992) e 2-AG (Mechoulam e cols., 1995; Sugiura e cols., 1995). Experimentos utilizando um canabinoide sintético, o CP55940, com marcação radioativa, identificou sítios de ligação de alta afinidade para esse ligante no cérebro. Dessa forma, o receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) foi descrito no cérebro (Devane e cols., 1988 APUD Pertwee, 2006).

Em seguida, o receptor canabinoide do tipo 2 (CB2) também foi identificado nas células do sistema imune. Acreditava-se que o CB2 era um receptor periférico, entretanto já foi identificado em células do sistema nervoso central como, por exemplo, a microglia (Onaivi e cols., 2006). Os receptores canabinoides CB1 e CB2 são receptores acoplados a proteína G e modulam a liberação de neurotransmissores (Devane e cols., 1988 APUD Pertwee, 2010).

Além da ativação por ligantes exógenos (fitocannabinoides ou canabinóides sintéticos), também existem ligantes endógenos que ativam os receptores canabinoides, os chamados endocannabinoides. Todos os caracterizados são de natureza lipídica, derivados de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, principalmente o ácido araquidônico. Os ligantes mais estudados são a Araquidonoil etanolamida (Anandamida) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que são sintetizados sob demanda em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Di Marzo e cols., 2004; Costa e cols, 2011; Sánchez-Blázquez e cols, 2014). Os ligantes sintéticos consistem em uma terceira categoria de ligantes que possuem a capacidade de ativar os receptores canabinoides. Foram desenvolvidos para explorar o potencial terapêutico do sistema endocanabinoide (Castaneto e cols., 2014).

Os primeiros endocannabinoides a serem descobertos foram a Araquidonoil etanolamida (Anandamida - AEA) e o 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (Figura 1). A presença desses endocannabinoides já foi descrita no sistema nervoso de diversos modelos, como suínos, roedores como ratos e camundongos, invertebrados, mamíferos e em humanos (Devane e cols. 1992; Stella e cols. 1997; Di Marzo e cols 2000; Porter e cols. 2002; Bradshaw e Walker 2005; Artmann e cols. 2008). Além dos endocannabinóides clássicos, existem outros endocannabinóides já descritos, como N-araquidonil dopamina (NADA) (Burstein e cols., 2002), 2-araquidonil gliceril éter (2-AGE) (Hanus e cols., 2001), O-araquidonil etanolamina (virodamina) (Porter, 2002), N-oleoil etanolamina (OEA) (Guzmán e cols., 2004) e N-Palmitoil etanolamina (PEA) (Lambert e Fowler, 2005) que também possuem seu papel na sinalização canabinoide.

Os endocannabinóides são sintetizados pelo neurônio pós-sináptico usando precursores lipídicos presentes nas membranas celulares. A anandamida é sintetizada a partir da fosfatidil etanolamina, pela ação da N-acil transferase, que a transforma em N-araquidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE), que por sua vez sofre a ação da fosfolipase-D (PLD) e é transformada em anandamida, que para encerrar o ciclo, é degradada em

etanolamina e ácido araquidônico pela ação principal da amido-hidrolase de ácidos graxos (FAAH). O 2-AG, por sua vez, tem o fosfatidil-inositol como precursor, que é transformado em diacilglicerol (DAG) pela fosfolipase C (PLC), sofre a ação da diacilglicerol lipase (DAGL) e é convertido em 2-Araquidonoil glicerol (2-AG) que, para encerrar o ciclo, é degradado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) em ácido araquidônico e glicerol (Figura 4). Para que a degradação dos endocanabinóides ocorra é necessário a recaptação dos mesmos da fenda sináptica para dentro dos neurônios pós-sinápticos (2-AG) ou pré-sináptico (AEA) (Di Marzo, Bifulco e cols., 2004; El Manira e Kyriakatos 2010). Uma vez liberados na fenda sináptica, os endocanabinóides atuam nos seus receptores disparando vias de sinalização intracelulares no neurônio pré-sináptico e, então, retornando para dentro dos neurônios pós-sinápticos para serem degradados. (Figura 1).

Dois principais receptores acoplados a proteína G são responsáveis pela sinalização endocanabinoide, os receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2). Esses receptores estão relacionados com mudanças na excitabilidade neuronal pela inibição da liberação de neurotransmissores (Feng e cols., 2014). Como já detalhado por Pertwee e colaboradores (2010), os receptores CB1 são majoritariamente encontrados nos terminais de neurônios centrais e periféricos, modulando a liberação de diversos neurotransmissores, mas também são encontrados em outros tipos não neuronais, como glias. Já os receptores CB2 são majoritariamente encontrados em células do sistema imune, sendo sua ativação responsável pela migração celular e liberação de citocinas, por exemplo (REVISAÇÃO, Breivogel & Sim-Selley, 2009).

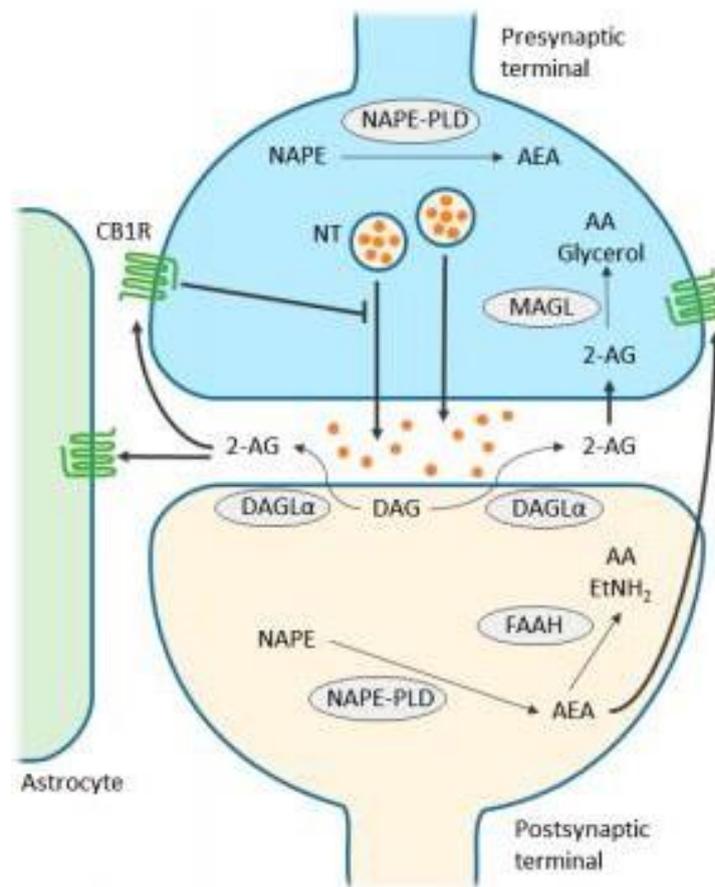


Figura 1. Componentes do Sistema Endocanabinóide. Os ligantes endocanabinóides Anandamida e 2-AG são sintetizados pelas enzimas PLD e DAGL, respectivamente, no neurônio pós-sináptico e liberados na fenda sináptica. Atuam nos receptores canabinóides no neurônio pré-sináptico e disparam a sinalização canabinoide pelos receptores CB1 e CB2 e são degradados pelas enzimas FAAH e MAGL (Zou; Kumar, 2018)

Os receptores CB1 e CB2 são proteínas transmembranares, acopladas a proteína G, sendo o CB1 acoplado a uma proteína $G_{i/s/o}$, e o CB2 acoplado a proteína $G_{i/o}$, sendo capazes de regular a atividade da adenilato ciclase e, com isso, alterar os níveis de AMPc. A diminuição nos níveis de AMPc pela ativação dos receptores canabinóides pode levar à redução da ativação de proteínas cinases dependentes de AMPc (PKA), o que altera a fosforilação de diversas proteínas-alvo, inibindo canais de cálcio dependentes de voltagem, ativando canais de potássio. Essa sinalização é importante para a regulação da liberação de neurotransmissores pelo neurônio pré-sináptico, como o glutamato (Lu; Anderson, 2017), levando a cascatas de sinalização que alteram vias relacionadas com

proliferação (Xapelli e cols., 2013), diferenciação (Compagnucci e cols., 2013) e apoptose (Salazar e cols., 2009).

O receptor CB1 é um receptor mais expressos no sistema nervoso central e já foi descrito em regiões como o córtex cerebral, núcleos da base, cerebelo, hipocampo e bulbo. Esse receptor está envolvido na regulação de processos fisiológicos como regulação da dor, neurogênese, aprendizado e memória, metabolismo (Li e cols., 2020). Além disso, o envolvimento do receptor CB1 também é amplamente estudado em processos neurodegenerativos, ansiedade e depressão (Joshi; Onaivi, 2019).

O receptor CB2 é expresso predominantemente pelas células e tecidos do sistema imunitário, como o baço, as tonsilas, o timo, macrófagos e linfócitos. Portanto, o principal papel desse receptor é a modulação desse sistema, principalmente a regulação da liberação de citocinas (LI e cols., 2020).

A ligação dos endocanabinóides aos seus receptores é capaz de inibir a liberação de neurotransmissores, excitatórios ou inibitórios, por mecanismos relacionados a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio nas células pré-sinápticas e aumento do influxo de potássio que modulam, assim, a força da transmissão sináptica (Evans e cols., 1992; Sánchez-Blázquez e cols, 2014). A Anandamida se comporta como um agonista parcial de CB1 e CB2 (Pertwee e cols., 2010) e não se sabe da sua interação com outros receptores canabinóides, como o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) (Zygmunt e cols. 1999) e Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) (O'Sullivan, 2007), mas é sabido que a anandamida possui efeitos não mediados por CB1 e CB2 (Breivogel e cols., 2001; Monory e cols., 2002). O 2-AG tem a capacidade de ativar CB1 e CB2 com a mesma potência e eficácia (Mechoulam e cols., 1995; Sugiura e cols., 1995).

Além dos receptores clássicos CB1 e CB2, existem outros receptores que podem ser ativados pelos endocanabinoides, fitocanabinoides e canabinoides sintéticos. Os mais conhecidos são os receptores órfãos, como os receptores acoplados a proteína G (GPR-55, GPR 18 e GPR-119), TRPV1 (Brown, 2007; Lu; Anderson, 2017) e PPAR (Sun e Bennett, 2007; Saoirse e cols., 2016).

Os crescentes estudos sobre o sistema endocanabinoide revelaram a sua distribuição em diversos tecidos, o que indica o seu envolvimento em diversos processos

fisiológicos. Nesse sentido, o sistema endocanabinoide se torna um importante alvo para cada vez mais estudos.

1.1.1. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA RETINA

Já é sabido da presença de receptores canabinóides em neurônios, bem como sua atuação nas funções neuronais, mas vale ressaltar que as células gliais compõem grande parte do sistema endocanabinóide e podem atuar de forma independente das células neuronais ou em conjunto com elas. A retina é um tecido que pertence ao sistema nervoso central e os componentes do sistema eCB já foram descritos nesse tecido, assim como em outras regiões cerebrais relacionadas ao processamento visual (Schwitzer e cols., 2016).

Sabe-se que o uso da *Cannabis sativa* induz a vasodilatação da conjuntiva, o que causa a vermelhidão nos olhos. Outra consequência do uso da *Cannabis sativa* é a diminuição da pressão intraocular. Esses efeitos são decorrentes da ativação de receptores canabinóides distribuídos pelos tipos celulares nos tecidos oculares (Bouchard e cols., 2016).

Na retina, através de imunohistoquímica, o receptor CB1 foi encontrado em conjuntos de células amácrinas e horizontais, fortemente expresso na camada plexiforme interna (Straiker e cols., 1999a; Yazulla e cols., 1999), nos terminais dos fotorreceptores do tipo cone e bastonete das retinas de vertebrados (Straiker e cols., 1999a,b; Hu e cols., 2010), bem como nas bipolares de bastonetes da retina de ratos (Yazulla e cols., 1999), e em outras várias espécies, variando de peixes a primatas (Straiker e cols, 1999; Yazulla e cols, 1999; Leonelli e cols, 2005; Lalonde e cols, 2006; Warriier e cols, 2007; Hu e cols, 2010; Zabouri e cols, 2011; Bouskila e cols, 2012) (ver Yazulla e cols, 2008, para revisão). CB1 está presente em cones, células horizontais, algumas células bipolares e células amácrinas e ganglionares (Figura 2). Estudos de *patch-clamp* demonstraram que a ativação do receptor CB1 modula os canais iônicos nos fotorreceptores e a liberação sináptica do glutamato (Fan e cols, 2003; Straiker e cols, 2003; Fan e cols, 2007). Nas células bipolares, a ativação do receptor CB1 inibe as correntes de cálcio (Straiker e cols, 1999). Funcionalmente, esses efeitos podem levar a uma diminuição da liberação sináptica de neurotransmissores e mudanças nos aspectos temporais da resposta das células bipolares. Além disso, a ativação do receptor CB1 também pode modular a

liberação de GABA pelas células amácrinas (Warrier e cols, 2007) e inibir o canal de cálcio ativado por alta voltagem em células ganglionares, o que afeta a excitabilidade dessas células (Lalonde e cols, 2006)

A presença do receptor CB2 foi descoberta, através de imunohistoquímica, em grande parte das células da retina de ratos, como por exemplo na orientação axonal das células ganglionares até o núcleo talâmico, *in vitro* e *in vivo*, em embriões de camundongo (Duff e cols., 2013), comprovando sua importância no desenvolvimento da circuitaria retiniana. Outros estudos (Lu e cols, 2000; Lopez e cols, 2011) demonstraram a presença de receptores CB2 na retina de roedores. A partir de sua distribuição de RNAm, Lu e colaboradores (2000) localizaram os receptores CB2 em fotorreceptores, na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares na retina de ratos adultos. Usando a morfologia e posição das células, o receptor CB2 foi mais precisamente descrito por Lopez e colaboradores (2011), no mesmo modelo animal, no segmento interno de fotorreceptores e em células horizontais, amacrinas e ganglionares.

Cécyre e colaboradores (2013) demonstraram que o receptor CB2 é expresso em vários tipos de células na retina de camundongos adultos e sugeriram que o receptor CB1 e o CB2 contribuem de maneira diferente para as funções visuais: o receptor CB1 não parece estar envolvido nas respostas retinianas globais, enquanto o receptor CB2 parece estar implicado na sensibilidade da bastonetes e cones na adaptação à luz.

As enzimas de síntese e degradação dos endocanabinóides já foram vistas na retina de ratos na fase adulta (P60) de maneira transitória (Cécyre e cols., 2014; Zabouri; Bouchard; Casanova, 2011). A DAGL já foi descrita na retina de camundongos nas camadas plexiformes interna e externa (Bisogno e cols., 2003; Blankman e cols., 2007; Gao e cols., 2010) e na camada de células ganglionares (Hu e cols., 2010), enquanto a FAAH já foi descrita nos segmentos internos dos fotorreceptores, na camada nuclear externa, camada de células ganglionares, nos terminais sinápticos dos fotorreceptores na camada plexiforme externa e colocaliza com CB1 em subpopulações de células amácrinas na camada nuclear interna (Hu e cols., 2010). É interessante notar a diferença na imunomarcagem para FAAH em ratos e em camundongos, uma vez que a marcação para FAAH é ausente nas células horizontais de camundongos (Hu e cols., 2010). A MGL está presente em todos os tipos celulares da retina, bem como a NAPE-PLD, com exceção dos bastonetes (Figura 2).

Tipos celulares	CB1	CB2
Bastonetes	— — —	— — —
Cones	— — —	— — —
Horizontais	— — —	— — —
Bipolares	— — —	— — —
Glia de Müller	— —	— —
Amácrinas	— — —	— — —
Ganglionares	— — —	— — —

—	CB1R	—	CB2R
—	FAAH	—	MGL
—	NAPE-PLD	—	DAGL α

Figura 2. Presença do sistema endocanabinóide na retina murina. Análise da presença dos componentes do sistema endocanabinóide na retina adulta murina. A linha vermelha representa os receptores, CB1 e CB2, a linha azul representa as enzimas de degradação dos endocanabinóides, FAAH e MGL e as linhas verdes representam as enzimas de síntese dos endocanabinóides, NAPE-PLD e DAGL. Os receptores CB1 e CB2 foram encontrados em todos os tipos celulares, com exceção da Glia de Muller. A FAAH foi encontrada em todos os tipos celulares, exceto a Glia de Muller. A NAPE-PLD foi encontrada em todos os tipos celulares, exceto bastonetes. A MGL foi encontrada em todos os tipos celulares. A DAGL foi encontrada em todos os tipos celulares, exceto a Glia de Muller. **Modificado de Bouskila e cols., 2016.**

Apesar das alterações do sistema endocanabinóide em doenças neurodegenerativas serem muito estudadas, pouco se sabe a respeito do sistema endocanabinóide na retina em condições patológicas.

1.2. O SISTEMA VISUAL

O sistema visual humano é extraordinário quanto à quantidade e à qualidade das informações que ele fornece acerca do mundo. Um olhar é suficiente para descrever localização, tamanho, forma, cor e textura de objetos e se os objetos estão se movendo, sua direção e velocidade. Igualmente notável é o fato de que a informação visual pode ser discernida diante de uma ampla gama de intensidades de estímulo, desde a suave luz das estrelas, à noite, até a mais brilhante luz do Sol [...] (Purves e cols., 2010, p223.).

O sistema visual tem como principal componente o olho, sendo o mesmo um órgão muito complexo, especialmente em vertebrados. O olho é composto por três camadas: uma mais externa, uma intermediária e uma mais interna. A camada mais externa é formada pela córnea e esclera, responsáveis pelo suporte estrutural do olho; a camada intermediária compreende a vasculatura central da retina e é constituída pela íris, corpo ciliar e coróide. Por fim, a camada mais interna, que compreende a retina, tecido responsável pelo processamento dos estímulos luminosos. (Kels e cols., 2015).

As camadas supracitadas organizam o olho em três câmaras, a anterior é delimitada ventralmente pela córnea e dorsalmente pela íris; a posterior compreende a região entre a íris, cristalino e corpo ciliar, ambas as cavidades são preenchidas por um líquido denominado humor aquoso; e a câmara vítrea, mais posterior e se estende do cristalino até a retina (Kels e cols, 2015), preenchida pelo humor vítreo. A presença do humor aquoso e humor vítreo no globo ocular geram uma pressão intraocular e mantém o formato esférico do olho (Goel e cols., 2010) (Figura 3). Sua formação é dependente de processos muito bem organizados que se iniciam em estágios ainda embrionários. Mutações nos genes relacionados ao seu desenvolvimento podem acarretar sérias desordens (Purves e cols., 2010; Kolb, 2012)

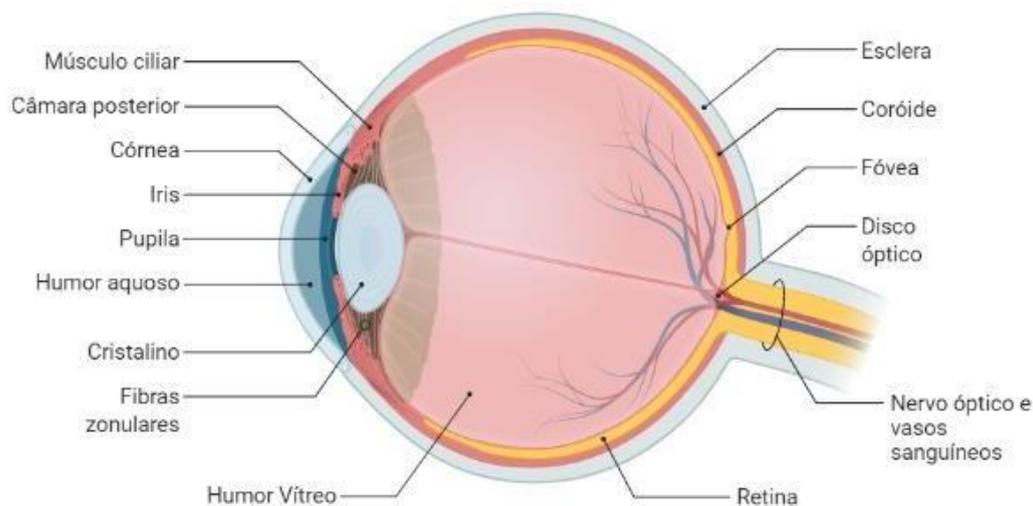


Figura 3: Constituição do globo ocular. Ilustração dos tecidos que formam o olho. É possível identificar a camada mais externa do olho, composta pela córnea e esclera. Na região anterior do olho, estão presentes estruturas como a íris, músculo ciliar e o humor aquoso. Mais internamente encontra-se o cristalino, seguido pelo humor vítreo. Na região posterior, está localizada a retina e a coróide. **Modificado de Biorender disponível em biorender.com**

No instante em que o olho recebe a luz, esta atravessa a córnea e segue em direção a retina, atravessando as estruturas do caminho - o humor aquoso, o cristalino e o humor vítreo - chegando na retina. A córnea e o cristalino formam um conjunto de lentes que conferem ao olho a capacidade de auxílio na reflexão e na passagem de luz (Kolb, 2003).

Apesar de algumas diferenças estruturais, o olho de camundongos se assemelha muito com o olho humano numa visão macroscópica. O olho humano possui um cristalino muito menor que o de camundongo e, também possui, na retina, uma região chamada fóvea, localizada no centro da mácula, a fóvea. É uma região que possui uma grande quantidade de fotorreceptores, especialmente do tipo cone, sendo responsável pela acuidade visual (Provis e cols., 2013).

1.2.1. A RETINA

A retina é considerada parte integrante do sistema nervoso central (SNC) por ter a mesma origem embrionária - vesículas ópticas originárias do diencéfalo (Mey e Thanos, 2000). É neste tecido que toda informação visual proveniente do meio externo é captada e transformada em estímulo elétrico para posterior envio às vias centrais da visão. A esse

processo damos o nome de fototransdução (Erskine; Herrera, 2014). A estrutura da retina possui uma parte neural e uma parte não neural.

A retina não neural é composta pelo epitélio pigmentado, situado entre a retina neural e a área vascular da retina (coróide). São células cubóides conectadas entre si por junções aderentes contendo melanina, reduzindo o espalhamento interno da luz que penetra o olho. A parte apical do epitélio pigmentado está ligada ao segmento externo dos fotorreceptores e é responsável por proteção, suporte, manutenção e suprimento para a camada de fotorreceptores (Bharti e cols., 2006).

A parte neural da retina é formada a partir de uma camada interna de células na cuia óptica. Nesse estágio do desenvolvimento surge um *pool* de progenitores retinianos que proliferam e, posteriormente, dão origem a seis tipos neuronais (Dowling, 1970, *apud* Marquardt e Gruss, 2002; Wässle, 2004; Thoreson e Mangel, 2012) e um tipo glial, cada um diferindo entre si por sua função e morfologia (Masland, 2012). Os tipos neuronais da retina são os fotorreceptores do tipo cone, fotorreceptores do tipo bastonete, células horizontais, células bipolares, células amácrinas e células ganglionares; enquanto o tipo glial é a glia de Müller. Também estão presentes outros tipos gliais que migram para a retina durante seu desenvolvimento: os astrócitos e as microglias (Figura 4).

