

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

FLÁVIA MOURA GAIA FARIAS

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE FOTOOXIDAÇÃO DO DiI POR DIODO
EMISSOR DE LUZ (LED): ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS
HORIZONTAIS DA RETINA HUMANA**

Belém

2013

FLÁVIA MOURA GAIA FARIAS

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE FOTOOXIDAÇÃO DO DiI POR DIODO
EMISSOR DE LUZ (LED): ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS
HORIZONTAIS DA RETINA HUMANA**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Neurociências e
Biologia Celular pela Universidade Federal do
Pará.

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho.

Belém

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Moura Gaia Farias, Flávia, 1988-

Avaliação do método de fotooxidação do dii
por diodo emissor de luz (led): aspectos
morfológicos de células horizontais da retina
humana / Flávia Moura Gaia Farias. - 2013.

Orientador: Manoel Da Silva Filho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Belém, 2013.

1. Neurobiologia. 2. Retina. I. Título.

CDD 23. ed. 573.8

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Wilson e Rosilene, e
minhas irmãs, Bianca e Rosane.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel da Silva Filho, por ser um orientador bastante presente, comprometido com a pesquisa científica e com a formação dos estudantes e, em especial pela paciência durante as fases difíceis da pesquisa e pela amizade desenvolvida e permeada de aprendizado pessoal e acadêmico.

À Prof^a. Dr^a. Silene Maria Araújo de Lima, pelo acolhimento inicial no programa de pós-graduação como orientadora e pela iniciativa em me propor participar do projeto com retina humana.

À Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sumi Yamada pela disponibilidade em auxiliar no trabalho, principalmente quanto à identificação e registro da excentricidade e dos tipos celulares.

Ao colega de laboratório Dr. Daniel Valle Vasconcelos Santos, pela orientação referente aos experimentos desenvolvidos durante a pesquisa e pelo auxílio com as fotomicrografias.

Aos estudantes de iniciação científica Antônia do Socorro da Silva Maurício, Juliana Fonseca de Araújo e Lucas Daniel de Almeida Fernandes, pelo auxílio prestado em alguns experimentos e atividades práticas da pesquisa.

À equipe do Banco de Olhos do Hospital Ophir Loyola, por se empenhar em disponibilizar o material atendendo, na medida do possível, as necessidades da pesquisa.

RESUMO

A análise da morfologia celular é um aspecto crucial da neurobiologia, pois a relação entre forma e função pode definir os processos fisiológicos na saúde e na doença. Um dos principais métodos para avaliar a morfologia celular é por meio da fotooxidação de marcadores fluorescentes intracelulares, dentre os quais se tem o percloro de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina (DiI), uma carbocianina lipofílica que pode marcar células vivas ou fixadas. O DiI foi escolhido para este trabalho devido, dentre outros fatores, à sua importante utilização para estudos de morfologia celular. Como modelo para avaliar a qualidade da fotooxidação do aparelho construído para essa finalidade, elegeu-se as células horizontais da retina humana com o intuito de prosseguir com estudo morfométrico posterior dessas células, tendo em vista a escassez de trabalhos com essa abordagem em retina humana. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade do método de fotooxidação do DiI através de LED e utilizando como modelo células horizontais da retina humana. O material foi obtido do Banco de Olhos do Hospital Ophir Loyola e, em sequência dissecado, marcado com cristais de DiI e fotooxidado com o aparelho de LED. As imagens que resultaram do novo método de iluminação para fotooxidação de traçador fluorescente apresentou elevada qualidade de detalhes da morfologia neuronal, similares aos resultados obtidos em reações de fotoconversão convencional com microscópio, o que permite concluir que o aparelho mantém a eficiência da fotooxidação por revelar detalhes finos da morfologia celular, inclusive com as vantagens de processar áreas maiores de tecido e considerável redução de custo por dispensar o emprego de microscópio para o processo.

Palavras chave: fotooxidação, corantes fluorescentes, células horizontais da retina.