Os progenitores dessas células possuem duas características importantes: seguem uma cronologia de surgimento conservada entre os vertebrados ao passo que ganham competência para responder pistas extrínsecas e intrínsecas; e são multipotentes, ou seja, capazes de gerarem qualquer tipo celular (Cepko, 2014). Esse é um evento importante que garante que cada população celular tenha a quantidade de componentes necessários para a formação completa do tecido (Donovan e Dyer, 2005). Em geral, o período de geração de um determinado tipo celular se sobrepõe e se correlaciona com o de outro tipo celular durante o período embrionário e/ou pós-natal (Prada e cols., 1991; Cepko e cols., 1996; Yang, 2004). Algumas das populações celulares presentes na retina murina adulta apresentam seu processo de neurogênese ainda em estágios embrionários do desenvolvimento, enquanto outras são consideradas mais tardias, com sua geração em períodos pós-natais (Martins; Pearson, 2007).

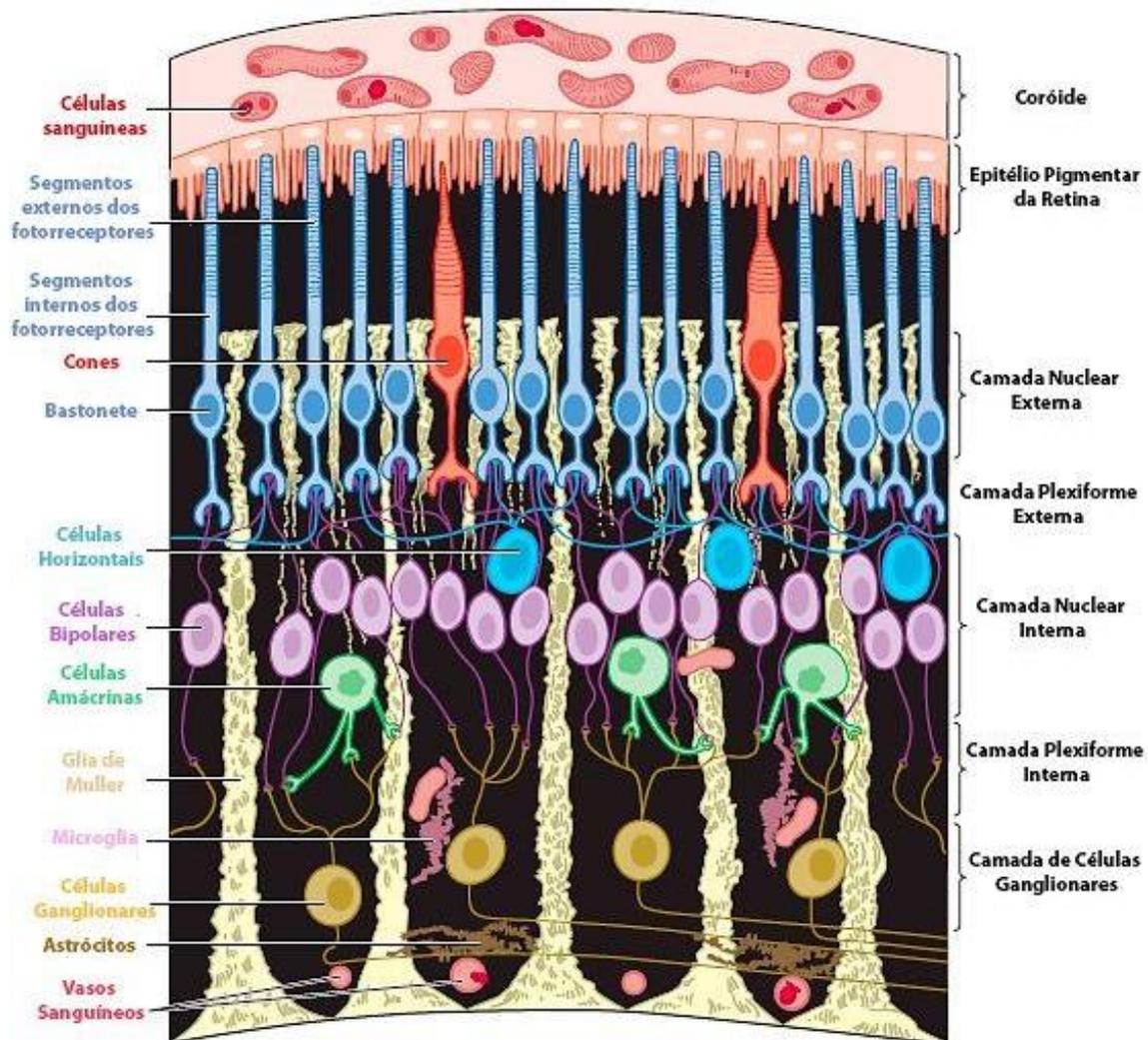


Figura 4: Ilustração da retina de um vertebrado adulto. A retina de um vertebrado adulto é composta de seis tipos neuronais e três tipos gliais. Os tipos neuronais e gliais estão dispostos em camadas. Na camada nuclear externa (CNE) estão os fotorreceptores do tipo cone (vermelho) e fotorreceptores do tipo bastonete (azul claro), seguido da camada plexiforme externa (CPE). Na camada nuclear interna (CNI) estão localizados os corpos celulares das células bipolares (roxo), células horizontais (azul), células amácrinas (verde), bem como da glia de Müller (bege) e da microglia (rosa). Em seguida vem a camada plexiforme interna (CPI) e, por fim, a camada de células ganglionares (CCG), composta pelas células ganglionares (amarelo), células amácrinas deslocadas (não mostradas) e os astrócitos (marrom). É possível observar também o epitélio pigmentado da retina (EPR), os segmentos externos de fotorreceptores (SEF) e a presença de vasos sanguíneos (VS). **Esquema modificado, Bramall e cols (2010).**

A retina possui uma organização estratificada, contendo os diferentes tipos neuronais e gliais. Na porção mais externa da retina, encontram-se os segmentos externos dos fotorreceptores, que contém o fotorreceptor, que reconhece o estímulo luminoso,

seguido pela camada nuclear externa (CNE) formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores cones e bastonetes, seguida da camada nuclear interna (CNI), formada pelos corpos celulares das células horizontais, bipolares e amácrinas. Por fim, na parte mais interna da retina, encontra-se a camada de células ganglionares (CCG) formada pelos corpos celulares das células ganglionares e amácrinas deslocadas. Intercalando estas camadas celulares, encontram-se as camadas plexiforme externa (CPE) e plexiforme interna (CPI), que são regiões de contatos sinápticos entre os diversos tipos celulares (Vecino e cols, 2015). Os axônios das células ganglionares vão dar origem à camada de fibras ópticas (CFO) que formará o nervo óptico, sendo este o responsável pelo envio da informação aos núcleos cerebrais da visão (Marquardt e Gruss, 2002; Wässle, 2004). A glia de Müller, cujo corpo celular está localizado na CNI, emite prolongamentos que atravessam todas as camadas da retina, indo desde o segmento interno dos fotorreceptores até a base da camada de células ganglionares.

A glia desempenha diversas funções para o bom funcionamento da retina (Dowling, 1970; Wässle, 2004), dentre elas a modulação da transmissão sináptica (Newman, 2004), e é capaz de reentrar no ciclo celular e iniciar um processo chamado gliose reativa, na tentativa de reparar algum dano causado a retina (Dyer e Cepko, 2000). Os astrócitos estão localizados em regiões vasculares e são, portanto, relevantes na gênese e manutenção vascular e na barreira hemato-retiniana (Vecino e cols., 2015). As microglias migram e passam a residir no tecido retiniano, nas camadas plexiformes, e são importantes na preservação e transmissão das sinapses na retina adulta (Wang e cols., 2016).

Os fotorreceptores são células capazes de transformar o estímulo luminoso em estímulo eletroquímico para que o mesmo se propague em direção as células ganglionares e essas possam levar o estímulo através do nervo óptico para as regiões responsáveis pela visão (Wässle, 2004). Os fotorreceptores são divididos em quatro partes, sendo estas o segmento externo, o segmento interno, o corpo celular e o terminal sináptico (Fu; Yau, 2007). O segmento externo dos fotorreceptores contém discos membranares, onde se localizam as opsinas (cones) e rodopsinas (bastonetes), que são pigmentos visuais que atuam na fototransdução e estão ligados ao epitélio pigmentado, que por sua vez é responsável pela reciclagem desses pigmentos através da fagocitose dos discos membranares (Strauss, 2005). No segmento interno encontram-se as mitocôndrias, responsáveis pelo suporte metabólico destas células. No corpo celular está o material

genético dessas células e nos terminais sinápticos é onde ocorre a comunicação com outros tipos celulares, como células bipolares e horizontais (Sung e Chuang, 2010). Os cones possuem menor sensibilidade à luz e, portanto, necessitam de uma alta luminosidade para sua ativação quando comparados com os bastonetes, que podem ser ativados por menores intensidades de luz (Lagnado, 2000; Baker; Kerov, 2013). A retina de camundongo é composta por cerca de 97% de bastonetes e 3% de cones (Carter-Dawson; Lavail, 1979).

Os fotorreceptores são responsáveis pela primeira etapa do processamento visual: a transformação de estímulo luminoso em estímulo eletroquímico - a fototransdução -. Na ausência de luz, os fotorreceptores mantêm constante o influxo de íons cálcio e sódio (Ca^{2+} e Na^+) pela abertura de canais sensíveis a GMPc (Monofosfato cíclico de guanosina), levando a uma liberação constante do principal neurotransmissor excitatório presente no Sistema Nervoso Central (SNC), o glutamato (Fu; Yau, 2007). No momento em que um fóton de luz atinge os fotorreceptores, os receptores metabotrópicos acoplados a proteína G transducina, chamados de opsinas em cones e rodopsinas em bastonetes, sofrem uma mudança conformacional que o torna um receptor ativado e ativa uma enzima ancorada a membrana, chamada fosfodiesterase (PDE), que hidrolisa GMPc em GMP, o que leva a uma diminuição dos níveis de GMPc e subsequente fechamento dos canais iônicos dependentes de GMPc, resultando na hiperpolarização dos fotorreceptores e conseqüentemente a uma diminuição da liberação de glutamato (Fu; Yau, 2007), que é percebido pelas células bipolares (Jindrová, 1998; Lamb; Pugh, 2006).

As células bipolares que recebem os estímulos dos fotorreceptores respondem de maneira diferenciada, dependendo se são bipolares ON ou bipolares OFF (Hack; Peichl; Brandstätter, 1999; Kolb, 2003). As células bipolares ON hiperpolarizam em resposta ao glutamato, uma vez que possuem receptores metabotrópicos para ele, enquanto as células bipolares OFF despolarizam em resposta ao glutamato, uma vez que possuem receptores ionotrópicos para o mesmo (Kolb, 2003; Demb; Singer, 2015). As células horizontais podem modular a resposta dos fotorreceptores, pois são capazes de liberar GABA (ácido gama-aminobutírico), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso, produzindo um *feedback* negativo, que auxilia em uma maior percepção de bordas e maior percepção de contraste (Kramer; Davenport, 2015; Demb; Singer, 2015). As células amácrinas diferem bastante quanto a morfologia e função, bem como ao neurotransmissor que liberam, principalmente as gabaérgicas e as glicinérgicas. Elas podem estar na

camada nuclear interna ou na camada de células ganglionares e são importantes para as vias de inibição lateral, bem como as horizontais (Eggers; Lukasiewicz, 2011; Zhang; Mccall, 2012; Huang; Protti, 2016). As células ganglionares processam a informação final para enviar aos núcleos centrais de processamento visual através do nervo óptico, formado pelos axônios dessas células (Kolb, 2003; Sanes; Masland, 2015; Vecino e cols., 2015).

A glia de Müller é essencial para a manutenção do funcionamento da retina atuando no suporte homeostático e metabólico dos neurônios através da produção de precursores de neurotransmissores, regulação da atividade sináptica e suporte antioxidativo, principalmente dos fotorreceptores. A glia de Müller apresenta um papel relevante em casos de degenerações retinianas, uma vez que é capaz de realizar um processo denominado gliose reativa para reparar os danos (Reichenbach; Bringmann, 2013). O processo de gliose reativa envolve inúmeras mudanças na célula glial a nível morfológico, bioquímico e fisiológico. Uma das principais características da glia de Müller ativada é a expressão de proteínas filamentosas intermediárias como a proteína ácida filamentar glial (GFAP), vimentina e nestina. Assim, a célula glial se torna hipertrofiada com o intuito de ocupar espaços deixados pela morte neuronal, de forma a manter a estrutura tecidual. Além de oferecer suporte estrutural, a glia também secreta fatores neurotróficos, angiogênicos e antioxidantes para favorecer a sobrevivência celular (Graca e cols., 2018).

Os astrócitos migram para a retina através do nervo óptico, entram na retina através dos vasos sanguíneos e permanecem localizados próximos a regiões vasculares. Auxiliam no suporte neurotrófico, suporte mecânico para axônios em denervação e manutenção da barreira hemato-retiniana. (Vecino e cols., 2015).

As microglias, em condições fisiológicas, residem nas camadas plexiformes e apresentam funções relevantes no desenvolvimento de circuitos neurais, através da realização da poda sináptica, na homeostasia do tecido e em cenários patológicos. As células microgliais apresentam fenótipos distintos caracterizados por diferenças morfológicas e expressão de diferentes proteínas. A microglia em estado de “repouso” apresenta morfologia ramificada e atua como uma sentinela, responsável pelo patrulhamento do tecido. Apesar de ser denominado estado de repouso, esse fenótipo microglial não é inativo e contribui para a homeostase da retina, secretando citocinas e fatores neurotróficos (Vecino e cols., 2015). A microglia forma uma população de macrófagos residentes no sistema nervoso central que é especializada em funções imunes,

respondendo ao estímulo através da secreção de citocinas e fatores neurotróficos. Atua também no desenvolvimento e manutenção das redes neurais, contribuindo para o remodelamento desses circuitos, mantendo a homeostasia do tecido (Fernandes e cols., 2014; Gertig e Hanisch, 2014; Ransohoff e Brown, 2012), bem como eliminação de debris celulares e sinapses fracas (Sheridan e cols., 2013).

1.3. RETINOSE PIGMENTAR

A Retinose Pigmentar (RP) é um conjunto de doenças degenerativas que acometem a retina, atingindo 1 a cada 4000 pessoas (Haim 2002; Daiger e cols. 2007), afetando a retina a nível molecular e celular (Baehr e Frederick, 2009). Caracterizada pela perda progressiva dos fotorreceptores, a degeneração tem início pela periferia da retina, seguindo em direção ao centro. Essa sequência se dá pela perda massiva dos bastonetes e, ao final do curso de degeneração, a perda dos cones (Figura 5A) (Heckenlively and Daiger 2007; Fahim e cols. 2013). No Brasil, em 2014, o Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimou que cerca de 50.000 pessoas têm Retinose Pigmentar porém, a taxa de frequência de degenerações retinianas herdadas e seus genes causadores são subnotificados. As taxas de frequência relativa de diferentes distrofias retinianas herdadas no Brasil são semelhantes às encontradas globalmente (Motta e cols., 2018).

Os padrões de herança são variados e incluem formas autossômicas recessivas, autossômicas dominantes e ligadas ao X (Daiger e cols., 2007; Daiger e cols., 2016) e a gravidade da doença está diretamente relacionada com seu padrão mendeliano de herança. Comumente, os subtipos de RP que se manifestam no início da vida tendem a progredir mais rapidamente (Verbakel e cols., 2018).

Pacientes com RP ligada ao X (5–15% dos pacientes), em geral, tem um curso mais grave da doença em comparação com pacientes com RP autossômica recessiva (50–60% dos pacientes), e pacientes com uma forma autossômica dominante de RP (30-40% dos pacientes) (Bunker e cols., 1984; Novak-Lauš e cols., 2002; Verbakel e cols., 2018) tem o melhor prognóstico a longo prazo em relação à retenção da visão central (Grover e cols., 1996; Hamel, 2006; Verbakel e cols., 2018). As mutações mais comuns são as autossômica recessiva, que atinge aproximadamente 60% dos pacientes com RP e, dentre os quais, 5% demonstram mutação no gene da fosfodiesterase (Hartong e cols., 2006).

A anormalidade clínica é geralmente restrita ao olho; no entanto, aproximadamente 20 a 30% dos pacientes também têm problemas sistêmicos. As proteínas mutantes que têm funções específicas da retina ou são expressas principalmente na retina podem causar a RP típica ou não síndrômica, enquanto mutações nos genes que funcionam em diversos tipos de células ou tecidos resultam em manifestações sistêmicas ou RP síndrômica (Waters e Beales, 2011; Wheway e cols., 2014). Existem aproximadamente 30 síndromes diferentes relacionadas a essa retinopatia (Hartong e cols., 2006).

As características celulares e moleculares desse padrão de degeneração acarretam sintomas clínicos como a cegueira noturna, uma vez que as principais células atingidas são os bastonetes, responsáveis pela resposta a baixas intensidades de luz, seguido da perda progressiva da visão periférica, pois na periferia é onde estão maior parte dos fotorreceptores do tipo bastonete, chamada de visão em túnel e culminando na cegueira total, após atingir também aos cones. Também são características da doença a formação de espículas ósseas e atenuação dos vasos sanguíneos (Figura 5B), redução do campo visual e eletrorretinogramas (ERGs) anormais (Fishman e cols. 2005). Apesar de sintomas comuns, a intensidade é variável entre os pacientes, até mesmo os de mesma família.

Como consequência dessas anormalidades a retina sofre um remodelamento na tentativa de amenizar as consequências geradas pelas mutações. É possível estratificar o remodelamento presente na doença em três fases principais: Fase I é o período pré-degeneração caracterizado por marcadores precoces de estresse dos fotorreceptores; Fase II é o período da perda dos fotorreceptores acompanhado do remodelamento glial na camada nuclear externa; Fase III, que é o período de remodelamento da retina sobrevivente, envolve distintas modificações, incluindo morte neuronal, mudanças na morfologia e migração celular (Marc e cols., 2003a). O mecanismo pelo qual ocorre a morte dos fotorreceptores ainda não é certo, uma vez que há trabalhos em modelos animais que apresentam a morte pela via clássica de apoptose, através da ativação de caspases, proteínas Bcl, liberação de citocromo C e ativação de AP1 e p53, por exemplo (Comitato e cols., 2014) e outros que mostram a morte por vias não apoptóticas, guiadas pela mudança no consumo de oxigênio, que pode induzir hiperoxia, que por sua vez leva ao aumento fatal no stress oxidativo dos fotorreceptores (Sancho-Pelluz e cols., 2008).

Para o estudo da retinose pigmentar foram estabelecidos diversos modelos animais, como os caninos (Tuntivanich e cols., 2009), suínos (Li e cols., 1998), ratos (Orhan e cols., 2015), felinos (Menotti-Raymond e cols., 2010) e murinos (Chang e cols., 2002). Um modelo de degeneração já bem estabelecido são os modelos murinos que apresentam degeneração retiniana, os chamados rd – *retinal degeneration* – em inglês. São listados mais de dez modelos murinos de degeneração retiniana, com diferentes tipos de mutação. Um modelo comumente usado e com mutação conhecida é o modelo $Pde6^{\beta^{rd10/rd10}}$ (rd10), com mutação no gene da subunidade β da enzima fosfodiesterase 6 (PDE6 β), essencial no processo de fototransdução, ou em outro gene, além de distintos tempos de progressão da doença (Chang e cols., 2002).

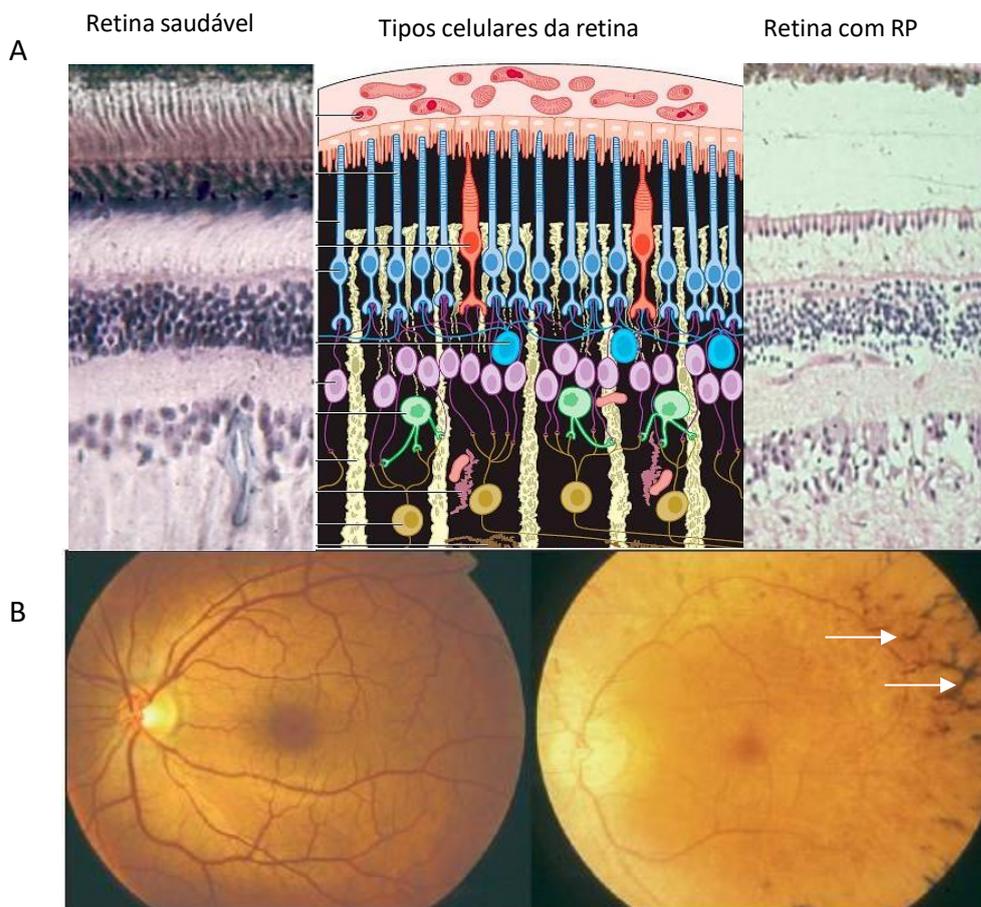


Figura 5. Características da Retinose Pigmentar. (A) Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, onde as células são visíveis em suas respectivas camadas, a esquerda e a direita. No centro, um esquema das células da retina. A esquerda, a retina de um indivíduo sem RP, com suas camadas nucleares e plexiformes preenchidas, bem como, na CNE, o corpo dos fotorreceptores que projetam seus segmentos. A direita, um paciente com RP, mostrando a perda dos fotorreceptores na CNE, bem como um remodelamento estrutural da retina nas camadas subsequentes. (B) Exame de fundo de olho mostrando a diminuição das ramificações dos vasos sanguíneos e surgimentos de espículas ósseas em pacientes com retinose pigmentar (direita, setas brancas), quando comparados com indivíduos saudáveis (esquerda). Camada de células ganglionares (CCG); camada plexiforme interna (CPI); camada nuclear interna (CNI); camada plexiforme externa (CPE); camada nuclear externa (CNE). **Modificado de Hartong e cols., 2006; Bramall e cols., 2010 (A); Daiger e cols., 2015 (B).**

1.3.1. O MODELO PDE6 $\beta^{rd10/rd10}$

Dentre esses dez modelos murinos citados anteriormente, três deles envolvem mutações no gene da PDE6 β , como já explicado anteriormente, sendo duas dessas mutações espontâneas e uma induzida (Chang e cols., 2007).

O modelo murino $Pde6\beta^{rd10/rd10}$ (rd10) possui uma mutação autossômica recessiva na subunidade β da fosfodiesterase 6, no exon 13, provocando uma mutação *missense*, mudando um códon do material para um outro códon diferente, que não codifica aquele mesmo aminoácido, levando a $Pde6\beta$ a ter uma atividade remanescente e, com isso, a perda da sua função se dá de forma gradual, levando a uma degeneração mais lenta, mimetizando de forma mais fiel a retinose pigmentar em humanos (Chang e cols., 2007).

Em animais rd10 a degeneração dos fotorreceptores tem início por volta de 18 dias pós-natal (P18) e alcançando o pico em P25, conforme descrito por Gargini e colaboradores, em 2007. Dessa forma, o período de degeneração não coincide com o período de maturação dos fotorreceptores que, em camundongos finaliza cerca de 12 dias após seu nascimento, no período de abertura dos olhos (Ohsawa e Kageyama, 2008).

A degeneração dos fotorreceptores nos animais rd10 pode ser dividida em duas fases, sendo a primeira fase mais rápida, quando ocorre a diminuição de cerca de 80% da espessura da CNE pela morte dos fotorreceptores, entre a segunda e a quarta semanas pós-natal, e a segunda fase, considerada mais lenta, quando ocorre a morte dos fotorreceptores remanescentes, podendo levar até dois meses pós-natal (Samardzija e cols., 2012).

A degeneração dos fotorreceptores nesse modelo murino ocorre de forma oposta a degeneração em humanos. Enquanto em humanos a degeneração ocorre da periferia para o centro, em rd10 o gradiente é do centro para a periferia da retina, com um atraso de 2-3 dias entre as regiões (Gargini e cols., 2007), ocorrendo de forma mais rápida no centro quando comparado a periferia (Barhoum e cols. 2008). Semelhante aos humanos com retinose pigmentar, bastonetes são as primeiras células a morrerem, com os cones resistindo até a idade adulta (Barhoum e cols., 2008; Gargini e cols., 2007). As células horizontais sofrem um encurtamento dos seus processos, as células bipolares reduzem a sua conectividade com as outras células da CNE e da CCG, bem como a redução no tamanho das células amácrinas também são observados na retina central por volta de P20 (Barhoum e cols., 2008; Puthussery e cols., 2009). Portanto, apesar do principal insulto ser nos bastonetes, outros tipos celulares também são afetados indiretamente por essa mutação durante o curso de degeneração dos fotorreceptores.

A análise de eletroretinograma de animais rd10 mostraram que a resposta máxima das ondas b fotópicas e escotópicas ocorre com 3 semanas de idade e já não são mais detectáveis aos 2 meses de idade (Chang e cols, 2002). Como já dito, o início da morte dos fotorreceptores nos animais rd10 ocorre a partir de P18, com o pico da morte em P25

quando, por fim, a camada nuclear externa se resume a uma única fileira de fotorreceptores em P35, com um pequeno número de cones resistindo até 9 meses de idade (Chang e cols, 2007; Gargini e cols, 2007).

Apesar da mutação ser o principal motivo da morte das células retinianas, outros fatores influenciam na progressão da doença, como a ação da microglia e o processo de gliose reativa. Em diversos modelos animais de doenças neurodegenerativas retinianas já foi demonstrado a participação da microglia na degeneração e na apoptose de fotorreceptores (Zeiss e Johnson, 2004; Zeng et al, 2005; Gehrig et al, 2007; Zhao e cols, 2015).

Apesar de todos os modelos já estabelecidos e os estudos frequentes na área, a retinose pigmentar ainda é uma doença sem cura.

1.4. TRATAMENTOS PARA RETINOPATIAS

A heterogeneidade da doença dificulta conclusões gerais e tratamentos mais amplos para a Retinose Pigmentar. Exames como tomografia de coerência óptica (OCT), autofluorescência de fundo de olho, teste de campo visual e eletrorretinografia (ERG) podem ser úteis no monitoramento da progressão da perda celular e visual (Berson e cols., 1993; McCulloch e cols., 2015; Alnawaiseh e cols., 2019).

Os tratamentos atuais são variados, sendo os mais utilizados o tratamento farmacológico, a terapia gênica, transplante de células e as próteses retinianas. Além do tratamento da própria doença há tratamento para efeitos secundários relacionados a RP, como o edema macular e a catarata.

O tipo de tratamento vai depender do estágio da doença. A terapia gênica costuma ser apropriada em estágios iniciais da degeneração, e estratégias neuroprotetoras podem tratar durante a degeneração. A substituição celular, optogenética e próteses retinianas são estratégias para tratamentos de pacientes em estágios avançados de degeneração (Kutluer e cols., 2020)

A terapia gênica é um tratamento promissor para retinopatias, pois a retina é um tecido com fácil acessibilidade, relações imunes bem estabelecidas e compartimentalização, o que pode inibir os efeitos colaterais sistêmicos (Dalkara e cols., 2016). No entanto, a heterogeneidade da doença, devido ao alto número de genes

causadores da retinose pigmentar, impede o desenvolvimento de terapia genética comum para eles.

Mutações recessivas ou ligadas ao X são mais suscetíveis a esse tipo de tratamento, pois normalmente levam à ausência de proteína ou à produção de uma proteína inativa ou com sua função prejudicada (Dalkara e Sahel, 2014). Já em mutações dominantes, a superprodução de proteínas normais usando terapia genética simples pode não ser suficiente para superar o efeito tóxico da proteína mutante (Chadderton e cols., 2009; Petrs-Silva e Linden, 2014). Portanto, estratégias diferenciais de acordo com os genes causadores, mutação e padrões herdados são necessárias para a terapia genética da RP.

O sucesso ou o fracasso da terapia gênica para o tratamento de qualquer doença precisa levar em conta o vetor eficiente para a entrega do transgene terapêutico ao tipo de célula alvo. Atualmente, existem duas abordagens principais para a entrega de material genético: vetores virais e vetores não virais (Lipinski e cols., 2013).

Para vetores virais, a injeção sub-retiniana é a maneira mais utilizada de entrega de genes às células externas da retina, alvo da maioria das retinopatias hereditárias. No entanto, a injeção sub-retiniana para entrega de genes requer procedimentos cirúrgicos, ocasionalmente causando complicações adversas, como descolamento da retina e danificação dos fotorreceptores e do epitélio, prejudicando a visão remanescente. Repetidas injeções sub-retinianas levarão a danos graves adicionais a retina, tornando-se um obstáculo na utilização para tratamentos, principalmente em doenças que tenham caráter inflamatório. Para contornar esse problema, tentou-se a entrega de genes pelo humor vítreo, através de injeções intravítreas (Hartman e cols., 2018; Yiu e cols., 2020).

Os vetores não virais, como lipossomos, polímeros, polipeptídeos e nanopartículas compactadas, tem vantagens sobre os vetores virais, como baixa imunogenicidade, alta carga útil e possibilidade de produção em larga escala. Por outro lado, vetores não virais podem apresentar outros obstáculos como transporte ineficiente pela membrana celular, degradação intracelular/extracelular e falta de expressão gênica a longo prazo (Trapani e cols., 2014; Zulliger e cols., 2015). Com os recentes avanços da tecnologia, vetores não virais contornaram essas limitações, tornando a terapia gênica não viral uma abordagem promissora para o tratamento de doenças (Koirala e cols., 2013).

Para o tratamento farmacológico muitos agentes neuroprotetores, incluindo drogas neurotróficas, anti-apoptóticas e antioxidantes, são estudados. Essas abordagens farmacológicas objetivam retardar a progressão da doença através da neuroproteção e conservação da visão útil dos indivíduos afetados (Jayakody e cols., 2015).

O transplante de células tem como objetivo introduzir células em um paciente para produzir células saudáveis capazes de substituir células não funcionais e se conectar com as células retinianas restantes (Seiler e Aramant, 2012; Jones e cols., 2017). As duas principais fontes de células para transplante na retina incluem precursores de fotorreceptores da retina e células-tronco embrionárias diferenciadas (Jayakody e cols., 2015).

Apesar dos diferentes meios de diferenciação em fotorreceptores oriundos de novas células para terapia de substituição – Células tronco embrionárias (Lamba e cols., 2009), células tronco pluripotentes induzidas (Tucker e cols., 2014) e células tronco da retina adulta (Demontis e cols., 2012) - , nenhum desses protocolos de diferenciação, até o momento, foi capaz de prover um número considerável de fotorreceptores nem a capacidade de integração apropriada para ser considerado uma terapia eficiente de transplante (Marigo e Casarosa, 2014; Gasparini e cols., 2019). No entanto, células do epitélio pigmentado da retina já diferenciadas *in vitro* tem se mostrado eficaz em ensaios clínicos na degeneração macular relacionada a idade (Schwartz e cols., 2015; Mandai e cols., 2017), mostrando melhora um ano após a cirurgia (Fortuny e Flannery, 2018).

Os neurônios, por serem células nervosas responsivas a impulsos elétricos, podem ser estimulados pela aplicação de carga elétrica por um eletrodo. Nas doenças degenerativas da retina, como a RP, há uma grande redução na quantidade de fotorreceptores. Para tratar pacientes sem fotorreceptores remanescentes, a prótese retiniana tem sido proposta como estratégia terapêutica (Yanai e cols., 2007). Por meio da estimulação elétrica dos neurônios retinianos sobreviventes, esses dispositivos evocam sinais visuais que são então transmitidos ao cérebro. Atualmente, as próteses visuais utilizadas em ensaios clínicos possuem poucos eletrodos, o que limita a acuidade visual. Matrizes de eletrodos com altas densidades de eletrodos foram desenvolvidas usando novas tecnologias, incluindo eletrodos de diamante e maquinaria a laser (Weiland e Humayun, 2014; Tong e cols., 2019). A prótese retiniana crônica (implantada por longos períodos) pode ser um dispositivo de estimulação passiva ativado pela luz sem uma fonte de energia externa ou um dispositivo de estimulação ativo do qual os estímulos possam

ser controlados por software (Weiland e Humayun, 2014). Os dispositivos geralmente são classificados em próteses epirretinianas, sub-retinianas e supracoroidais, de acordo com a posição intraocular onde os eletrodos estão localizados (Yue e cols., 2016; Bareket e cols., 2017).

Diante de todos os percalços para encontrar uma cura para a Retinose Pigmentar, o mais desafiador é encontrar, além de um princípio ativo que atue diretamente na cura, uma via de aplicação que seja capaz de atingir o alvo sem causar danos secundários.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Analisar a eficácia protetora do tratamento com colírio à base de moduladores do sistema endocanabinóide na retina de modelo murino de Retinose Pigmentar (rd10).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do tratamento tópico com antagonista do receptor CB2, AM630, na sobrevida dos fotorreceptores;
- Investigar o efeito do tratamento tópico com antagonista do receptor CB2, AM630, nas células microgliais da retina;
- Investigar o efeito do tratamento tópico com antagonista do receptor CB2, AM630, na funcionalidade da retina.
- Investigar o efeito do tratamento intravítreo com antagonista do receptor CB2, AM630, na sobrevida dos fotorreceptores;
- Investigar o efeito do tratamento intraperitoneal com bloqueador da enzima de degradação de endocanabinóide, N-Nonyl, na sobrevida dos fotorreceptores;
- Investigar o efeito do tratamento intraperitoneal com bloqueador da enzima de degradação de endocanabinóide, N-Nonyl, na sobrevida dos fotorreceptores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação para sua execução da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 1464280219 de 2019.

3.1. ANIMAIS

Os camundongos da linhagem PDE6 $\beta^{rd10/rd10}$ (rd10), com mutação na subunidade β da fosfodiesterase 6, que acarreta na degeneração dos fotorreceptores, e da linhagem C57Black/6 (Black6), linhagem controle dos animais rd10 sem mutação, foram mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Neurobiologia da UFF, no Instituto de Biologia, com água e comida *ad libitum* e ciclo claro-escuro. Os animais foram usados nas idades pós-natal de 10 dias (P10), 13 dias (P13), 15 dias (P15), 17 dias (P17), 19 dias (P19), 21 dias (P21), 23 dias (P23), 25 dias (P25) e 30 dias (P30).

3.2. PREPARAÇÃO DO MATERIAL HISTOLÓGICO

De acordo com as diferentes idades, os animais foram eutanasiados por inalação de uma sobredose de isoflurano, seguido de deslocamento da cervical. Após certificada a eutanásia pela perda do reflexo caudal, os olhos foram retirados por enucleação com auxílio de uma pinça curva cirúrgica e de uma lâmina de bisturi nº 11 (Embramac), quando necessário. Os olhos foram embebidos em solução de Paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 (PFA 4%) por 5 minutos. Com o auxílio de uma lupa binocular, duas pinças cirúrgicas nº 5 (Sigma) e uma tesoura de iridectomia, foi retirada a córnea e o cristalino de cada olho e o globo ocular foi mantido em PFA 4% por 1 hora para fixação do tecido. Por fim, os olhos foram lavados três vezes com Tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 e mantidos nessa solução a 4° C até o dia anterior ao congelamento.

Para a criopreservação do tecido foi utilizado um gradiente de sacarose de 10%, 20% e 30% diluída em Tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 onde os olhos foram mantidos *overnight* na concentração de 30%. No dia seguinte, os olhos foram submersos e orientados em meio de congelamento OCT por uma hora, seguido do congelamento em nitrogênio líquido. Os blocos contendo os olhos foram cortados no criostato, na espessura de 10 μ m e recolhidos em lâminas pré tratadas com Poli-L-Lisina (200 μ g/ml). O material foi mantido em temperatura de -20° C até o momento de uso.

3.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As lâminas contendo os cortes histológicos dos olhos foram incubadas com Triton X-100 0,5% diluído em solução salina de fosfato 0,01M (PBS 1x) (NaCl, KCl, Na₂PO₄.7H₂O e KH₂PO₄) por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de duas lavagens com PBS 1x por cinco minutos cada em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) 1% diluída em PBS 1x durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após a retirada do BSA 1%, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 1) diluídos em BSA 1% *overnight* na estufa ou geladeira, a depender do anticorpo utilizado.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1x por cinco minutos e aplicado o anticorpo secundário (Tabela 2) diluído em BSA 1% por duas horas a temperatura ambiente. Após esse período, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com DAPI (4,6'-diamino-2-fenil-indol) na concentração de 20mg/ml por 3 minutos. Por fim, os cortes serão lavados uma vez com PBS 1x por cinco minutos e as lâminas montadas com n-propil-galato e lamínula, seguidas de vedação. Os controles negativos receberam somente o anticorpo secundário fluorescente e DAPI. As lâminas foram armazenadas a temperatura de -20°C para posterior análise.

Tabela 1: Anticorpos primários

Anticorpo Primário	Hospedeiro	Diluição	Fabricante	Número de Catálogo
Anti-recoverina	Coelho	1:1000	Merck Millipore	AB5585
Anti-Iba1	Coelho	1:600	Wako	019-19741

Tabela 2: Anticorpos secundários

Anticorpo Secundário	Hospedeiro	Diluição	Fabricante	Número de Catálogo
Anti-coelho Alexa 488	Coelho	1:200	Invitrogen	A11008
Anti-coelho Alexa 568	Coelho	1:600	Invitrogen	A11011

3.4. TRATAMENTO OFTÁLMICO

Os animais rd10 receberam 10 μ L do anestésico inalatório isoflurano, seguido de aplicação de contenção ao redor do pescoço para evitar a remoção imediata do colírio. O colírio foi administrado no volume de 10 μ L por olho, através de uma pipeta automática. Os fármacos utilizados foram o antagonista do receptor CB2, [6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3-yl](4-metoxifenil)-metanone (AM630 - Cayman Chemicals cat#10006974) e o inibidor da enzima FAAH, 4-(n-nonyl) ácido benzeno-borônico (N-nonyl - Cayman Chemicals cat# 13140).

O AM630 foi reconstituído primeiramente em DMSO e mantido em estoque a -20°C, e para a solução de uso foi diluído em PBS 0,01M, nas seguintes concentrações: 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, no qual os animais controle (CTR) receberam uma dose do veículo DMSO:PBS, na concentração final de 1% de DMSO.

O N-nonyl foi reconstituído em uma solução oftálmica descrita na Tabela 3, na dose de 250mg/mL. A solução oftálmica foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica coordenado pelo Prof. Lucio Cabral Mendes. O tratamento teve início em animais com P14, sendo aplicado o colírio diariamente aproximadamente no mesmo horário, até P18 ou P22 pós-natal e análise após 24 horas da última aplicação do colírio (P19 ou P23).

Tabela 3: Composição oftálmica da formulação controle e do fármaco N-nonyl.

Componentes	Formulação controle	N-Nonyl
	% (g/mL)	% (g/mL)
Poloxâmero 407	10	10
Sulfato de condroitina	3,0	3,0
Carboximetilcelulose	0,25	0,25
Hialuronato de sódio	0,20	0,20
Galato de propila	0,10	0,10
Cloreto de benzalcônio	0,01	0,01
Tampão fosfato salino (q.s.p.)	100	100
4-(n-nonyl) ácido benzeno-borônico	-	0,25

3.5. TRATAMENTO INTRAVÍTREO

Os animais rd10 receberam anestesia com ketamina e xilazina e após a perda do reflexo caudal, os camundongos foram posicionados em uma lupa binocular e com o auxílio de uma seringa Hamilton #95, calibre 26S foi realizada uma injeção intravítrea (iv) no volume de 1 μ L por olho. O fármaco AM630 foi reconstituído primeiramente em DMSO e mantido em estoque a -20°C, na concentração de 1mM. Para a solução de uso, o fármaco foi diluído em PBS 0,01M, em nas concentrações de 3uM, 10uM, 30uM e 100uM, no qual os animais CTR receberam uma dose do veículo DMSO:PBS na concentração de 1% de DMSO.

O tratamento teve início em animais na idade de P17 ou P18 de forma única, sendo eutanasiados em P19.

3.6. TRATAMENTO INTRAPERITONEAL

As injeções foram realizadas na região peritoneal com seringa de insulina BD Ultrafine de 50 unidades (6 mm de comprimento – calibre 31G de 0,25 mm) após assepsia local com álcool etílico 70°. Camundongos Rd10 receberam injeções intraperitoneais (ip) diárias de N-nonyl, em um volume fixo de 50 µl na dose de 6 mg/kg. O N-nonyl foi reconstituído em DMSO e diluído em PBS. Os animais CTR receberam injeções ip de 8% de DMSO diluído em PBS 0,01M. O tratamento ip começou com 14 dias pós-natal até os 18 dias pós-natal. Após a última injeção, a retina foi analisada 24 horas depois (P19).

3.7. TESTE CAIXA CLARO-ESCURO

A caixa claro-escuro contém dois compartimentos de 15cm x 15cm x 25cm cada, um escuro (0 Lx) e um iluminado (95 Lx), interligados por uma abertura divisória de 5cm x 5cm (Xiang e cols., 2018). Uma câmera é posicionada na parte superior da caixa para filmar e gravar todo o caminho do animal no compartimento claro. O animal foi previamente ambientado na sala experimental por uma hora a fim de diminuir o nível de estresse relacionado ao deslocamento e novos odores. Após a ambientação, o animal foi colocado individualmente no lado claro da caixa e analisado por 5 minutos (300s). Após o tempo estipulado, foi registrado o tempo total de permanência no lado claro e subtraído do tempo total de permanência na caixa, obtendo, portanto, uma relação de tempo no compartimento claro pelo tempo no compartimento escuro. Considerando que locais altamente iluminados representam uma ameaça natural aos roedores, que são animais de hábitos noturnos, eles possuem a tendência natural de passar mais tempo no lado escuro da caixa. Em animais que não conseguem enxergar, a distinção de claro e escuro será prejudicada. O teste é considerado, portanto, um teste de acuidade visual.

3.8. PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ELISA

Os animais foram eutanasiados com sobredose de isoflurano, seus olhos foram retirados e mantidos em solução de PBS 0,01M, onde houve a dissecação da retina, recolhimento da amostra em 200µL de PBS 0,01M e posterior dissociação mecânica realizada por uma seringa de insulina. A amostra foi estocada em freezer -80°C.

3.9. ELISA

O procedimento foi dividido em três dias. No primeiro dia, a placa de 96 poços foi pré-tratada com anticorpo de captura específico para a citocina TNF- α , vedada e incubada overnight a 4°C.

No segundo dia, o conteúdo da placa foi desprezado e a placa lavada quatro vezes com PBS-Tween-80 0,05%, seguido de bloqueio de ligações inespecíficas de 30 minutos a 1 hora com PBS/BSA 1% pH 7,2-7,4 em temperatura ambiente. Após essa etapa, a placa foi lavada quatro vezes com PBS-Tween 80 0,05%, adicionado o conteúdo das amostras e a curva padrão da citocina e incubado overnight a 4°C.

No terceiro dia a placa foi lavada quatro vezes com PBS-Tween 80 0,05%, aplicado o anticorpo de detecção e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Após este procedimento, a placa foi lavada seis vezes com PBS-Tween 80 0,05%, incubada com Streptavidina-HRP [1:200] e vedada por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a placa foi lavada oito vezes com PBS-Tween 80 0,05%, aplicada a solução de TMB por 20 minutos (podendo variar de acordo com a cor da reação) a temperatura ambiente e, por fim, aplicado a solução de parada H₂SO₄. A densidade óptica (OD) da placa foi realizada pelo leitor de microplaca no comprimento de onda de 562nm.