ABSTRACT

The analysis of cell morphology is a crucial aspect of neurobiology, since the relationship between form and function can define the physiological processes in health and disease. One of the main methods to evaluate cell morphology is through photooxidation of intracellular fluorescent markers, among which is the perchlorate of 1,1'-di-octadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine (DiI) a lipophilic carbocyanine that can make living or fixed cells. The DiI was chosen for this work because, among other factors, it is used for important studies of cell morphology. As a model for evaluating the quality of photooxidation of the apparatus constructed for this purpose, horizontal cells of human retina were elected in order to proceed with morphometric study these cells further, in view of the lack of studies with this approach in human retina. This study evaluated the quality of the DiI method photooxidation via LED and used the horizontal cells of the human retina as a model. The material was obtained from the Eye Bank of Ophir Loyola Hospital and sequence dissected, labeled with DiI crystals and photooxidized with the LED device. The images resulting from the new method of lighting fluorescent tracer showed photooxidation of high-quality detailed neuronal morphology, similar to the results obtained in reactions of conventional photoconversion with a microscope, which indicates that the device maintains the efficiency of the photooxidation for revealing fine details of cellular morphology, including the advantages of larger areas of tissue processing and a considerable cost reduction for the use of microscopy dispensed into the process.

Keywords: photooxidation, fluorescent dyes, retinal horizontal cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Exemplos de células marcadas com DiI em tecido fixado.	04
Figura 2	Desenho esquemático da organização laminar dos neurônios da retina.	06
Figura 3	Desenho ilustrativo do implante do cristal de DiI e sua difusão no plano hidrofóbico da membrana celular.	11
Figura 4	Vista anterior de uma retina humana esquerda aplanada.	12
Figura 5	Desenho da disposição dos componentes eletrônicos que compõem o circuito da fonte de corrente constante.	14
Figura 6	Aparelho Fotooxidador.	15
Figura 7	Exemplo dos detalhes da morfologia de células horizontais de tecido que foi fotooxidado com o novo aparelho.	16
Figura 8	Exemplos de células horizontais conforme a excentricidade linear na retina a partir da fóvea como referência.	17
Figura 9	Comparação entre os tecidos fotooxidados por meio das duas técnicas.	18
Figura 10	Comparação da qualidade da fotooxidação por meio das duas técnicas.	18
Figura 11	Exemplos de células horizontais com características descritas por Kolb <i>et al.</i> (1994) para a classificação em H1, H2 e H3, objetiva de 100x	19
Figura 12	Exemplos de células horizontais similares às H1 descritas por Kolb <i>et al.</i> (1994).	20
Figura 13	Exemplos de células horizontais similares às H2 descritas por Kolb <i>et al.</i> (1994).	21
Figura 14	Exemplos de células horizontais similares às H3 descritas por Kolb <i>et al.</i> (1994).	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 FOTOOXIDAÇÃO	01
1.2 MARCADOR FLUORESCENTE DiI	03
1.3 CÉLULAS HORIZONTAIS DA RETINA HUMANA	05
2. OBJETIVOS	09
2.1 GERAL	09
2.2 ESPECÍFICOS	09
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA	10
3.2 DISSECÇÃO DA RETINA E INSERÇÃO DO DiI	10
3.3 FOTOOXIDAÇÃO DO DiI	12
2.4 APARELHO PARA FOTOOXIDACÃO	13
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 FOTOOXIDAÇÃO

A análise da morfologia celular é um aspecto crucial da neurobiologia, pois a relação entre forma e função pode definir os processos fisiológicos na saúde e na doença. Nesse sentido, um dos principais métodos para avaliar a morfologia celular é através da utilização de marcadores fluorescentes intracelulares, tais como os corantes, os fluorocromos marcadores de anticorpos e as proteínas fluorescentes geneticamente modificadas, como por exemplo, a proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP). Esses fluoróforos podem ser observados diretamente sob microscopia com fluorescência, confocal ou multifóton, permitindo ao investigador observar diretamente a célula alvo e estruturas celulares.