3.10. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS

Para a quantificação de células Recoverina positivas (+), levando em consideração a diferença no curso da degeneração entre as áreas periféricas e centrais da retina nos animais rd10, foram fotografados quatro campos diferentes de cada olho, totalizando oito campos por ponto experimental. Os campos centrais foram considerados como áreas adjacentes ao nervo óptico (a aproximadamente 100 μ m do nervo óptico) e os campos periféricos, a 100 μ m da região mais externa da retina. A contagem de células marcadas para Recoverina foi realizada no comprimento de retina de 120 μ m.

As células microgliais estão presentes irregularmente ao longo da retina e seus corpos celulares podem estar em diferentes planos de visão. Portanto, a quantificação de células positivas para Iba-1 foi realizada diretamente sob o microscópio com ampliação de 400x. O número de células microgliais marcadas com Iba-1 foi quantificado tanto na retina total (camadas nuclear e plexiforme) quanto na CNE separadamente, ao longo de todo o comprimento da retina.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Todas as amostras com três ou mais experimentos independentes foram aceitas no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram apresentadas como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados com dois experimentos ou menos foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP). Os dados de número de células recoverinas positivas na CNE, microglias e caixa claro-escuro foram analisados pelo one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas, empregando o pós teste de Dunnett. O teste t de Student não pareado com correção de Welch foi aplicado na análise comparativa de C57Bl/6 e rd10 na quantificação de TNF α . Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

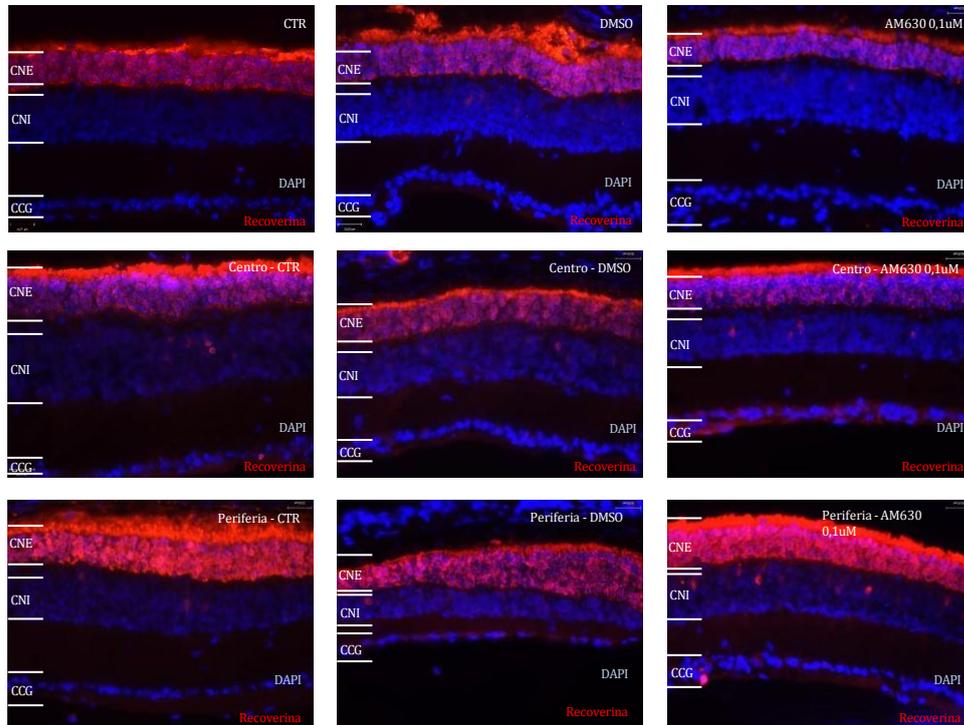
4. RESULTADOS

Dados prévios do grupo identificaram um aumento da expressão do receptor canabinóide do tipo 2 (CB2) em animais rd10 durante o período de degeneração dos fotorreceptores (P19 a P30), analisado através de intensidade de fluorescência (SENOS, 2016). Nesse mesmo período foi verificado também o aumento do infiltrado microglial, que atua diretamente na progressão da doença (SENOS, 2018). Dessa forma, nossa hipótese era de que a manipulação do sistema endocanabinoide pudesse alterar o curso da doença. Além disso, o objetivo era desenvolver uma via de administração pouco invasiva. Para comprovar essa hipótese, realizamos o tratamento tópico com dois fármacos distintos, um antagonista do receptor CB2 e um bloqueador da enzima de degradação da Anandamida, seguido de análises histológicas e moleculares.

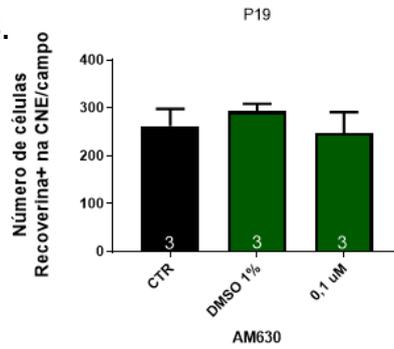
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 (AM630) NO NÚMERO DE CÉLULAS FOTORRECEPTORAS EM ANIMAIS RD10 COM 19 DIAS PÓS-NATAL (P19) E 23 DIAS PÓS-NATAL (P23)

O tratamento com colírio de AM630 teve início em animais com 14 dias pós-natal (P14), sendo aplicado diariamente até 18 dias pós-natal (P18), com a eutanásia do animal em 19 dias pós-natal (P19). A figura 6A mostra as fotomicrografias do experimento. A análise da contagem de células recoverina positivas em animais com 19 dias pós-natal mostrou na figura 6B que o tratamento não alterou o número de fotorreceptores na retina total (CTR = $262,6 \pm 35,7$ / DMSO = $293,1 \pm 15,1$ / AM630 0,1uM = $247,7 \pm 43,3$). Visto que nosso modelo apresenta diferença na degeneração ao longo da retina, foram realizadas análises em separado do efeito na retina central (Figura 6C) e na periférica (Figura 6D), não sendo constatada nenhuma alteração significativa no número de fotorreceptores em ambas as regiões (centro: CTR = $260,6 \pm 18,3$ / DMSO = $283,4 \pm 22,9$ / AM630 0,1uM = $237,2 \pm 40,9$; periferia: CTR = $264,7 \pm 55,6$ / DMSO = $303,0 \pm 12,8$ / AM630 0,1uM = $258,1 \pm 46,4$).

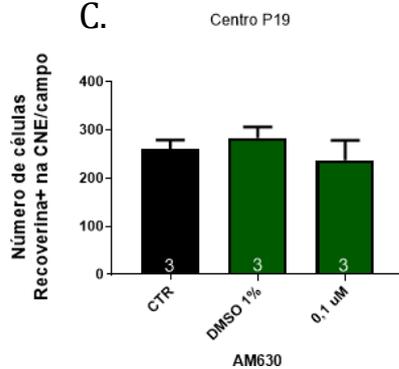
A.



B.



C.



D.

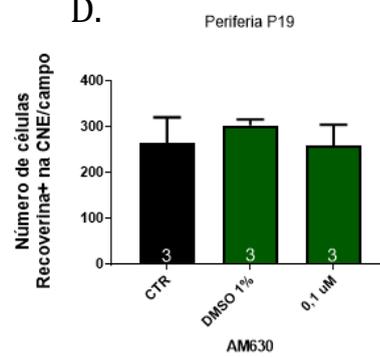
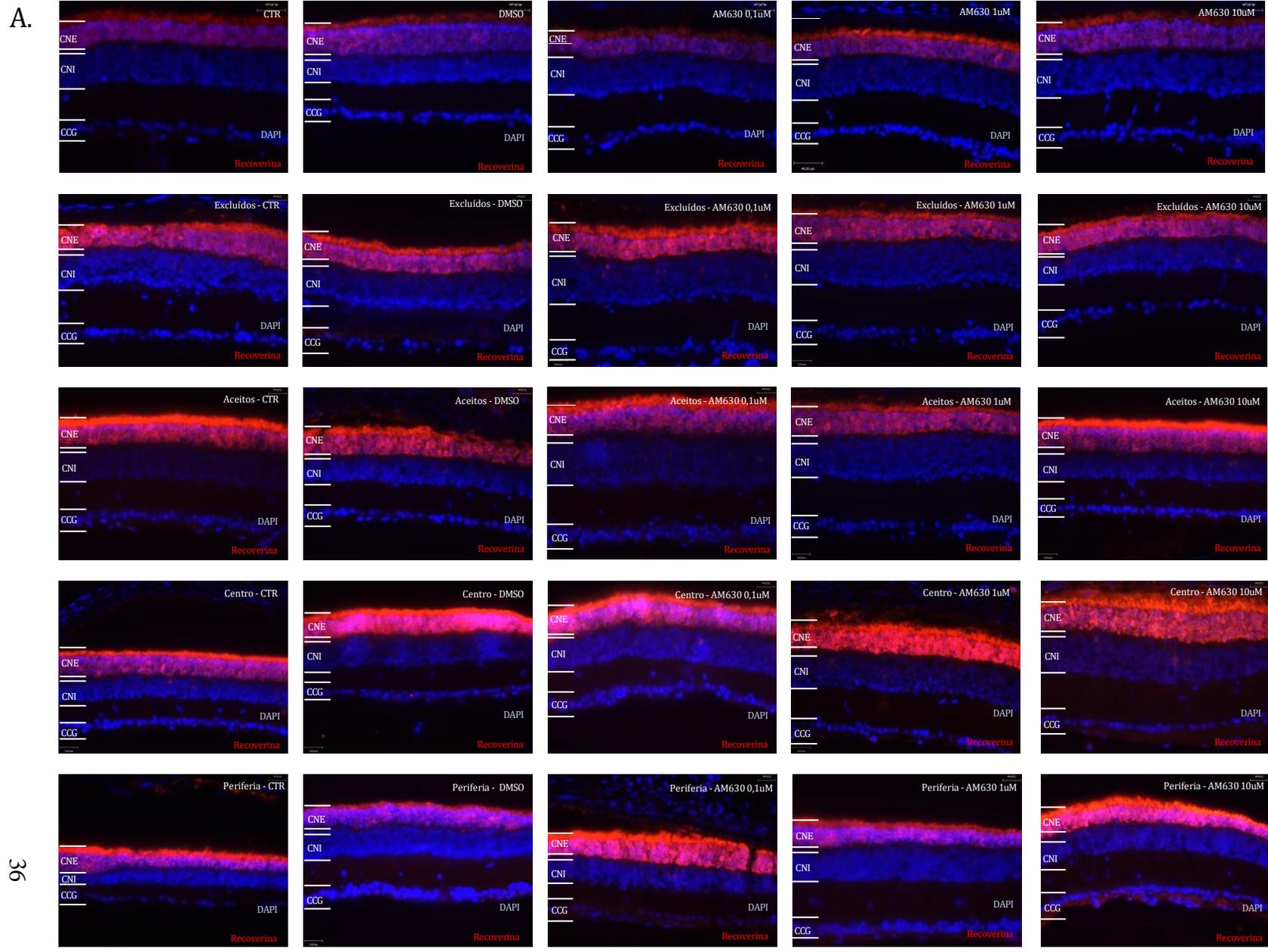


Figura 6. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630. (A) Fotomicrografias dos

experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 não alterou o número de fotorreceptores na CNE quando comparado ao seu controle (CTR). (C) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 não altera o número de fotorreceptores no centro da retina quando comparado ao seu controle (CTR). (D) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 não altera o número de fotorreceptores na periferia da retina quando comparado ao seu controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes.

Dados prévios do laboratório mostraram que em P23 a microglia tem um pico de infiltração na retina (Senos, 2018). Sendo assim, avaliamos a idade de P23. O tratamento com AM630 teve início em animais P14, sendo aplicado diariamente até P22, com a eutanásia do animal em P23. A figura 7A mostra as fotomicrografias do experimento. A análise da contagem de células recoverina positivas em animais com 23 dias pós-natal mostrou, na figura 7B que o tratamento não alterou o número de fotorreceptores em nenhuma das concentrações testadas na retina como um todo (CTR = $190,9 \pm 22,59$ / DMSO = $232,3 \pm 21,64$ / AM630 0,1uM = $222,8 \pm 17,25$ / AM630 1uM = $234,0 \pm 18,01$ / AM630 10uM = $241,1 \pm 23,88$). Porém, após uma análise mais aprofundada foi possível identificar que os tratamentos apresentavam dois comportamentos distintos a depender da ninhada utilizada. Em parte dos tratamentos, a quantificação do número de fotorreceptores em animais P23 parece não mostrar alteração nessas células em qualquer concentração testada (CTR = $235,1 \pm 50,48$ / DMSO = $292,1 \pm 44,56$ / AM630 0,1uM = $191,5 \pm 26,59$ / AM630 1uM = $228,8$ / AM630 10uM = $262,0 \pm 43,60$) (Figura 7C), enquanto em outra parte dos experimentos, o tratamento mostrou um aumento no número de fotorreceptores nas três concentrações utilizadas de AM630 0,1uM, 1uM e 10uM (CTR = $161,3 \pm 8,71$ / DMSO = $195,0 \pm 8,72$ / AM630 0,1uM = $246,2 \pm 16,12$ / AM630 1uM = $235,1 \pm 22,02$ / AM630 10uM = $230,6 \pm 30,38$) (Figura 7D). O efeito observado na figura 7C foi separado em retina central e na retina periférica, onde o tratamento mostrou um aumento no número de fotorreceptores na concentração de 0,1uM na área central da retina (CTR = $136,8 \pm 8,27$ / DMSO = $165,5 \pm 12,57$ / 0.1uM = $224,9 \pm 16,36$ / 1uM = $187,9 \pm 27,97$ / 10uM = $194,7 \pm 26,40$) (Figura 7D) e ao analisar a área periférica, a mesma apresentou um aumento no número de fotorreceptores na concentração de 1uM (CTR = $185,8 \pm 13,60$ / DMSO = $224,5 \pm 9,86$ / 0.1uM = $267,5 \pm 16,01$ / 1uM = $282,3 \pm 29,53$ / 10uM = $266,5 \pm 41,35$) (Figura 7E).



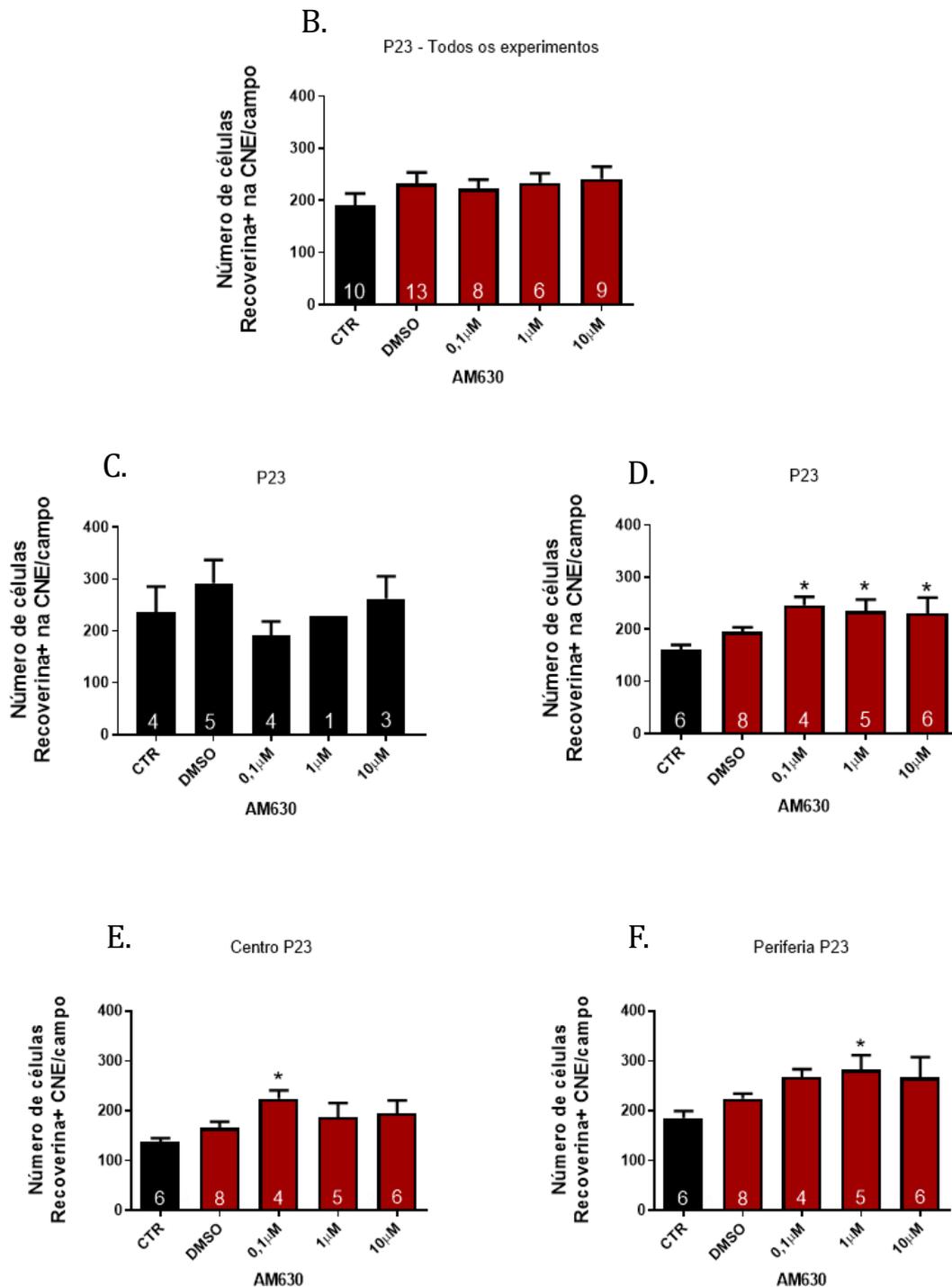


Figura 7. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630. (A) Fotomicrografias dos experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) O tratamento tópico com antagonista CB2 não altera o número de fotorreceptores na CNE comparado ao seu respectivo controle (CTR). (C) O tratamento tópico com antagonista CB2 não altera o número de fotorreceptores na CNE parte dos

experimentos comparado ao seu respectivo controle (CTR). (D) O tratamento tópico com antagonista CB2 aumenta o número de fotorreceptores na CNE em todas as concentrações quando comparado ao seu respectivo controle (CTR) (E) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P23 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 aumenta o número de fotorreceptores no centro da retina na concentração de 0,1uM quando comparado ao seu respectivo controle (CTR) (F) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P23 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 aumenta o número de fotorreceptores na periferia da retina na concentração de 1uM quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM ou DP de experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 (AM630) NAS CÉLULAS MICROGLIAIS EM ANIMAIS RD10 COM 23 DIAS PÓS-NATAL (P23)

Baseado em dados prévios do grupo que indicam um aumento do infiltrado microglial nas idades tratadas (Senos, 2018) e sabendo que o receptor CB2 foi primeiramente descrito em células do sistema imune e que o mesmo está presente em células microgliais (Klein, 2005; Chiurchiù e cols., 2015), foi realizada a imunohistoquímica para IBA-1, marcador de células microgliais. Foram consideradas microglias infiltrantes as que estavam presentes na camada nuclear externa, com sua característica amebóides. A análise da contagem de células IBA-1 positivas em animais com 23 dias pós-natal mostrou que o tratamento não alterou o número de microglias infiltrantes na camada nuclear externa quando comparado ao seu controle (CTR = 75.0 ± 6.73 / DMSO = 62.57 ± 6.23 / AM630 0.1uM = 53.33 ± 10.14 / 1uM = 56.00 ± 11.92 / 10uM = 53.33 ± 11.31) (Figura 8A), mas diminui o número de microglias totais na retina na concentração de 1uM e 10uM quando comparado ao seu controle (CTR = 147.7 ± 17.61 / DMSO = 111.4 ± 8.77 / 0.1uM = 127.8 ± 33.08 / 1uM = 92.80 ± 9.22 / 10uM = 91.83 ± 5.44) (Figura 8B).

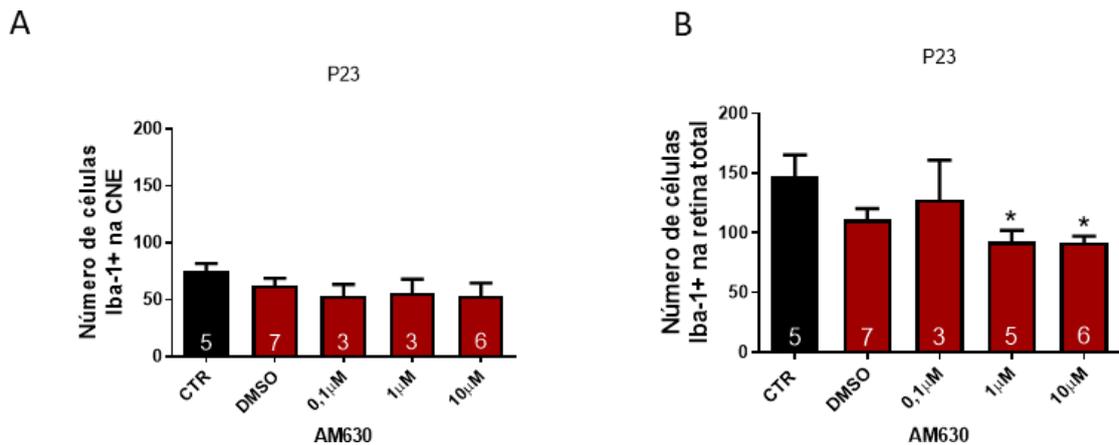


Figura 8. Quantificação de células Iba-1+ na retina murina de animais rd10 com 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630. (A) Quantificação de células Iba-1+ na idade de P23 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 não teve efeito no número de microglias na CNE quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (B) Quantificação de células Iba-1+ na idade de P23 mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 diminui o número de microglias na retina total nas concentrações de 1uM e 10uM quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM de experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 (AM630) NA LIBERAÇÃO DE TNF α NA RETINA EM ANIMAIS RD10 COM 23 DIAS PÓS-NATAL (P23)

Sabendo que uma das citocinas pró-inflamatórias liberadas no processo de infiltração microglial na retina é o TNF α (Olivares-González e cols., 2021), optamos por analisá-la durante o tratamento. Para isso, realizamos antes a ontogênese dessa citocina nos modelos animais C57Black/6 e rd10, a fim de caracterizar a liberação da mesma na fisiopatologia do nosso modelo. A liberação de TNF α em animais Black6 aumenta gradualmente ao longo do desenvolvimento da retina, com picos em P19, P25 e P30 (P10 = 216.4 \pm 30.14/ P13 = 218.0 \pm 37.37/ P15 = 281.4 \pm 73.85/ P17 = 357.5 \pm 37.48/ P19 =

436.2±56.48/ P21 = 240.5±17.45/ P23= 336.4±16.34/ P25 = 786.2±26.23/ P30= 498.2±53.36) (Figura 9A), padrão que se repete nos animais rd10, principalmente durante o período de degeneração (P10 = 258.9±41.82/ P13 = 186.8±6.33/ P15 = 233.3±39.92/ P17 = 176.1±32.74/ P19 = 179.5±63.00/ P21 = 301.4±38.75/ P23= 305.2±46.00/ P25 = 413.3±48.81/ P30= 529.1±20.48) (Figura 9B). Ao comparar a ontogênese da citocina entre os modelos, é possível identificar que apesar de aumentar gradativamente ao longo do desenvolvimento, liberação da mesma diminui no período que antecede os picos da degeneração (P17, P19 e P25) em animais rd10 quando comparados ao controle (Figura 9C).

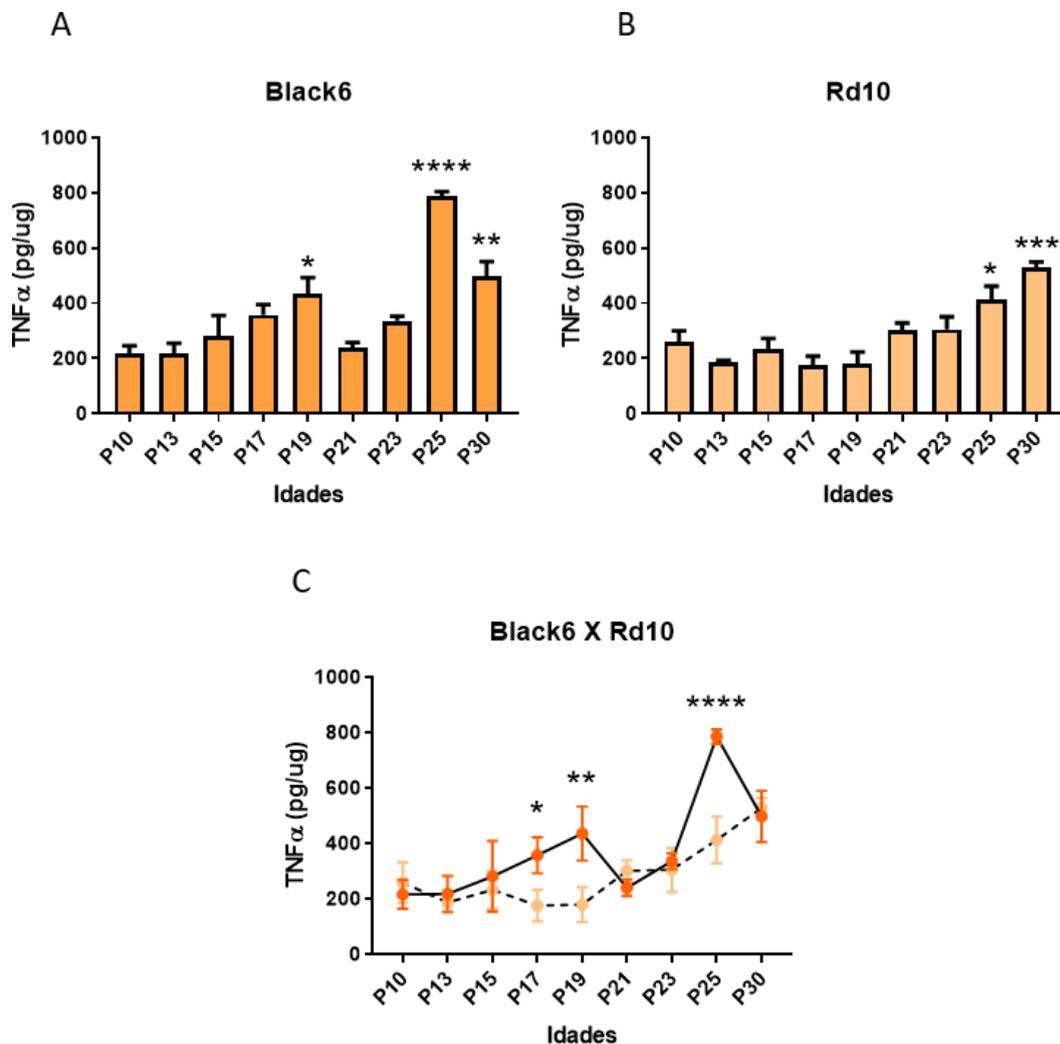


Figura 9. Quantificação da citocina TNFα na ontogênese de animais C57Black/6 e rd10. (A) Quantificação da liberação de citocina TNFα durante a ontogênese de animais Black6 aumenta ao longo do desenvolvimento da retina, nas idades de P19, P25 e P30, quando comparado a P10. (n=3) (B) Quantificação da liberação de citocina TNFα durante a ontogênese de animais rd10 aumenta com o desenvolvimento da retina nas idades de P25 e P30 quando comparado a P10. (n=3) (C) Quantificação da liberação de citocina TNFα durante a ontogênese de animais Black6 e rd10, de forma comparativa, mostra diminuição na liberação da mesma em P17, P19 e P25 em

animais rd10 quando comparado aos animais Black6. Linha contínua representa animais Black6 e linha pontilhada representa animais rd10. Resultados apresentam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$.

Ao analisarmos essa citocina nos animais tratados com AM630 em P23, percebemos uma tendência a aumentar a liberação de citocina na concentração de 0,1 μ M quando comparado aos animais controle (CTR = 194,9/ DMSO = 179,1 \pm 93,41/ 0,1 μ M = 417,5 \pm 353,0) (Figura 10A).

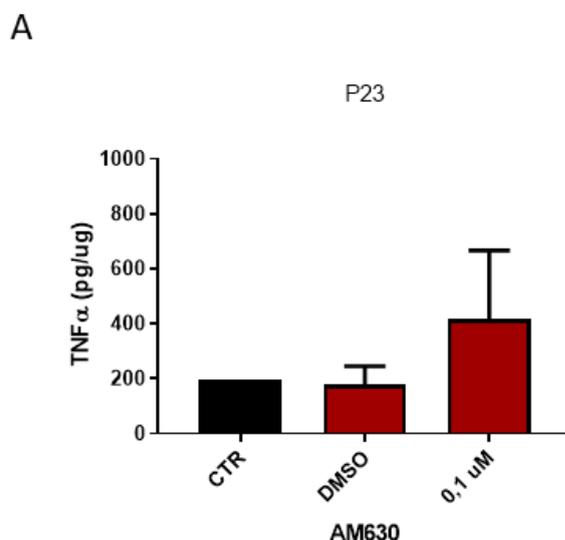


Figura 10. Quantificação da citocina TNF α no tratamento tópico com AM630 em animais com 23 dias pós-natal. (A) Quantificação da liberação de citocina TNF α no tratamento com AM630 parece aumentar a liberação de TNF α na concentração de 0,1 μ M, quando comparado ao controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm DP de 1 a 2 experimentos independentes.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO CONTENDO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 (AM630) NA FUNCIONALIDADE DA RETINA EM ANIMAIS RD10 COM 19 DIAS PÓS-NATAL (P19) E 23 DIAS PÓS-NATAL (P23)

Diante do aumento do número de fotorreceptores e da diminuição do número de microglías após o tratamento, realizamos um teste de acuidade visual para identificar se essas alterações refletem na funcionalidade da retina. O teste realizado foi o da caixa claro-escuro, onde o animal é colocado em um ambiente claro (95 Lx) e durante cinco

minutos é avaliada a opção dele por permanecer no ambiente aversivo (claro) ou optar pelo ambiente seguro (escuro).

Os animais tratados com AM630, analisados aos 19 dias pós-natal, parecem não apresentar alteração nos padrões de funcionalidade da retina, sugerindo que a acuidade visual não se altera com o tratamento nesta idade quando comparado aos animais rd10 sem tratamento (C57Black/6= 113.0 ± 10.66 / CTR = 136.5 ± 37.48 / DMSO = 124.5 ± 36.06 / 0,1uM = 147.0 ± 89.10) (Figura 11A). Animais tratados com AM630, analisados aos 23 dias pós-natal também não apresentam alteração na acuidade visual com o tratamento quando comparado aos animais rd10 sem tratamento (C57Black/6= 113.0 ± 10.66 / CTR = 90.33 ± 32.94 / DMSO = 102.0 ± 35.56 / 0,1uM = 144.8 ± 18.52) (Figura 11B).

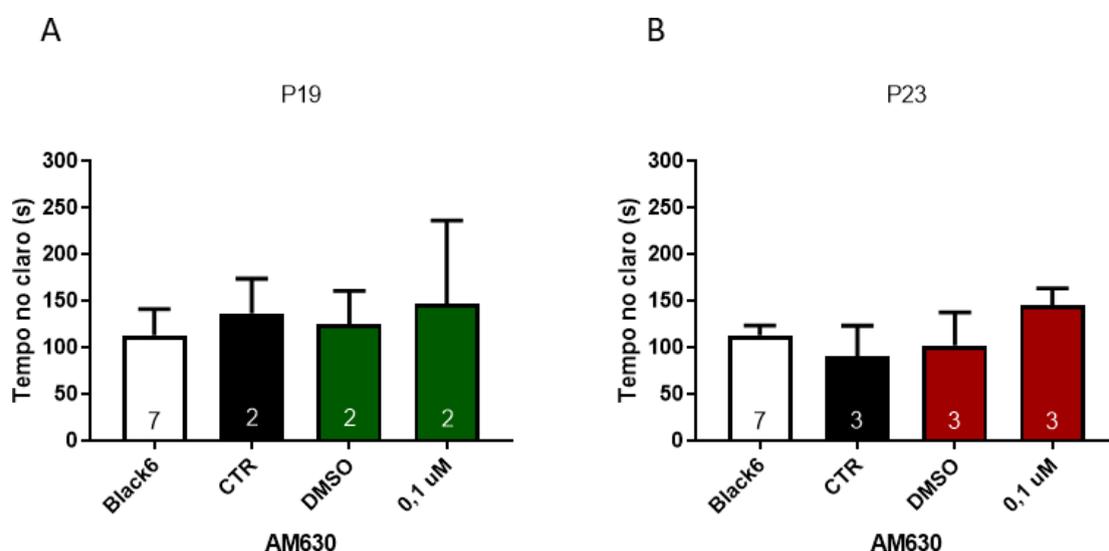


Figura 11. Quantificação do tempo gasto no campo claro no teste de acuidade visual caixa claro-escuro em animais rd10 com 19 e 23 dias pós-natal após tratamento tópico com AM630. (A) Quantificação de tempo passado, em segundos, no campo claro em animais rd10 com 19 dias pós-natal mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 parece não ter efeito na acuidade visual quando comparado ao seu respectivo controle (CTR) (B) Quantificação de tempo passado, em segundos, no campo claro em animais rd10 com 23 dias pós-natal mostra que o tratamento tópico com antagonista CB2 não tem efeito na acuidade visual quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Animais C57Black/6 com idade entre P30 e P60 utilizados como controle do experimento. Resultados apresentam a média \pm EPM ou DP de 2 a 3 experimentos independentes.

Após análise dos resultados obtidos pelo tratamento crônico com colírio contendo o antagonista do receptor canabinóide do tipo 2, AM630, um importante questionamento foi levantado: O tratamento apresentou esse efeito parcial pela heterogeneidade da doença ou pela via de administração escolhida? Sendo assim, iniciamos o teste das possíveis hipóteses.

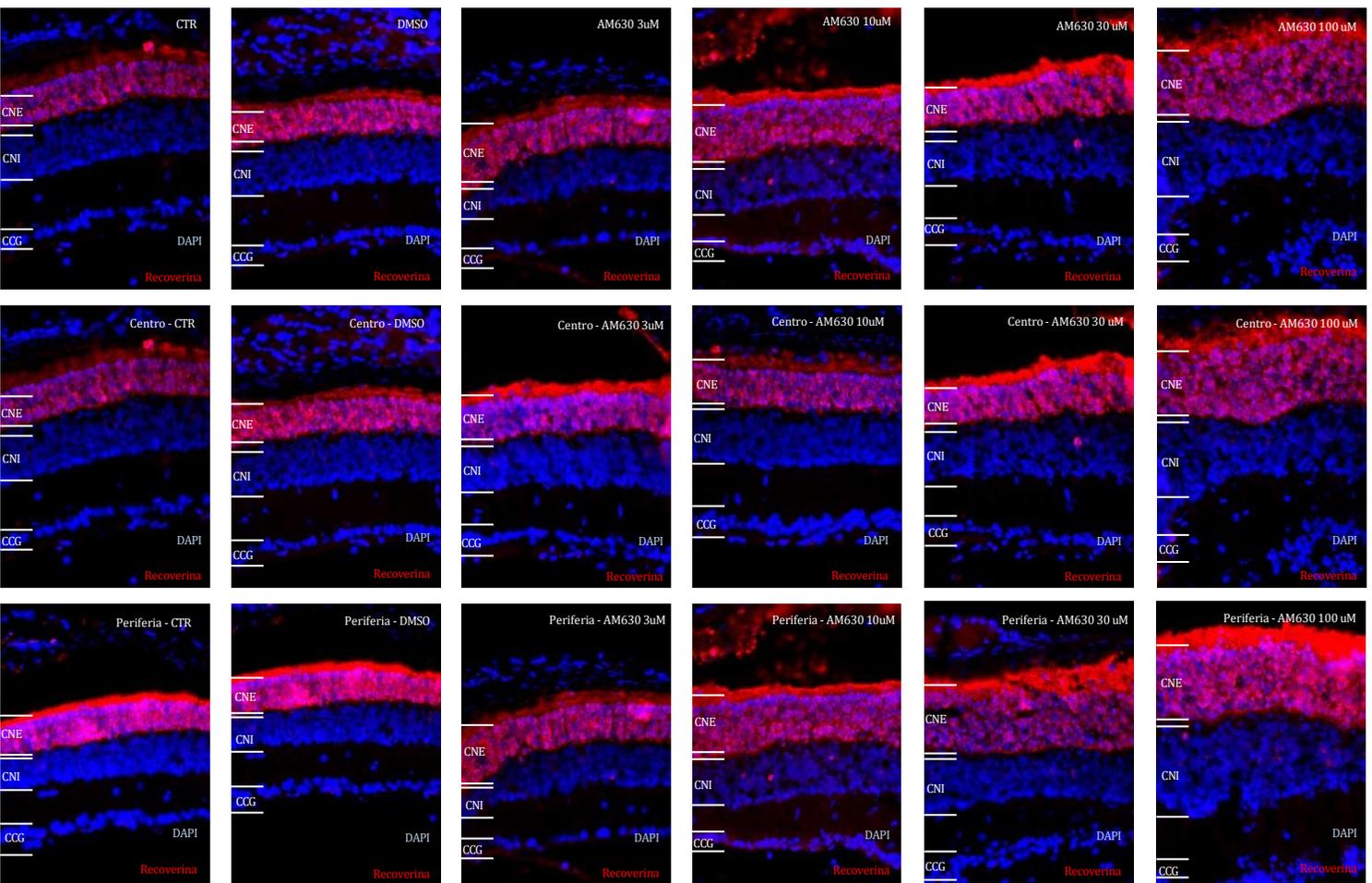
4.5 EFEITO DO ANTAGONISMO DO RECEPTOR CANABINÓIDE DO TIPO 2 EM ANIMAIS RD10 COM 19 DIAS PÓS-NATAL (P19) APÓS TRATAMENTO AGUDO COM INJEÇÃO INTRAVÍTREA

Os dados previamente obtidos a respeito do tratamento diário com o colírio não foram completamente conclusivos, o que nos levou a pensar em uma alternativa de tratamento que mudasse a via de administração. Testamos, então, a funcionalidade do mesmo fármaco, AM630, por uma outra via de administração utilizada pelo laboratório, a injeção intravítrea.

O tratamento com injeção intravítrea teve início em animais com 17 ou 18 dias pós-natal (P17 ou P18), sendo aplicado o AM630 uma única vez, até sua eutanásia com 19 dias pós-natal (P19). Dados prévios mostraram que com 17 dias pós-natal os animais ainda não têm um aumento significativo da infiltração microglial e com 19 dias pós-natal já há um aumento significativo do número de microglias (SENOS, 2018), deixando um intervalo de 2 dias para acontecimentos que levem ao aumento microglial. Por esse motivo, as idades de P17 e P18 foram escolhidas para início do tratamento, e posterior análise com 19 dias pós-natal, analisando um efeito considerado a curto prazo (24 horas) e a médio prazo (48 horas). Após a eutanásia, os olhos foram processados para histologia conforme descrito anteriormente e realizada a imunofluorescência, também descrita anteriormente, para Recoverina (marcador de fotorreceptor).

A figura 12A mostra as fotomicrografias do experimento. A análise da contagem de células recoverina positivas em animais com 19 dias pós-natal, com tratamento em P17, mostrou uma tendência do AM630 em aumentar o número de fotorreceptores na retina inteira, principalmente na concentração de 100uM (CTR= 336.6±79.15/ DMSO= 373.5±47.08/ 3uM= 420.3/ 10uM = 443.8/30uM = 529.6±393.2/ 100uM = 572.4±94.30) (Figura 12B). O padrão de resposta parece não ser visto no centro da retina (CTR= 321.9±58.22/ DMSO= 379.5±48.12/ 3uM= 450.5/ 10uM = 539.5/30uM = 521.7±359.0/

100uM = 516.3±70.91) (Figura 12C) mas se repete na periferia da retina (CTR= 351.2±103.1/ DMSO= 367.4±47.20/ 3uM= 390.0/ 10uM = 348.0/30uM = 537.6±427.4/ 100uM = 628.5±131.2) (Figura 12D).



A.

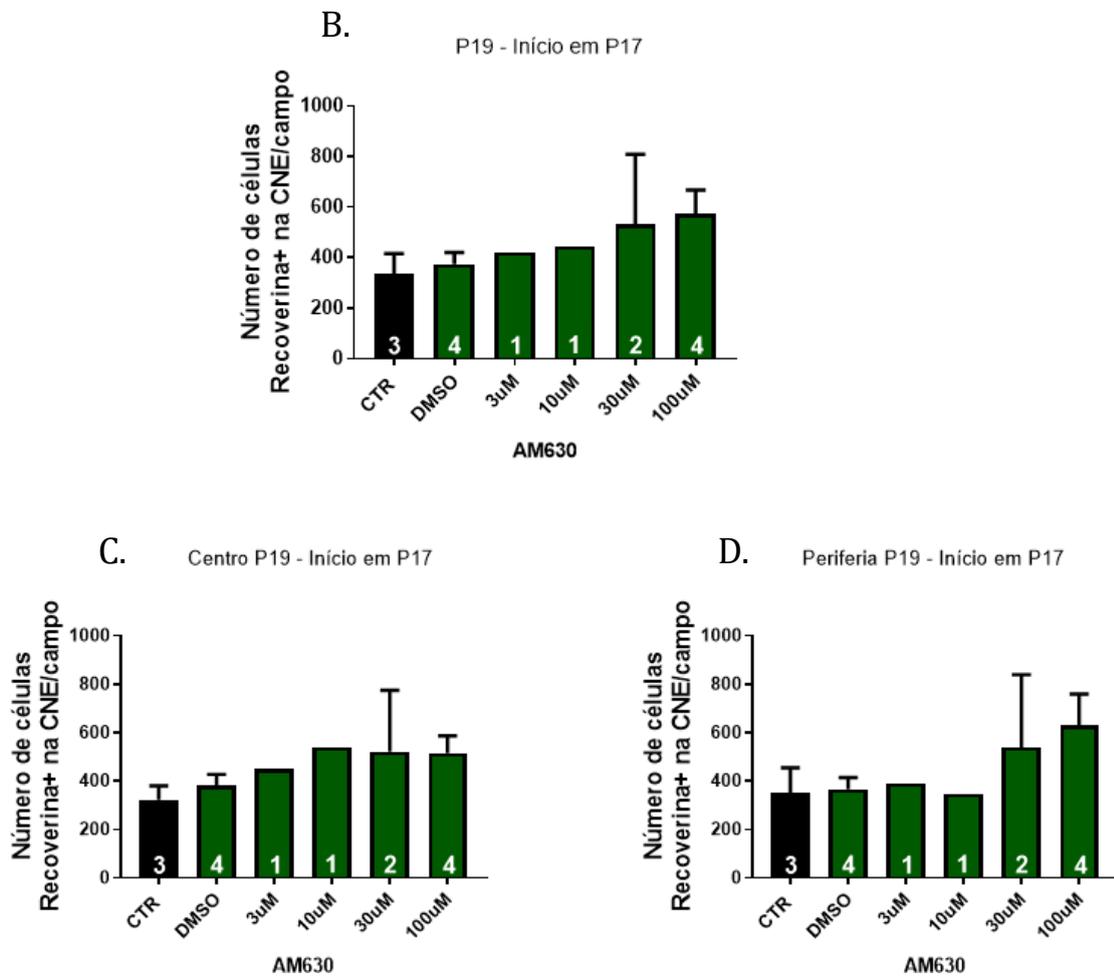
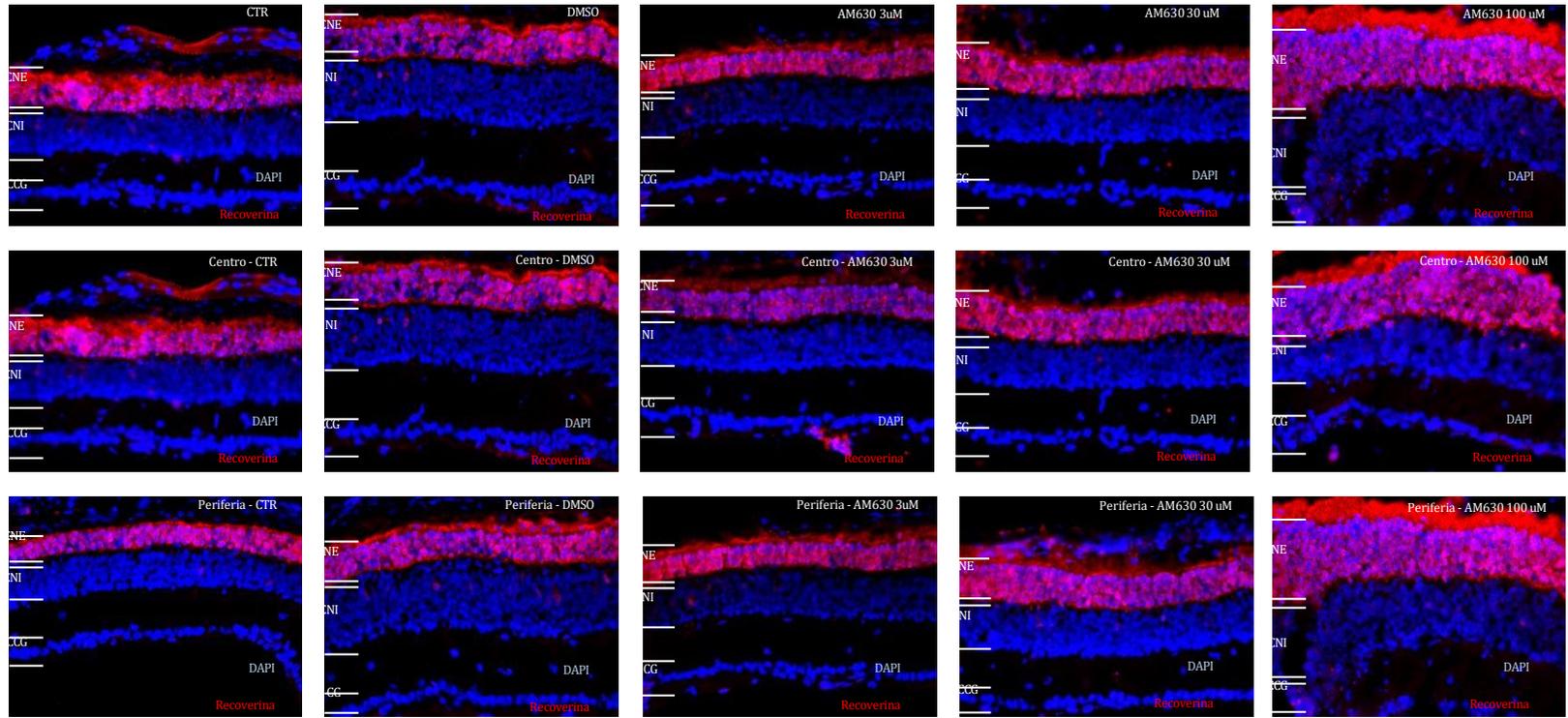


Figura 12. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intravítreo agudo com AM630 iniciado em P17. (A) Fotomicrografias dos experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19 mostra que, com o tratamento agudo em P17 com antagonista CB2 parece aumentar o número de fotorreceptores na camada nuclear externa, principalmente com 100uM quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (C) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento feito em P17, mostra que, com o tratamento agudo com antagonista CB2 não parece alterar o número de fotorreceptores no centro da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (D) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento feito em P17, mostra que, com o tratamento agudo com antagonista CB2 parece aumentar o número de fotorreceptores na periferia da retina, principalmente nas maiores concentrações de fármaco quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM ou DP de 1 a 4 experimentos independentes.