Os marcadores fluorescentes também podem ser usados na microscopia óptica de luz convencional e microscopia eletrônica de transmissão através de um processo chamado de fotooxidação. Essa técnica, inicialmente proposta por Maranto (1982), baseia-se na fotoconversão de marcadores intracelulares para promover a oxidação do 3,3',9-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) com elevada acuidade e precisão espacial devido ao fato de que a maioria dos fluoróforos orgânicos libera radicais livres de oxigênio quando irradiados em comprimento de onda apropriados, pois na presença da solução de DAB os radicais livres reativos oxidam esse composto orgânico formando um polímero marrom, osmiofílico, opaco e elétron-denso (MARANTO, 1982; MEISLITZER-RUPPITSCH *et al.*, 2009).

Devido os radicais livres serem liberados somente onde há marcadores fluorescentes e, exclusivamente sob iluminação com um comprimento de luz adequado, o investigador é capaz de controlar os parâmetros temporais e espaciais da reação de fotooxidação e, conseqüentemente regular a especificidade estrutural e a intensidade da marcação. Além

disso, o resultado da marcação não sofre fotodegradação e pode ser aplicada ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão (MARANTO, 1982; MEISSLITZER-RUPPITSCH *et al.*, 2009).

A fotooxidação foi usada inicialmente com o marcador *lucifer yellow* e tem sido demonstrada em diversos tipos celulares com outros corantes fluorescentes que podem ser aplicados para o mesmo propósito, pois são expostos à luz com um espectro que corresponde ao comprimento de onda de excitação deles (MEISSLITZER-RUPPITSCH *et al.*, 2009). Exemplos de fluoróforos que têm sido utilizados para fotooxidação fluorescente são: percloroeto de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina (DiI), DiO, *Fast Blue* e *Fluorogold* (BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; SANDELL, MASLAND, 1988; BENTIVOGLIO, SU, 1990; LÜBKE, 1993; PAPADOULOS, DORI, 1993; PRUSKY, ARJANNIKOVA, 1999).

Esses corantes têm a vantagem de marcar com boa qualidade os processos neuronais, e têm sido extensivamente utilizados para estudos de mapeamento dos neuritos (MARANTO, 1982; BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; PAPADOULOS, DORI, 1993; GHOSH, GRÜNERT, 1999; MEZEY, CSILLAG, 2003).

Anticorpos fluorescentes secundários para imunistoquímica e marcação histoquímica específica, como a diamidina fenil indol (DAPI) e o Eosin, também podem ser utilizados para fotooxidação alvo de proteínas específicas e estruturas celulares (SANDELL, MASLAND, 1988; CAPANI *et al.*, 2001; DEERINCK *et al.*, 1994).

A fotooxidação também foi aplicada por Grabenbauer *et al.* (2005) para realçar a GFP, que pode ser utilizada para observar proteínas e organelas específicas com uma elevada relação sinal-ruído. Recentemente, Shu *et al.* (2011) desenvolveram um marcador denominado “MiniSOG”, que é modificado geneticamente e específico para fotooxidação,

sendo desenvolvido para uma ótima fotooxidação de um alvo compatível com microscopia de luz e eletrônica.

No entanto, todas as técnicas de fotooxidação desenvolvidas até o momento são dependentes do microscópio confocal ou com fluorescência para a fotoconversão de alvos fluoróforos, no qual o protocolo de fotooxidação requer que o investigador irradie uma região específica da amostra conforme definido pela lente objetiva do microscópio, e o tempo necessário de iluminação varia de poucos minutos a várias horas dependendo do fluoróforo utilizado, do substrato celular a ser analisado e do objetivo do estudo (MEISLITZER-RUPPITSCH *et al.*, 2009; BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; SINGLETON, CASAGRANDE, 1996).

Esse processo desperdiça consideravelmente a vida útil da lâmpada de mercúrio e ocupa tempo considerável no microscópio. Sendo assim, esta dissertação de mestrado descreve o processo e a qualidade da fotooxidação realizada com um aparelho desenvolvido pelo Laboratório de Biofísica Celular (LBC) da Universidade Federal do Pará. Trata-se de um aparelho de baixo custo que utiliza um diodo emissor de luz (LED) de alta potência para produzir fotooxidação controlada do DAB em marcadores fluorescentes.