Ao analisar as células recoverina positivas em animais com 19 dias pós-natal, com tratamento em P18, o padrão visto com tratamento em P17 não parece se manter (Figura 13^a). O número de células recoverina positivas na retina total não parece se alterar quando comparado ao seu controle (CTR= 512.1±73.89/ DMSO= 571.9±276.4/ 3uM= 436.0/ 30uM = 569.9±120.3/ 100uM = 626.1±146.1) (Figura 13B). O mesmo padrão de resposta parece ser visto tanto no centro da retina (CTR= 504.0±28.28/ DMSO= 585.0±263.8/ 3uM= 380/ 30uM = 550.7±145.5/ 100uM = 625.2±133.1) (Figura 13C) quanto na periferia da retina (CTR= 520.0±119.5/ DMSO= 558.7±289.0/ 3uM= 492.0/ 30uM = 589.2±95.25/ 100uM = 627.0±159.1) (Figura 13D). Esses resultados são preliminares, é preciso aumentar o número de experimentos para ter um resultado conclusivo.

A.



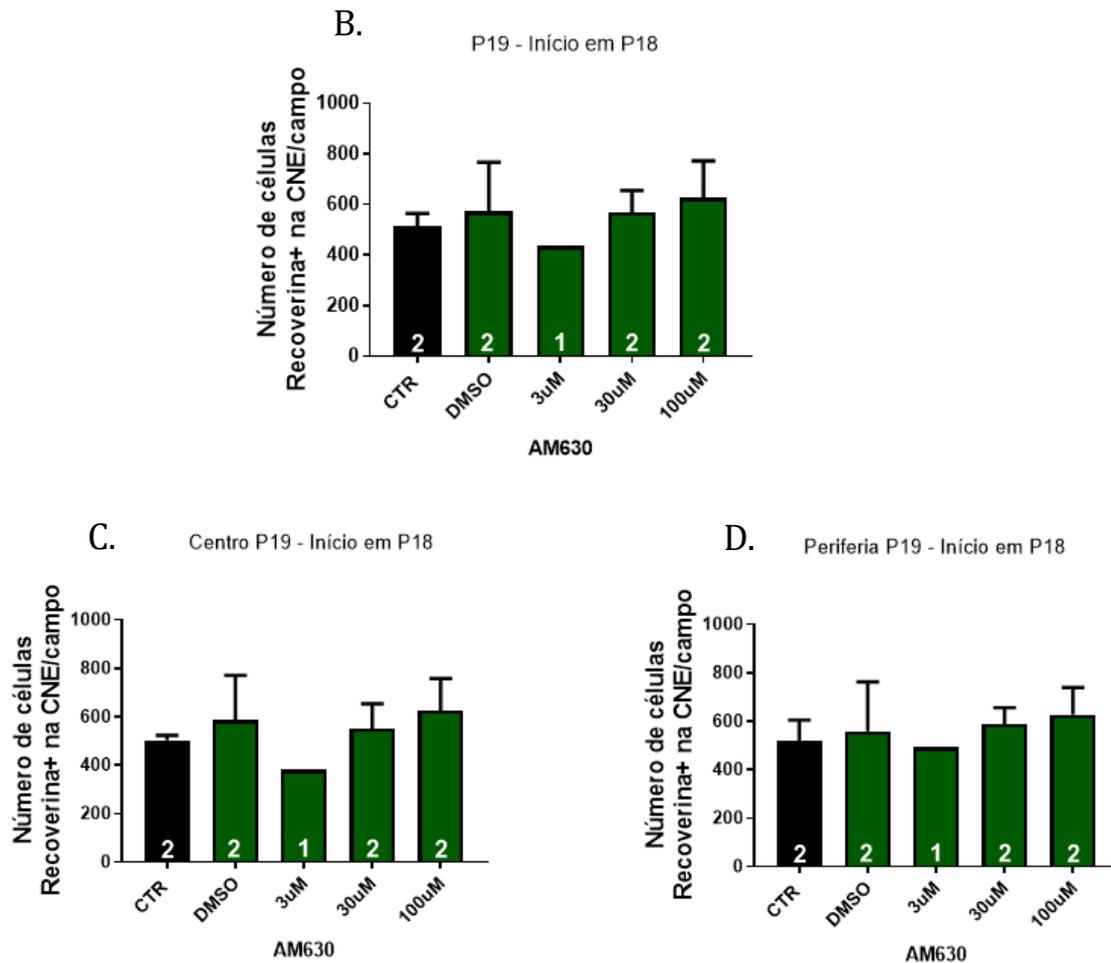


Figura 13. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intravítreo agudo com AM630 com início em P18. (A) Fotomicrografias dos experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19 mostra que, com o tratamento agudo em P18 com antagonista CB2 não parece alterar o número de fotorreceptores na CNE quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (C) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento feito em P18 não parece alterar o número de fotorreceptores na CNE no centro da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (D) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento feito em P18, mostra que não parece alterar o número de fotorreceptores na CNE na periferia da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm DP de 1 a 2 experimentos independentes.

4.6 EFEITO DO BLOQUEADOR DA FAAH EM ANIMAIS RD10 APÓS TRATAMENTO INTRAPERITONEAL CRÔNICO

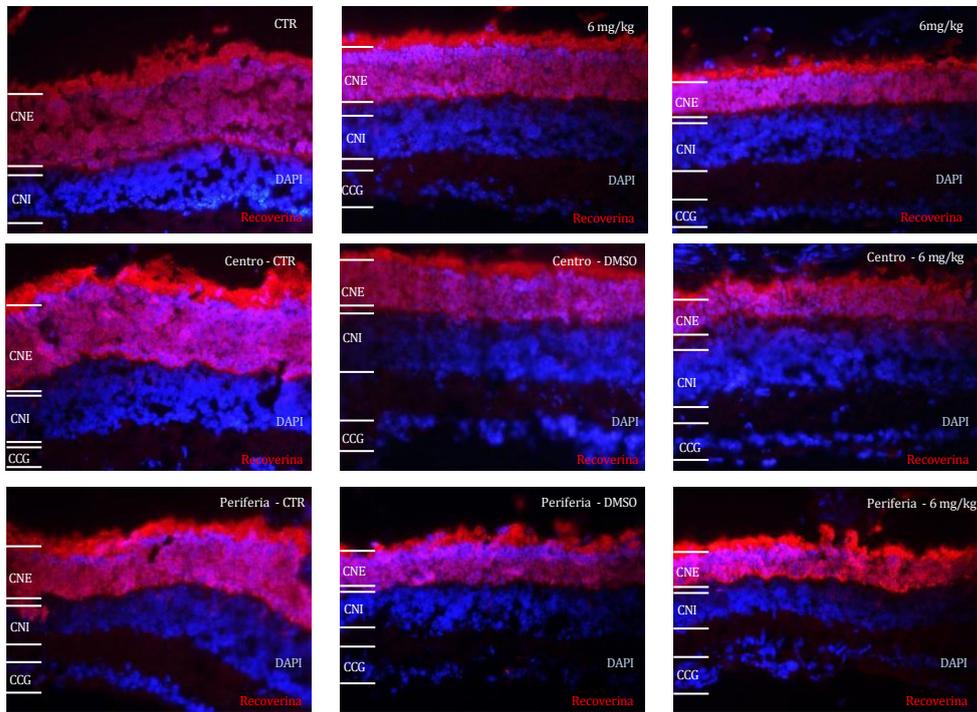
Em paralelo ao teste de uma nova via de administração, fizemos o teste de um novo fármaco, com a via de administração tópica e um veículo aprimorado. Dados prévios do laboratório mostraram que o tratamento intraperitoneal com URB597, inibidor da

FAAH, enzima de degradação da anandamida, aumenta o número de fotorreceptores nos animais rd10 tratados quando comparados ao controle nas idades de P19 e P25 (Magalhães, 2016).

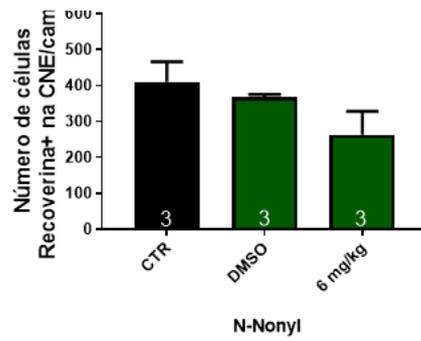
Dessa forma, utilizamos o N-Nonyl, um fármaco de valor mais acessível e vendido em maior quantidade, cuja função é a mesma que o URB597 (inibidor da FAAH – enzima de degradação da anandamida), para testar a nova formulação oftálmica desenvolvida. Com esse novo fármaco fizemos dois experimentos, o primeiro para verificar se o N-Nonyl possui os mesmos efeitos que o URB597, analisando a sobrevida dos fotorreceptores, através de injeções intraperitoneais diárias numa concentração equivalente a utilizada do URB597 por Magalhães e colaboradores (Figuras 14) e o segundo utilizando a nova formulação do colírio, para testar o veículo de administração (Figura 15).

Para analisar a eficácia do fármaco foi realizado o tratamento intraperitoneal, com injeções diárias de N-Nonyl, iniciando em animais com 14 dias pós-natal (P14) e se estendendo até 18 dias pós-natal (P18), com eutanásia em 19 dias pós-natal (P19). A figura 14A mostra as fotomicrografias do experimento. O tratamento mostrou uma tendência a diminuição no número de células recoverina positivas na camada nuclear externa quando comparado aos animais controle (CTR= 410.1 ± 55.98 / DMSO= 367.6 ± 7.66 / 6mg/kg= 262.9 ± 65.09) (Figura 14B), tendência que se confirma quando analisado o número dessas células no centro da retina (CTR= 463.4 ± 61.59 / DMSO= 324.6 ± 13.22 / 6mg/kg= 244.7 ± 56.16) (Figura 14C). Ao analisar o número de células recoverina positivas na periferia da retina, foi identificada uma tendência a diminuição quando comparado aos animais controle (CTR= 383.1 ± 47.63 / DMSO= 279.7 ± 25.06 / N-Nonyl 6mg/kg= 281.1 ± 75.12) (Figura 14D). Apesar dessa aparente diminuição do número de células com o tratamento, o controle DMSO parece também apresentar uma tendência a diminuir o número de células, sendo necessário mais experimentos que comprovem esse resultado. Vale ressaltar que, para esse tratamento, a quantidade de DMSO injetado é de 8%, acima do utilizado pelos dados prévios do laboratório (Magalhães, 2020).

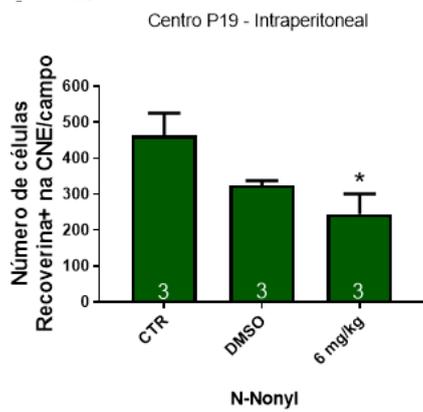
A.



B. P19 - Intraperitoneal



C.



D.

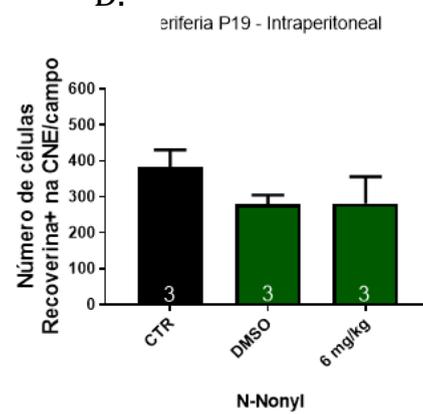


Figura 14. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento intraperitoneal com N-NONYL. (A) Fotomicrografias dos experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P14, mostra que o tratamento com N-nonyl parece diminuir o número de fotorreceptores na CNE quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (C) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P14, mostra que o tratamento com N-nonyl diminuiu o número de fotorreceptores no centro da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (D) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P15, mostra que o tratamento com N-nonyl parece diminuir o número de fotorreceptores na periferia da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$

4.7 EFEITO DO BLOQUEADOR DA FAAH EM ANIMAIS RD10

APÓS TRATAMENTO TÓPICO CRÔNICO

Identificado que o fármaco N-Nonyl parece possuir efeito quando utilizado via intraperitoneal, o próximo passo era o tratamento tópico com N-Nonyl para testar a via de administração.

O tratamento teve início em animais com 14 dias pós-natal (P14), se estendendo até 18 dias pós-natal (P18), com eutanásia com 19 dias pós-natal (P19), sendo aplicada a solução diariamente no animal. A figura 15A mostra as fotomicrografias do experimento. O tratamento tópico com N-Nonyl 0,25% parece não alterar o número de células recoverina positivas na camada nuclear externa quando comparado aos animais controle (CTR= 177.6 ± 29.69 / N=Nonyl= 242.6 ± 18.02) (Figura 15B), análise que se repete quando analisado o número dessas células no centro da retina (CTR= 175.6 ± 37.26 / N=Nonyl= 256.2 ± 46.26) (Figura 15C) e na periferia da retina (CTR= 179.7 ± 22.93 / N=Nonyl= 228.9 ± 20.35) (Figura 15D). É notável, quando comparado a experimentos realizados anteriormente, que a média do número de células, principalmente dos animais controle do experimento, estão significativamente mais baixos do que os vistos anteriormente. Uma vez que esses experimentos não possuem controle sem nenhuma interação, apenas o controle com veículo do tratamento, é impossível afirmar sequer uma tendência, uma vez que o possível efeito visualizado pode ser do próprio veículo.

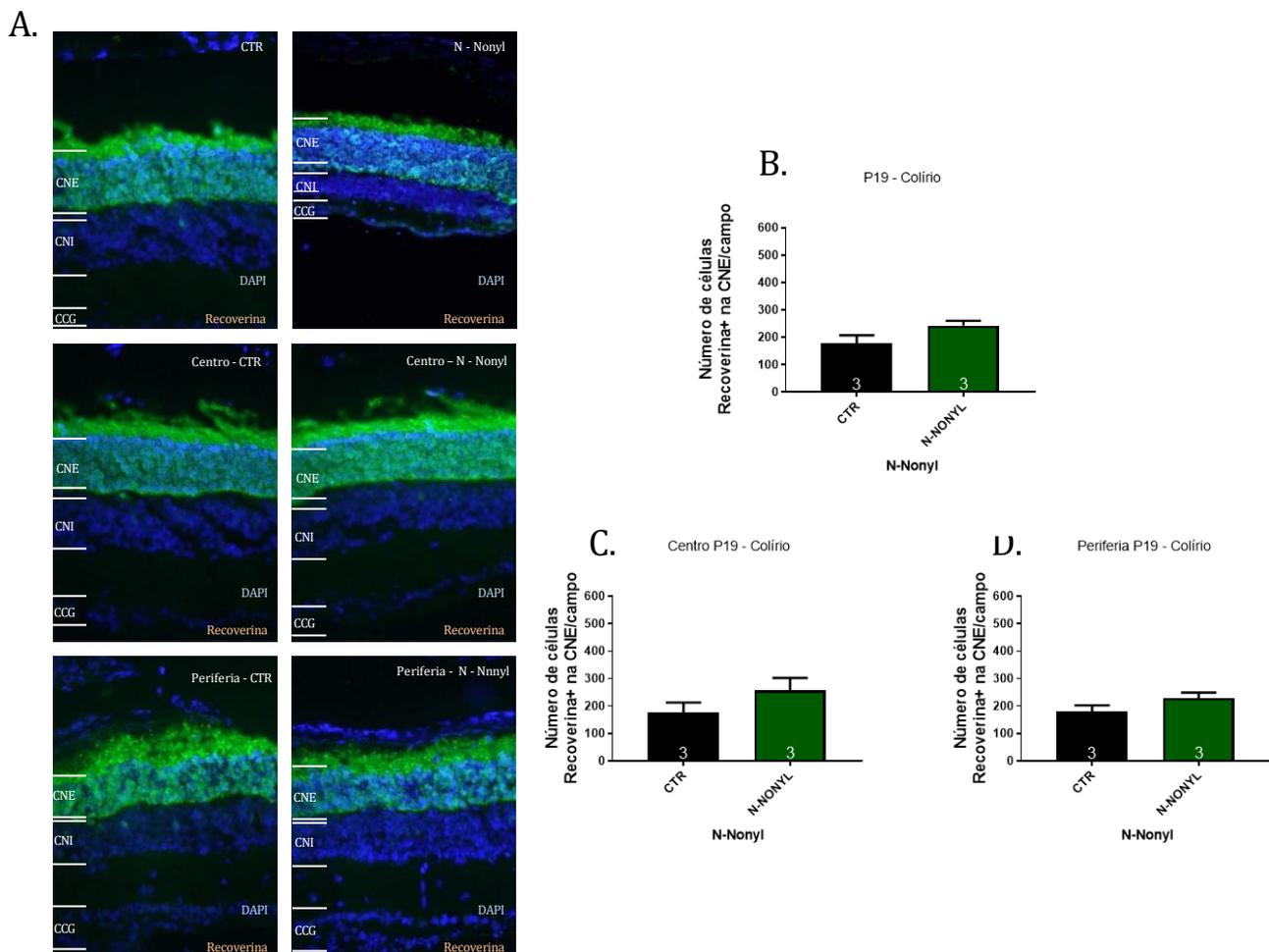


Figura 15. Quantificação de células Recoverina+ na retina murina de animais rd10 com 19 dias pós-natal após tratamento tópico com N-NONYL. (A) Fotomicrografias dos experimentos, DAPI em azul, Recoverina em vermelho. (B) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P14, mostra que o tratamento com N-nonyl parece aumentar o número de fotorreceptores na CNE quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (C) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P14, mostra que o tratamento com N-nonyl parece aumentar o número de fotorreceptores no centro da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). (D) Quantificação de células Recoverina+ na idade de P19, com tratamento iniciado em P15, mostra que o tratamento com N-nonyl parece aumentar o número de fotorreceptores na periferia da retina quando comparado ao seu respectivo controle (CTR). Resultados apresentam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

A literatura já mostrava, através dos trabalhos de Straiker e colaboradores (1999), a expressão do receptor CB1 e por Bouchard e colaboradores (2015) a expressão do receptor CB2 na retina murina, mas apenas em camundongos adultos, não havendo relatos sobre a presença desses receptores na retina murina de animais com menos de 30 dias pós-natal. Sendo assim, resultados prévios do grupo mostraram pela primeira vez a expressão de receptores canabinóides clássicos na retina de um modelo murino espontâneo de retinose pigmentar e seu background genético, o camundongo C57black/6. As idades utilizadas para as análises foram de P3 até P30, de forma que abrangesse todo o período de degeneração dos fotorreceptores (Senos, 2016). Essas análises destacaram que em períodos importantes da degeneração dos fotorreceptores, os receptores canabinóides se encontram alterados. Esse resultado corrobora com dados citados anteriormente, nos quais em meio a processos degenerativos, o sistema endocanabinoide apresenta-se desregulado (Nucci e cols., 2007; Wei; Wang; Wang, 2009; Maccarone e cols., 2016).

Uma provável explicação para a alteração na expressão desses receptores poderia ser a presença de um infiltrado microglial, que já foi demonstrado acontecer no modelo rd10 e promover a fagocitose dos fotorreceptores (Klein, 2005; Peng e cols., 2014; Chiurchiù e cols., 2015; Zhao e cols., 2015). Essa análise foi feita e foi identificado um aumento no número de microglias na retina que coincide com o período de aumento na expressão do receptor CB2 (Senos, 2018). As células da microglia expressam o receptor CB2 e sua ativação pode promover inibição da ativação microglial (Ehrhart e cols., 2005).

As pesquisas utilizando moléculas do sistema canabinoide como um agente terapêutico de retinopatias degenerativas acrescentaram uma nova forma de intervenção para prevenir morte celular, porém, na área da retinose pigmentar o seu uso é recente (Lax e cols., 2014; Chen e cols., 2018). Os dados publicados por Lax e colaboradores (2014) e Chen e colaboradores (2018) nortearam os nossos experimentos e, junto com dados prévios do grupo justificam nossa escolha de um fármaco que atuasse no sistema endocanabinóide, nesses receptores que estavam desregulados durante o período de degeneração.