1.2 MARCADOR FLUORESCENTE DiI

O DiI é uma carbocianina lipofílica que pode marcar células vivas, pelo transporte axonal, e células fixadas, por meio da difusão lateral através das membranas fosfolipídicas. Ele produz uma fluorescência de cor laranja e se difunde cerca de seis milímetros por dia *in-vivo*, e de forma mais lenta no tecido fixado quando armazenado em temperatura ambiente, atingindo cerca de dois milímetros de migração por mês (HOLMQVIST, OSTHOLM, EKSTROM, 1992) (Figura 1).

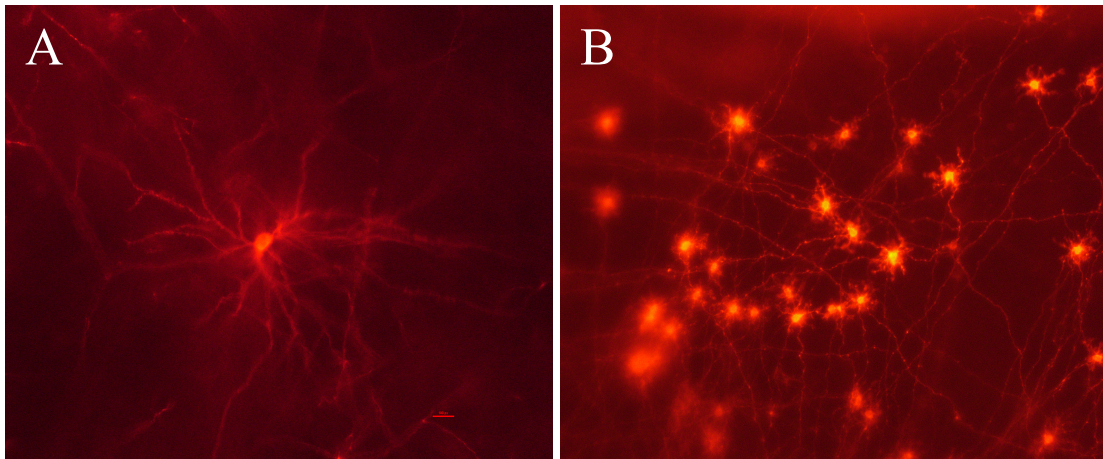


Figura 1 - Exemplos de células marcadas com DiI em tecido fixado. A) Neurônio piramidal da camada 2/3 do córtex visual de rato em corte tangencial (20x). B) Células horizontais de retina humana (10x). Fonte: acervo do LBC.

Na busca pela introdução de métodos que permitissem a marcação de processos neuronais em tecido previamente fixado, as carbocianinas foram caracterizadas como traçadores promissores, especialmente durante a fase de desenvolvimento do sistema nervoso e na neuroanatomia (FRIEDMAN *et al.*, 1991). E dentre as carbocianinas, o DiI, introduzido por Godement *et al.* (1987) como marcador neuronal em tecido fixado, tornou-se bastante utilizado como traçador na neurobiologia.

Além de não ser tóxico, o DiI apresenta algumas vantagens para os estudos de caracterização morfológica como: ser utilizado para marcação neuronal no tecido vivo ou fixado; marcar os corpos e os processos de diversos tipos celulares; permitir a investigação da ultraestrutura das células marcadas; ser compatível com técnicas imunocitoquímicas e persistir por vários meses após a marcação celular (GODEMENT, 1987; HONIG, HUME, 1989; PRUSKY, ARJANNIKOVA, 1999).

Quanto às formas de aplicação, esse marcador pode ser aplicado no material a ser estudado: na forma de suspensão em solução aquosa; na forma cristalina; dissolvido em etanol, dimetil sulfóxido ou dimetil formamida; ou em preparações com outros corantes

aplicados no tecido por meio do dispositivo *gene gun*, que consiste em uma arma com sistema biobalístico de inserção de partículas (HONIG, HUME, 1989; GAN et al., 2000).