A escolha, então, foi pelo AM630, um antagonista do receptor CB2 amplamente descrito na literatura. Além disso, a fisiopatologia da linhagem rd10 mostra que o padrão de degeneração, já descrito na literatura, apresenta uma degeneração primeiro na área central e depois na periférica da retina (Gargini e cols., 2007), o que embasa nossas análises. Ainda é desconhecido o motivo pelo qual as células do centro degeneram antes, porém uma hipótese seria uma expressão diferenciada de proteínas pelos fotorreceptores do centro que os tornariam mais susceptíveis a mutação da enzima fosfodiesterase.

Como a luz é um dos agravantes que contribui para a degeneração dos fotorreceptores (Berkowitz e cols., 2018), iniciamos nossas análises na idade de P14 (dia posterior a abertura dos olhos desses animais) e terminamos em dois dias diferentes, em P19 e em P23.

Ao analisarmos, após tratamento tópico com AM630, a idade de P19 não foi identificada nenhuma alteração no número de fotorreceptores. Essa idade foi descrita por Magalhães e colaboradores (2020) como a idade de início do processo de degeneração desse tipo celular nos animais rd10, sendo assim, é possível que o tratamento ainda não apresente efeito por ser uma idade ainda precoce da degeneração.

O padrão se repete ao analisar a idade de P23, não sendo identificada nenhuma alteração no número de fotorreceptores. Porém, ao separar em dois grupos a idade de P23, não foi vista nenhuma alteração no número de fotorreceptores em parte dos experimentos, enquanto na outra parte foi visto um aumento no número de fotorreceptores, seja no centro, seja na periferia da retina.

Em condições fisiológicas, a microglia do sistema nervoso central atua de forma neuroprotetora, liberando fatores anti-inflamatórios (Streit, 2002). A distribuição e organização da microglia nas camadas da retina encontra-se alterada em diversos estados patológicos (Cuenca e cols., 2014; Kezic e cols., 2013). Os endocanabinoides clássicos (AEA e 2-AG) foram previamente descritos como moduladores da resposta glial frente a um estímulo inflamatório (Krishnan; Chatterjee, 2012). Na retina de camundongos rd10, a microglia é capaz de proliferar e migrar para a camada de fotorreceptores durante a segunda semana pós-natal (Peng e cols., 2014; Roche e cols., 2016). Trabalhos demonstram que a microglia possui um importante papel durante a degeneração da retina, ainda que sendo contraditório se de forma favorável (Peng e cols., 2014) ou desfavorável (Ferrermaatrín e cols., 2015) à degeneração. Analisamos, então, a infiltração microglial na

CNE durante o tratamento com o colírio contendo AM630, que não apresentou alteração, diferente do número total de microglias na retina, que apresentou uma redução significativa. Assim sendo, é possível concluir que houve uma diminuição no recrutamento da microglia e/ou sua proliferação na retina, mas não houve diminuição na infiltração da mesma na CNE. O receptor CB2 pode atuar nas células da microglia e outras células imunes invasoras, controlando sua resposta inflamatória em termos de migração celular, produção de citocinas ou ainda alterando seu fenótipo (Franklin e cols., 2003; Atwood e cols., 2010; Malfitano e cols., 2014; Aghazadeh e cols., 2016).

Já foi visto que canabinóides atuam em células gliais, na liberação de moléculas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF- α e NO (Molina-Holgado e cols., 1997; 2002; Shohami e cols., 1997; Puffenbarger e cols., 2000; Cabral e cols., 2001), ou anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 (Klein e cols., 2000) e que as propriedades anti-inflamatórias dos agonistas dos receptores canabinóides são expressas pela ativação dos receptores CB2 (Klein e Newton, 2007; Romero-Sandoval e cols., 2009; Correa e cols., 2010; Hsieh e cols., 2011). Dessa forma, diante da análise dos dados obtidos, é possível sugerir que o aumento na expressão do receptor CB2 durante o processo de neuroinflamação pode ser uma alternativa da microglia ou dos fotorreceptores de alterar o estado inflamatório da região. Sendo assim, como alterações no fenótipo microglial podem ser vistas ao analisar citocinas inflamatórias, decidimos analisar a liberação de TNF α .

Ao analisar a expressão de TNF α durante o desenvolvimento da retina, entre P10 e P30, é possível notar um padrão semelhante em ambos os modelos animais, Black6 e rd10, com um aumento na expressão dessa citocina em períodos mais tardios do desenvolvimento. Esse padrão de aumento de citocinas inflamatórias é conhecido pelo seu papel no refinamento sináptico (Al-Gayyar e cols., 2013). No entanto, ao fazer uma análise comparativa entre os modelos, é possível notar uma diminuição significativa de TNF α nas idades de P17, P19 e P25. Essas idades são correspondentes a idades consideradas importantes no período de degeneração, sendo P17 uma idade antecessora ao início da degeneração (P19) e P25 o pico degenerativo nesse modelo. Sendo assim, a sugestão é de que haja uma redução na liberação de TNF α em períodos críticos para a morte dos fotorreceptores como uma tentativa de retardar essa perda neuronal na doença, uma vez que TNF α está envolvido em processos pró-inflamatórios.

Uma vez analisada a presença de TNF α ao longo do desenvolvimento, foi analisada também os níveis de TNF α após o tratamento com AM630. Segundo Klein e

Newton (2007), Romero-Sandoval e colaboradores (2009), Correa e colaboradores (2010) e Hsieh e colaboradores (2011), a ativação dos receptores CB2 resulta em redução de citocinas pró-inflamatórias e direcionamento para aquisição de um fenótipo anti-inflamatório (Ehrhart e cols., 2005). Com o antagonismo do receptor CB2, é possível notar uma tendência ao aumento da liberação de TNF α . Esses dados parecem contraditórios quando comparados com o aumento do número de fotorreceptores e diminuição do número de microglias totais, mas, uma vez que o microambiente inflamatório causado pela morte gradual dos fotorreceptores acelera a progressão da doença (Zhao e cols., 2015), o aumento da liberação de TNF α pode representar uma forma de acelerar a morte de fotorreceptores já comprometidos a fim de diminuir os níveis inflamatórios do microambiente a longo prazo.

Para verificar se essas alterações a nível molecular e celular teriam impacto também na funcionalidade retiniana, realizamos um teste de comportamento visual baseado no trabalho de Xiang e colaboradores de 2018. Os animais foram colocados em uma caixa com 2 compartimentos (claro e escuro) interligados, a sua capacidade de detectar o estímulo luminoso foi gravado por 5 minutos (300s) e em seguida foi quantificado o seu tempo de permanência na área iluminada. Por serem animais noturnos, os camundongos tendem a dar preferência a ambientes menos iluminados, portanto é possível estudar o nível de atividade retiniana de acordo com o tempo gasto no compartimento iluminado. Nosso protocolo experimental levou em consideração a ação prejudicial do estímulo luminoso, assim, começamos o tratamento no momento em que os animais abriam os olhos (P14) e finalizamos ou em P18, com eutanásia em P19, ou em P22 com eutanásia em P23. Não foi identificada nenhuma alteração na capacidade visual desses animais nem em P19 nem em P23. Com esse resultado é possível sugerir duas hipóteses: a primeira é de que o estímulo aversivo não foi forte o suficiente, pois também não há alteração quando comparado aos animais controle C57Black/6; a segunda é de que o tratamento, apesar de apresentar melhora a nível celular e molecular, essa recuperação não tem reflexo funcionalmente.

Apesar de alguns resultados se mostrarem favoráveis a nossa hipótese, a dúvida deixada no experimento inicial, onde o tratamento tópico com AM630 aumentou parcialmente o número de fotorreceptores nos fez questionar sobre o experimento. Será que a diferença entre os experimentos seria pela resposta independente de cada ninhada, ou se o veículo utilizado não estava sendo eficaz na entrega do fármaco. Sendo assim, trabalhamos para testar as duas hipóteses.

Nosso primeiro teste foi alterar a via de administração, a fim de analisar a eficácia do fármaco. Objetivando um resultado menos demorado, optamos pelo uso da injeção intravítrea. A administração intravítrea garante maior disponibilidade farmacológica ao tecido retiniano. O tratamento foi agudo, iniciando em P17 ou P18 e sendo analisado em P19. Essas idades foram escolhidas pois, de acordo com Magalhães (2020), na fisiopatologia do modelo rd10, o número de fotorreceptores começa a diminuir significativamente a partir de P19, mas nas áreas centrais, a diminuição começa em P17 (Magalhães e cols., 2020), e de acordo com Senos (2018), o número de microglias aumenta significativamente a partir de P19, e a idade anterior analisada onde não houve alteração na quantidade desse tipo celular foi em P17 (Senos e cols., 2018). Assim sendo, o tratamento foi iniciado em P17 ou P18 para atender as duas possíveis idades prévias às alterações fisiopatológicas do modelo.

Esses testes mostraram uma tendência ao aumento do número de fotorreceptores após o tratamento i.v. com AM630 iniciado em P17, porém não é possível afirmar ainda pois são dados preliminares. Já o tratamento i.v. com AM630 iniciado em P18 não parece alterar o número de fotorreceptores na CNE. Ma e colaboradores (2015) demonstrou que uma desregulação nos componentes do sistema endocanabinoide é um possível sinal detectado pela microglia que induz sua ação inflamatória (Ma e cols., 2015). Dessa forma, antagonizar o receptor CB2 poderia ter um efeito neuroprotetor nos fotorreceptores através da ação indireta da microglia. Esses dados sugerem que o fármaco parece ter ação na sobrevivência dos fotorreceptores, mas é necessário aumentar o número de experimentos para ter um resultado conclusivo.

Se o fármaco parece funcionar, o próximo passo seria testar um veículo de aplicação aprimorado. Foi desenvolvida uma formulação oftálmica em parceria com o Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica coordenado pelo Prof. Lucio Cabral Mendes contendo um bloqueador da FAAH, enzima de degradação da AEA, o N-Nonyl. Mesmo com a nova formulação, era necessário testar o novo fármaco para saber se os efeitos encontrados por Magalhães e colaboradores (2020) se repetiriam, uma vez que o princípio de atuação do fármaco é o mesmo (Magalhães e cols., 2020). Dessa forma dois experimentos foram feitos, um para testar o fármaco - injeções intraperitoneais de N-Nonyl - e outro para testar a formulação oftálmica - tratamento tópico de N-Nonyl -.

O tratamento com injeções intraperitoneais com N-Nonyl mostrou uma tendência a diminuição do número de fotorreceptores na retina, diminuição significativa na área central da retina. Antagonizando o retratado em dados prévios do laboratório (Magalhães,

2016), o bloqueio da enzima de degradação da anandamida pelo N-nonyl possivelmente acelera o processo de degeneração dos fotorreceptores. Para afirmar essa teoria são necessários mais experimentos. Esses dados corroboram com os de Yates e colaboradores (2022) que indicam que, em animais Black6, a ativação dos receptores canabinoides por agonistas específicos e o bloqueio de enzimas de degradação como a FAAH podem causar prejuízos a nível celular, molecular e funcional da retina. Apesar de tratarmos animais com degeneração, nada impede que esse padrão se repita com esse fármaco (Yates e cols., 2022). É possível sugerir que, por se tratar de uma via de administração sistêmica, os efeitos sistêmicos do fármaco possam ter influenciado no resultado final na retina. Por outro lado, dada a alta concentração de DMSO administrada tanto como veículo quanto como tratamento, é possível sugerir uma diminuição do número de células pela morte por citotoxicidade (Galvão e cols., 2014).

O tratamento com a nova formulação oftálmica não mostrou alteração no número de células fotorreceptoras, tanto no centro quanto na periferia da retina. Diferentemente do observado pela via de administração intraperitoneal, por não ter um controle sem intervenção, é possível que qualquer observação possa ter sido causada pelo próprio veículo administrado. Talvez tenha um efeito acumulativo, tanto do fármaco como do próprio veículo, uma vez que a biodisponibilidade oferecida por essa via de administração é maior e bloqueie, além da AEA também o 2-AG e, sendo assim, possa ter um efeito somado ou sobreposto ao efeito do veículo. São necessários mais experimentos para que seja comprovada a eficácia da formulação e do fármaco.

6. CONCLUSÃO

- O antagonismo do receptor CB2, através do tratamento tópico, retarda a morte dos fotorreceptores e altera a ação microglial na retina, diminuindo o número microglias totais, apesar de não alterar as microglias na CNE;
- O antagonismo do receptor CB2, através do tratamento tópico, parece aumentar a liberação de TNF α ;
- O antagonismo do receptor CB2, através do tratamento intravítreo, parece retardar a morte dos fotorreceptores;
- Animais Black6 e rd10 possuem um aumento natural na expressão de TNF α com o desenvolvimento da retina;
- Todas as alterações celulares e moleculares apresentadas parecem não alterar a funcionalidade da retina.

7. REFERÊNCIAS

1. Alnawaiseh M. Optical coherence tomography angiography for evaluation of the microcirculation in systemic diseases. *Ophthalmologie*. 2019 Aug;116(8):712-713. German. doi: 10.1007/s00347-019-0913-3. PMID: 31396743.
2. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C, Hansen SH, Hansen HS. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1781(4):200-12. doi: 10.1016/j.bbali.2008.01.006. Epub 2008 Feb 12. PMID: 18316044.
3. BAEHR, W.; FREDERICK, J. M. (2009) Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision Research*, v. 49, n. 22, p. 2636–2652.
4. BAKER, Sheila A.; KEROV, Vasily. Photoreceptor inner and outer segments. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2013. ISSN 10635823.v. 72 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00007-6>
5. Bareket L, Barriga-Rivera A, Zapf MP, Lovell NH, Suaning GJ, 2017 Progress in artificial vision through suprachoroidal retinal implants. *J. Neural Eng* 14, 045002.
6. BARHOUM, R., MARTINEZ-NAVARRETE, G., CORROCHANO, S., GERMAIN, F., FERNANDEZ-SANCHEZ, L., DE LA ROSA, E.J., DE LA VILLA, P. and CUENCA, N. (2008). Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience* 155: 698-713.
7. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, et al. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa, 1993. *Arch Ophthalmol*. 111:761–772
8. BHARTI, K.; NGUYEN, MT.; SKUNTZ, S.; BERTUZZI, S.; ARNHEITER, H. (2006) The other pigment cell: Specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Research*, v. 19, n. 5, p. 380–394
9. BISOGNO, T.; HOWELL, F.; WILLIAMS, G.; MINASSI, A.; CASCIO, M. G.; LIGRESTI, A.; MATIAS, I.; SCHIANO-MORIELLO, A.; PAUL, P.; WILLIAMS, E. J.; GANGADHARAN, U.; HOBBS, C.; DI MARZO, V.; DOHERTY, P. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell. Biol.*, 163:463–468.
10. BLANKMAN, J. L.; SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2- arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.*, 14:1347–1356.
11. BOUCHARD, Jean-françois et al. Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain. [s. l.], v. 2016, 2016.

12. BOUSKILA J, BURKE MW, ZABOURI N, CASANOVA C, PTITO M, BOUCHARD JF. (2012) Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys. *Neuroscience*. 202:117–130.
13. Bradshaw HB, Walker JM. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. *Br J Pharmacol*. 2005 Feb;144(4):459-65. doi: 10.1038/sj.bjp.0706093. PMID: 15655504; PMCID: PMC1576036.
14. BREIVOGEL CS, GRIFFIN G, DI MARZO V, MARTIN BR. (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60:155–163.
15. BREIVOGEL CS, SIM-SELLEY LJ (2009). Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *International Review of Psychiatry* 21, 113–121.
16. BROWN, A. J. Novel cannabinoid receptors. (2007) *British Journal of Pharmacology*, v.152, n. 5, p. 567–575.
17. Bunker, C.H., Berson, E.L., Bromley, W.C., Hayes, R.P., Roderick, T.H., 1984. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *Am. J. Ophthalmol* 97, 357–365.
18. Burstein SH, Huang SM, Petros TJ, Rossetti RG, Walker JM, Zurier RB. Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonylglycine. *Biochem Pharmacol*. 2002 Oct 1;64(7):1147-50. doi: 10.1016/s0006-2952(02)01301-1. PMID: 12234618.
19. CARTER-DAWSON, L.; LAVAIL, M. M. (1979) Rods and Cones in the Mouse Retina. *Journal of Comparative Neurology*, v. 188, p. 263–272.
20. CASTANETO, Marisol S. et al. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, [s. l.], v. 144, p. 12–41, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005>
21. CÉCYRE, B., MONETTE M., BEUDJEKIAN L., CASANOVA C., BOUCHARD JF. (2014) Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8:150.
22. CEPKO, C. L. (2014) Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature Reviews Neuroscience*, 15:615–627.
23. CEPKO, C. L., AUSTIN, C. P., YANG, X., ALEXIADES, M. E EZZEDDINE, D. (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci US A*. 93:589-95.
24. Chadderton, N., Millington-Ward, S., Palfi, A., O'Reilly, M., Tuohy, G., Humphries, M.M., Li, T., Humphries, P., Kenna, P.F., Farrar, G.J., 2009. Improved retinal function in a mouse model of dominant retinitis pigmentosa following AAV-delivered gene therapy. *Mol. Ther.* 17, 593–599.

25. CHANG, B. HAWES NL, HURD RE, DAVISSON MT, NUSINOWITZ S, HECKENLIVELY JR. (2002) Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42:517–525.
26. CHANG, B., HAWES, N.L., PARDUE, M.T., GERMAN, A.M., HURD, R.E., DAVISSON, M.T., NUSINOWITZ, S., RENGARAJAN, K., BOYD, A.P., SIDNEY, S.S., PHILLIPS, M.J., STEWART, R.E., CHAUDHURY, R., NICKERSON, J.M., HECKENLIVELY, J.R., BOATRIGHT, J.H., (2007). Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vis. Res.* 47, 624e633.
27. COMITATO, A. SANGES D., ROSSI A., HUMPHRIES M.M., MARIGO V. (2014) Activation of Bax in three models of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55:3555–3562.
28. COMPAGNUCCI, C. DI SIENA S, BUSTAMANTE MB, DI GIACOMO D, DI TOMMASO M, MACCARRONE M, GRIMALDI P, SETTE C. (2013) Type-1 (CB1) Cannabinoid Receptor Promotes Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(1):e54271.
29. COSTA, J. L. G. P., MAIA. L.O., ORLANDI-MATTOS P., VILLARES, J.C., ESTEVES, M.A.F. (2011) Neurobiologia da Cannabis - do sistema endocanabinoide ao transtornos por uso de Cannabis. *J Bras Psiquiatr.* , v. 60
30. CRISTINO, Luigia; BISOGNO, Tiziana; DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 9–29, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
31. DAIGER SP, BOWNE SJ, SULLIVAN LS. (2007). Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 125: 151–158.
32. Daiger, S.P., Sullivan, L.S., Bowne, S.J., 2016. RetNet, the Retinal Information Network.
33. Dalkara, D., Goureau, O., Marazova, K., Sahel, J.A., 2016. Let there Be light: gene and cell therapy for blindness. *Hum. Gene Ther.* 27, 134–147.
34. Dalkara, D., Sahel, J.A., 2014. Gene therapy for inherited retinal degenerations. *C R. Biol.* 337, 185–192.
35. DEMB, Jonathan B.; SINGER, Joshua H. Functional Circuitry of the Retina. *Annual Review of Vision Science*, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 263–289, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035334>
36. Demontis GC, Aruta C, Comitato A, Marzo A De, Marigo V. Functional and molecular characterization of rod-like cells from retinal stem cells derived from the adult ciliary epithelium. *PLoS One*. 2012;7:e33338.

37. DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A. I.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34:605–613
38. DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258:1946–1949
39. DI MARZO, V.; BREIVOGEL, C. S.; TAO, Q.; BRIDGEN, D. T.; RAZDAN, R. K.; ZIMMER, A. M.; ZIMMER, A.; MARTIN, B. R. (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75:2434–2444.
40. DI MARZO, Vincenzo; BIFULCO, Maurizio; DE PETROCELLIS, Luciano. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1495>
41. DONOVAN, S. L.; DYER, M. A. (2005) Regulation of proliferation during central nervous system development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16:407–421.
42. DOWLING, J. E. (1970) Organization of vertebrate retinas. *Investigative ophthalmology*, 9:655.
43. DOWLING, J. E. (1970) Organization of vertebrate retinas. *Investigative ophthalmology*, 9:655.
44. DUFF, G. ARGAW A, CECYRE B, CHERIF H, TEA N, ZABOURI N, CASANOVA C, PTITO M, BOUCHARD JF. (2013). Cannabinoid Receptor CB2 Modulates Axon Guidance. *PLoS ONE*, 9;8(8):e70849, 2013.
45. DYER, M. A.; CEPKO, C. L. (2000) Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nature neuroscience*, 3:873–80.
46. EGGERS, E. D.; LUKASIEWICZ, P. D. (2011) Multiple pathways of inhibition shape bipolar cell responses in the retina. *Visual neuroscience*, 28:95–108.
47. EHRHART, J. et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) supresses microglial activation. *Journal of neuroinflammation*, v. 2, p. 29, 2005.
48. EL MANIRA, A. AND A. KYRIAKATOS. (2010) The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology (Bethesda)* 25:230-238.
49. ERSKINE, Lynda; HERRERA, Eloisa. Connecting the Retina to the Brain. [s. l.], n. December, p. 1–26, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1759091414562107>

50. EVANS, D. M.; JOHNSON, M. R.; HOWLETT, A C. (1992) Ca²⁺ -dependent release from rat brain of cannabinoid receptor binding activity. *Journal of neurochemistry*, v. 58, n. 2, p. 780–782.
51. FAHIM AT, DAIGER SP, WELEBER RG. (2013). Retinitis pigmentosa overview. In *GeneReviews* (ed. Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K), University of Washington, Seattle
52. FAN SF, YAZULLA S. (2003) Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci*. 20:177–188.
53. FAN SF, YAZULLA S. (2007) Retrograde endocannabinoid inhibition of goldfish retinal cones is mediated by 2-arachidonoyl glycerol. *Vis Neurosci*. 24:257–267
54. FENG Z, ALQARNI MH, YANG P, TONG Q, CHOWDHURY A, WANG L, XIE X-Q. (2014) Modeling molecular dynamics simulation, and mutation validation for structure of cannabinoid receptor 2 based on known crystal structures of GPCRs. *J Chem Inf Model.*, 54:2483–2499.
55. FERNANDES, A., MILLER-FLEMING, L., PAIS, T.F., (2014). Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3969e3985.
56. FERRER-MARTÍN, R. M. et al. Microglial activation promotes cell survival in organotypic cultures of postnatal mouse retinal explants. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. 1–20, 2015.
57. FISHMAN GA, JACOBSON SG, ALEXANDER KR, CIDECIYAN AV, BIRCH DG, WELEBER RG, HOOD DC. (2005). Outcome measures and their application in clinical trials for retinal degenerative diseases: Outline, review, and perspective. *Retina* 25: 772–777.
58. Fortuny C, Flannery JG. Mutation-independent gene therapies for rod-cone dystrophies. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1074:75–81.
59. FU, Y.; YAU, K. W. (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 454:805–819.
60. GAO Y, VASILYEV DV, GONCALVES MB, HOWELL FV, HOBBS C, REISENBERG M, SHEN R, ZHANG MY, STRASSLE BW, LU P, MARK L, PIESLA MJ, DENG K, KOURANOVA EV, RING RH, WHITESIDE GT, BATES B, WALSH FS, WILLIAMS G, PANGALOS MN, SAMAD TA, DOHERTY P. Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30:2017–2024, 2010.
61. GAONI, Y., MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. (1964) *J. Am. Chem. Soc.*, 86:1646–1647.

62. GARGINI, C., TERZIBASI, E., MAZZONI, F. and STRETTOI, E. (2007) Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol* 500: 222-38.
63. Gasparini SJ, Llonch S, Borsch O, Ader M. Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. *Prog Retin Eye Res.* 2019;69:1–37.
64. GEHRIG, A., LANGMANN, T., HORLING, F., JANSSEN, A., BONIN, M., WALTER, M., POTHS, S., WEBER, B.H., (2007). Genome-wide expression profiling of the retinoschisin- deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 891–900.
65. GERTIG, U., HANISCH, U.K., (2014). Microglial diversity by responses and responders. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 101.
66. GOEL, Manik et al. Aqueous Humor Dynamics : A Review. [s. l.], p. 52–59, 2010.
67. GRACA, Anna B; HIPPERT, Claire; PEARSON, Rachael A. Müller Glia Reactivity and Development of Gliosis in Response to Pathological Conditions. [s. l.], p. 303–308,
68. GUPTA N, BROWN KE, MILAM AH. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76:463–471.
69. GUZMÁN, M. LO VERME J, FU J, OVEISI F, BLÁZQUEZ C, PIOMELLI D. (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-alpha). *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 27, p. 27849–27854.
70. HACK, I.; PEICHL, L.; BRANDSTÄTTER, J. H. (1999) An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 24, p. 14130–14135.
71. HAIM M. (2002). Epidemiology of retinitis pigmentosa in enmark. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 233: 1–34.
72. Hamel, C., 2006. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 40.
73. HANISCH, U.K., KETTENMANN, H., (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. NeuroSci.* 10, 1387–1394.
74. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):3662-5. doi: 10.1073/pnas.061029898. Epub 2001 Mar 20. PMID: 11259648; PMCID: PMC31108.

75. HARADA T, HARADA C, KOHSAKA S, WADA E, YOSHIDA K, OHNO S, MAMADA H, TANAKA K, PARADA LF, WADA K. (2002). Microglia-Muller glia cell inter- actions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 22:9228–9236.
76. Hartman RR, Kompella UB. Intravitreal, Subretinal, and Suprachoroidal Injections: Evolution of Microneedles for Drug Delivery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2018;34(1-2):141-153.
77. HARTONG, D. T.; BERSON, E. L.; DRYJA, T. P. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368:1795–1809.
78. Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809.
79. HECKENLIVELY JR, DAIGER SP. (2007). Hereditary retinal and choroidal degenerations. In Emery and Rimoin’s principles and practice of medical genetics, Chap. 147, pp. 3197– 3227, Churchill Livingstone, London
80. HU SS, ARNOLD A, HUTCHENS JM, RADICKE J, CRAVATT BF, WAGERMILLER J, MACKIE K, STRAIKER A. (2010) Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. *J Comp Neurol* 518:3848–3866.
81. HUANG, J. Y.; PROTTI, D. A. (2016) The impact of inhibitory mechanisms in the inner retina on spatial tuning of RGCs. *Scientific Reports*, 6:21966.
82. Jayakody, S.A., Gonzalez-Cordero, A., Ali, R.R., Pearson, R.A., 2015. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog. Retin Eye Res.* 46, 31–66.
83. Jayakody, S.A., Gonzalez-Cordero, A., Ali, R.R., Pearson, R.A., 2015. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog. Retin Eye Res.* 46, 31–66.
84. JINDROVÁ, H. (1998) Vertebrate phototransduction: Activation, recovery, and adaptation. *Physiological Research*, 47(3):155-68.
85. Jones, M.K., Lu, B., Girman, S., Wang, S., 2017. Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. *Prog. Retin Eye Res.* 58, 1–27
86. JOSHI, Neal; ONAIVI, Emmanuel S. Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2>
87. KANO M, OHNO-SHOSAKU T, HASHIMOTODANI Y, UCHIGASHIMA M, WATANABE M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 89:309-380.

88. KELS, Barry D.; GRZYBOWSKI, Andrzej; GRANT-KELS, Jane M. Human ocular anatomy. *Clinics in Dermatology*, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 140–146, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.006>
89. Koirala, A., Conley, S.M., Naash, M.I., 2013. A review of therapeutic prospects of nonviral gene therapy in the retinal pigment epithelium. *Biomaterials* 34, 7158–7167.
90. KOLB, H. How the retina works. (2003) *The scientific research society*, 90:28–35.
91. KRAMER, R. H.; DAVENPORT, C. M. (2015) Lateral Inhibition in the Vertebrate Retina: The Case of the Missing Neurotransmitter. *PLoS Biology*, 13:1–8.
92. Kutluer M, Huang L, Marigo V. Targeting molecular pathways for the treatment of inherited retinal degeneration. *Neural Regen Res*. 2020 Oct;15(10):1784-1791.
93. Lagnado L. The Wellcome Prize Lecture. Visual signals in the retina: from photons to synapses. *Exp Physiol*. 2000 Jan;85(1):1-16. PMID: 10662887.
94. LALONDE MR, JOLLIMORE CA, STEVENS K, BARNES S, KELLY ME. (2006) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 12:1160–1166.
95. LAMB, Trevor D.; PUGH, Edward N. Phototransduction, dark adaption, and rhodopsin regeneration: The proctor lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 5138–5152, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0849>
96. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell*. 2009;4:73–79
97. LAMBERT, D.M., FOWLER, C.J. (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J. Med. Chem*. 48:5059–5087.
98. LANGMANN, T., (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol*. 81, 1345–1351.
99. LEONELLI M, BRITTO LR, CHAVES GP, TORRAO AS. (2005) Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Brain Res Dev Brain Res*. 156:176–182.
100. LI, Xiaoting et al. Structural and Functional Insights into Cannabinoid Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, [s. l.], p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.010>

101. LI, Z. Y., WONG F, CHANG JH, POSSIN DE, HAO Y, PETTERS RM, MILAM AH. (1998) Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39:808– 65 819.
102. Lipinski, D.M., Thake, M., MacLaren, R.E., 2013. Clinical applications of retinal gene therapy. *Prog. Retin Eye Res.* 32, 22–47.
103. LOPEZ E.M., TAGLIAFERRO P, ONAIVI ES, LOPEZ-COSTA JJ. (2011) Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. *Synapse.* 65:388– 392.
104. LU, Yan; ANDERSON, Hope D. Cannabinoid signaling in health and disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 311–327, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0346>
105. MACCARONE, R. et al. Modulation of Type-1 and Type-2 cannabinoid receptors by saffron in a rat model of retinal neurodegeneration. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2016.
106. MAGALHÃES, C. EFEITO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA RETINA DE MODELO MURINO DE RETINOSE PIGMENTAR. Universidade Federal Fluminense, p. 1–106, 2016.
107. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med.* 2017;376:1038–1046
108. MARC, R.E., JONES, B.W., WATT, C.B., STRETTOI, E. (2003) Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 607e655.
109. Marigo V, Casarosa S. Photoreceptor transplantation and regeneration. *Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases.* 2014
110. MARQUARDT, T., GRUSS, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *TRENDS in Neurosciences.* 25(1):32-8.
111. MARQUARDT, T., GRUSS, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *TRENDS in Neurosciences.* 25(1):32-8.
112. MARTINS, R. A. P.; PEARSON, R. A. (2007) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brains Res.* 4:1192:37-70.
113. MASLAND, R. H. (2012) The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*, 76:2 266-280.
114. MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWNSTEIN, M.J.; YOUNG, A.C.; BOLNIER, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561–564.

115. McCulloch, D.L., Marmor, M.F., Brigell, M.G., Hamilton, R., Holder, G.E., Tzekov, R., Bach, M., 2015. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc. Ophthalmol* 130, 1–12.
116. MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMDKY, M.; KAMINSKI, N.E.; SHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50:83–90.
117. MECHOULAM, R.; GAONI, Y. (1967) The absolute configuration of D1 - tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.*, 1109–1111.
118. MENOTTI-RAYMOND, M. DECKMAN KH, DAVID V, MYRKALO J, O'BRIEN SJ, NARFSTRÖM K. (2010) Mutation discovered in a feline model of human congenital retinal blinding disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51:2852–2859.
119. Mey J, Thanos S. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Apr;32(2-3):343-79. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00022-3. PMID: 10760548.
120. MONORY K, LUTZ B (2009). Genetic models of the endocannabinoid system. *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System* (ed. D. Kendall and S. Alexander), pp. 111–139. Springer: Berlin and Heidelberg.
121. MONORY K, TZAVARA ET, LEXIME J, LEDENT C, PARMENTIER M, BORSODI A, HANOUNE J. (2002) Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 292:231–235.
122. Motta, F.L.; Martin, R.P., Filippelli-Silva, R., Salles, M.V., Sallum, J.M.F. 2018. Relative frequency of inherited retinal dystrophies in Brazil. *Nature Scientific Reports.* 8:15939.
123. MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65.
124. MUZIO, L., MARTINO, G., FURLAN, R., (2007). Multifaceted aspects of inflammation in multiple sclerosis: the role of microglia. *J. Neuroimmunol.* 191, 39–44.
125. NEWMAN, E. (2004) A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biol.*, 3: 245–252.
126. Novak-Lauš, K., Kukulj, S., Zorić-Geber, M., Bastaić, O., 2002. Primary tapetoretinal dystrophies as the cause of blindness and impaired vision in the republic of Croatia. *Acta Clin. Croat* 41, 23–27.

127. NUCCI, C. et al. Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 48, n. 7, p. 2997–3004, 2007.
128. O’SULLIVAN S.E. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152:576–582.
129. Ohsawa R, Kageyama R. Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* 2008 Feb 4;1192:90-8. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.014. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17488643.
130. Olivares-González L, Velasco S, Campillo I, Rodrigo R. Retinal Inflammation, Cell Death and Inherited Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 20;22(4):2096. doi: 10.3390/ijms22042096. PMID: 33672611; PMCID: PMC7924201.
131. ONAIVI, Emmanuel S et al. Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. [s. l.], v. 536, p. 514–536, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1369.052>
132. Orhan E, Dalkara D, Neuillé M, Lechauve C, Michiels C, Picaud S, Léveillard T, Sahel JA, Naash MI, Lavail MM, Zeitz C, Audo I. Genotypic and phenotypic characterization of P23H line 1 rat model. *PLoS One.* 2015 May 26;10(5):e0127319. doi: 10.1371/journal.pone.0127319. PMID: 26009893; PMCID: PMC4444340.
133. PAULI, Christopher S. et al. Cannabidiol Drugs Clinical Trial Outcomes and Adverse Effects. *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 11, n. February, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00063>
134. PENG B, XIAO J, WANG K, SO KF, TIPOE GL, LIN B (2014) Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 34: 8139 – 8150
135. PERTWEE, R. G.; HOWLETT, A. C.; ABOOD, M. E.; ALEXANDER, S. P. H.; DI MARZO, V.; ELPHICK, M. R.; GREASLEY, P. J.; HANSEN, H. S.; 68 KUNOS, G.; MACKIE, K.; MECHOULAM, R.; ROSS, R. A. (2010) International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol. Rev.*, 62:588–631.
136. Petrs-Silva, H., Linden, R., 2014. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin. Ophthalmol.* 8, 127–136.
137. PORTER, A. C.; SAUER, J. M.; KNIERMAN, M. D.; BECKER, G. W.; BERNA, M. J.; BAO, J.; NOMIKOS, G. G.; CARTER, P.; BYMASTER, F. P.; LEESE, A. B.; FELDER, C. C. (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301:1020–1024.
138. PRADA C., PUGA J., PÉRES-MÉNDEZ L., LÓPES R. AND RAMÍREZ G. (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.*, 3:559-569.

139. PROVIS, J. M. DUBIS AM, MADDESS T, CARROLL J. (2013) Adaptation of the central retina for high acuity vision: Cones, the fovea and the avascular zone. *Progress in Retinal and Eye Research*, 35: 63–81.
140. PURVES, Dale et al. *Neurociências*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
141. PUTHUSSERY, T., GAYET-PRIMO, J., PANDEY, S., DUVOISIN, R.M. and TAYLOR, W.R. (2009). Differential loss and preservation of glutamate receptor function in bipolar cells in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Eur J Neurosci* 29: 1533-42.
142. RANSOHOFF, R.M., BROWN, M.A., (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164e1171.
143. REICHENBACH, Andreas; BRINGMANN, Andreas. New functions of müller cells. *Glia*, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 651–678, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
144. ROCHE, S. L. et al. Alterations to retinal architecture prior to photoreceptor loss in a mouse model of retinitis pigmentosa. *International Journal of Developmental Biology*, v. 60, n. 4– 6, p. 127–139, 2016.
145. ROQUE RS, IMPERIAL CJ, CALDWELL RB (1996) Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 196 – 203
146. SALAZAR, M. CARRACEDO A, SALANUEVA IJ, HERNÁNDEZ-TIEDRA S, LORENTE M, EGIA A, VÁZQUEZ P, BLÁZQUEZ C, TORRES S, GARCÍA S, NOWAK J, FIMIA GM, PIACENTINI M, CECCONI F, PANDOLFI PP, GONZÁLEZ-FERIA L, IOVANNA JL, GUZMÁN M, BOYA P, VELASCO G. (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *The Journal of clinical investigation*, 119:1359–1372.
147. SAMARDZIJA, M. WARIWODA H, IMSAND C, HUBER P, HEYNEN SR, GUBLER A, GRIMM C. (2012) Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Experimental Eye Research*, 99:17–26.
148. SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, GARZÓN J. (2014) The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*. 4:169.
149. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekström P, Paquet-Durand F. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol*. 2008 Dec;38(3):253-69. doi: 10.1007/s12035-008-8045-9. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18982459.
150. SANES, Joshua R.; MASLAND, Richard H. The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annual Review of*

Neuroscience, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 221–246, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034120>

151. SAOIRSE, Correspondence et al. An update on PPAR activation by cannabinoids. [s. l.], v. 16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13497>

152. SCHUETZ, E., THANOS, S., (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr. Drug Targets* 5, 619–627.

153. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, Hubschman JP, Davis JL, Heilwell G, Spirn M, Maguire J, Gay R, Bateman J, Ostrick RM, Morris D, Vincent M, Anglade E, Del Priore LV, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385:509–516.

154. SCHWITZER, Thomas et al. The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications. *Neural Plasticity*, [s. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/2916732>

155. Seiler, M.J., Aramant, R.B., 2012. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Prog. Retin Eye Res.* 31, 661–687.

156. Senos, D.L. Alteração dos receptores canabinoides e da micróglia durante o desenvolvimento da retina em modelo murino de retinose pigmentar PDE6 $\beta^{rd10/rd10}$ (2018). Universidade Federal Fluminense, p. 01-69.

157. Senos, D.L. Expressão dos receptores canabinoides na retina: comparação entre C57/Black6 e modelo murino de retinose pigmentar PDE6 $\beta^{rd10/rd10}$ (2016). Universidade Federal Fluminense, p. 01-91.

158. SHERIDAN, Graham K; MURPHY, Keith J; SHERIDAN, Graham K. Neuron – glia crosstalk in health and disease : fractalkine and CX 3 CR1 take centre stage. [s. l.], 2013.

159. STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long term potentiation. *Nature* 388:773–778.

160. STRAIKER A, MAGUIRE G, MACKIE K, LINDSEY J. (1999) Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:2442–2448.

161. STRAIKER A, STELLA N, PIOMELLI D, MACKIE K, KARTEN HJ, MAGUIRE G. (1999a) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14565–14570.

162. STRAIKER A, SULLIVAN JM. (2003) Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol.* 89:2647–2654.
163. STRAUSS, O. (2005) The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 85: 845– 881.
164. SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 89–97
165. SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 89–97.
166. SUN, Y.; BENNETT, A. (2007) Cannabinoids: A new group of agonists of PPARs. *PPAR Research*, 2007;2007:23513
167. Sung CH, Chuang JZ. The cell biology of vision. *J Cell Biol.* 2010 Sep 20;190(6):953-63. doi: 10.1083/jcb.201006020. PMID: 20855501; PMCID: PMC3101587.
168. THANOS, S., MEY, J., WILD, M., (1993). Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 13, 455e466.
169. THORESON, W.B.; MANGEL, S.C.. (2012) Lateral interactions in outer retina. *Progress in Retinal and Eye Research.* 31:407-441,
170. Tong W, Stamp M, Apollo NV, Ganesan K, Meffin H, Praver S, Garrett DJ, Ibbotson MR. Improved visual acuity using a retinal implant and an optimized stimulation strategy. *J Neural Eng.* 2019 Dec 23;17(1):016018.
171. Trapani, I., Puppo, A., Auricchio, A., 2014. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog. Retin Eye Res.* 43, 108–128
172. Tucker BA, Mullins RF, Stone EM. Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease. *Hum Mol Genet.* 2014;23:R9–R16.
173. Tuntivanich N, Pittler SJ, Fischer AJ, Omar G, Kiupel M, Weber A, Yao S, Steibel JP, Khan NW, Petersen-Jones SM. Characterization of a canine model of autosomal recessive retinitis pigmentosa due to a PDE6A mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Feb;50(2):801-13. doi: 10.1167/iovs.08-2562. Epub 2008 Sep 4. PMID: 18775863; PMCID: PMC3720143.

174. VECINO, E. RODRIGUEZ FD, RUZAF A N, PEREIRO X, SHARMA SC. (2015) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research*, 51:1–39.
175. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ. Nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 2018 Sep;66:157-186.
176. VOLGYI, B., CHHEDA, S. AND BLOOMFIELD, S.A. (2009) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J. Cop. Neurol.* 512: 664-687.
177. WANG, X. , ZHAO L, ZHANG J, FARISS RN, MA W, KRETSCHMER F, WANG M, QIAN HH, BADEA TC, DIAMOND JS, GAN WB, ROGER JE, WONG WT. (2016) Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *Journal of Neuroscience*, 36:2827–2842.
178. WARRIER A, WILSON M. (20007) Endocannabinoid signaling regulates spontaneous transmitter release from embryonic retinal amacrine cells. *Vis Neurosci.* 24:25–35.
179. WASSLE, H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*, 5:747–757.
180. Waters, A.M., Beales, P.L., 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr. Nephrol.* 26, 1039–1056.
181. WEI, Y.; WANG, X.; WANG, L. Presence and regulation of cannabinoid receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular vision*, v. 15, n. June, p. 1243–1251, 2009.
182. Weiland, J.D., Humayun, M.S., 2014. Retinal prosthesis. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 61, 1412–1424.
183. Wheway, G., Parry, D.A., Johnson, C.A., 2014. The role of primary cilia in the development and disease of the retina. *Organogenesis* 10, 69–85.
184. XAPELLI, S. AGASSE F, SARDÀ-ARROYO L, BERNARDINO L, SANTOS T, RIBEIRO FF, VALERO J, BRAGANÇA J, SCHITINE C, DE MELO REIS 72 RA, SEBASTIÃO AM, MALVA JO. (2013) Activation of Type 1 Cannabinoid Receptor (CB1R) Promotes Neurogenesis in Murine Subventricular Zone Cell Cultures. *PLoS ONE*, 8:1
185. XIANG, ZONGQIN; BAO, YIQIN; ZHANG, JIA; LIU, CHAO; XU, DI; LIU, FENG; CHEN, HUI; HE, LIUMIN; RAMAKRISHNA, SEERAM; ZHANG, ZAIJUN; VARDI, NOGA; XU, 108 Y. Inhibition of non-NMDA ionotropic glutamate receptors delays the retinal degeneration in rd10 mouse. *Neuropharmacology*, 2018.

186. Yanai, D., Weiland, J.D., Mahadevappa, M., Greenberg, R.J., Fine, I., Humayun, M.S., 2007. Visual performance using a retinal prosthesis in three subjects with retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* 143, 820– 827
187. YANG, X. L. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in Neurobiology.* 73:127.
188. YAZULLA S, STUDHOLME KM, MCINTOSH HH, DEUTSCH DG. (1999) Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol.* 415:80–90.
189. Yiu G, Chung SH, Mollhoff IN, Nguyen UT, Thomasy SM, Yoo J, Taraborelli D, Noronha G. Suprachoroidal and Subretinal Injections of AAV Using Transscleral Microneedles for Retinal Gene Delivery in Nonhuman Primates. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Jan 21;16:179-191
190. YOSHIDA N, IKEDA Y, NOTOMI S, ISHIKAWA K, MURAKAMI Y, HISATOMI T, ENAIDA H, ISHIBASHI T (2013b) Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 120:e5– e12
191. Yue, L., Weiland, J.D., Roska, B., Humayun, M.S., 2016. Retinal stimulation strategies to restore vision: fundamentals and systems. *Prog. Retin Eye Res.* 53, 21– 47.
192. ZABOURI N, BOUCHARD JF, CASANOVA C. (2011) Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. *J Comp Neurol.* 519:1258–1280
193. ZEISS, C.J., JOHNSON, E.A., (2004). Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 971–976.
194. ZENG H, DING M, CHEN XX, LU Q (2014) Microglial NADPH oxidase activation mediates rod cell death in the retinal degeneration in rd mice. *Neuroscience* 275C: 54 – 61
195. ZENG HY, ZHU XA, ZHANG C, YANG LP, WU LM, TSO MO (2005) Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2992–2999
196. ZHANG, Chi; MCCALL, Maureen A. Receptor targets of amacrine cells. *Visual Neuroscience*, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 11–29, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0952523812000028>
197. ZOU, Shenglong; KUMAR, Ujendra. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 19, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>

198. Zulliger, R., Conley, S.M., Naash, M.I., 2015. Non-viral therapeutic approaches to ocular diseases: an overview and future directions. *J. Control Release* 219, 471–487
199. ZYGMUNT PM, PETERSSON J, ANDERSSON DA, CHUANG H, SØRGA°RD M, DI MARZO V, JULIUS D, HEOGESTA°TT ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457.
200. Al-Gayyar MM, Elsherbiny NM. Contribution of TNF- α to the development of retinal neurodegenerative disorders. *Eur Cytokine Netw.* 2013 Mar;24(1):27-36. doi: 10.1684/ecn.2013.0334. PMID: 23608634.
201. Yates CF, Huang JY, Protti DA. Tonic Endocannabinoid Levels Modulate Retinal Signaling. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Sep 30;19(19):12460. doi: 10.3390/ijerph191912460. PMID: 36231760; PMCID: PMC9566182.