Em um estudo que comparou a eficácia entre vários marcadores neuronais fluorescentes, foi observado que o DiI era um dos que produzia marcação de melhor qualidade em termo de número de células e de intensidade quando comparado com os demais traçadores após o tempo de quatro semanas em temperatura ambiente a partir do momento da aplicação (CHOI, RAISMAN, 2002). Além disso, a fluorescência do DiI é capaz de persistir por até nove meses após ser aplicado no tecido (VIDAL-SANZ *et al.*, 1988).

No entanto, assim como outros marcadores fluorescentes, o DiI apresenta uma tendência a perder a fluorescência quando exposto à iluminação, e possui limitações quanto à microscopia eletrônica devido à ausência de densidade eletrônica (VON BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990), que se torna apropriada para microscopia eletrônica após o processo de fotooxidação. Assim, esse marcador foi escolhido para este trabalho devido às vantagens supracitadas e importante utilização para estudos de detalhes da morfologia celular.

1.3 CÉLULAS HORIZONTAIS DA RETINA HUMANA

As células horizontais são interneurônios inibitórios GABAérgicos localizados na camada nuclear interna da retina (Figura 2), que recebem essa denominação pelo fato dos seus contatos serem predominantemente em extensão horizontal. Quanto à função, elas são responsáveis pelo antagonismo em volta do campo receptivo da célula bipolar, pois modulam a sinalização entre os fotorreceptores e as células bipolares dentro da camada plexiforme externa (SQUIRE *et al.*, 2008).

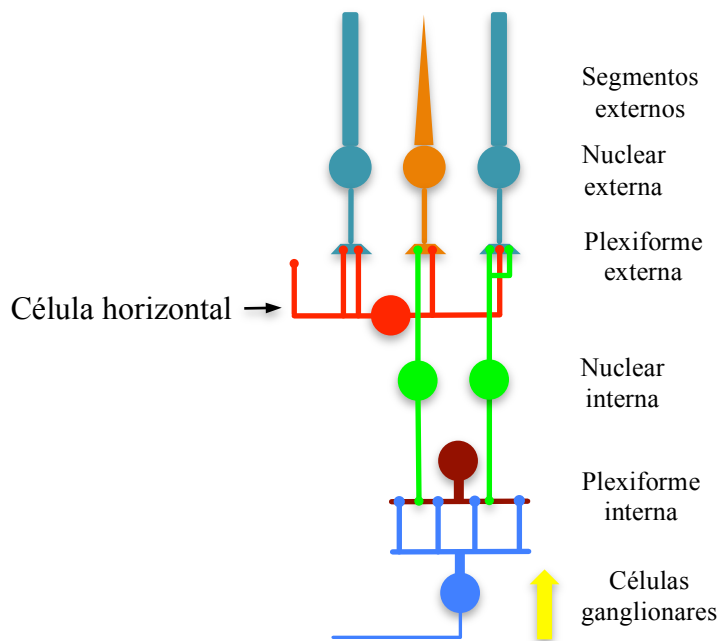


Figura 2 – Desenho esquemático da organização laminar dos neurônios da retina. A seta amarela indica a trajetória dos raios luminosos.

Essas células foram inicialmente caracterizadas por Ramón y Cajal (1893) e, recentemente, têm mostrado propriedades biológicas singulares quando comparadas com outras células nervosas como, por exemplo, o comportamento migratório incomum, a plasticidade morfológica e uma propensão para se dividir em um estágio relativamente tardio do desenvolvimento, o que desafia suposições de longa data nos campos do desenvolvimento neural e da biologia do câncer (POCHÉ, REESE, 2009).

Nesse aspecto, estudos demonstraram que o padrão dendrítico da célula horizontal é imensamente plástico e se orienta conforme a inervação aferente (RAVEN *et al.*, 2007) e, que elas têm propensão para reiniciar o ciclo celular, o que pode originar um retinoblastoma (AJIOKA *et al.*, 2007).

A maioria dos vertebrados possui dois ou três tipos de células horizontais, sendo que camundongos contêm apenas um (PEICHL, GONZALES-SORIANO, 1994). Em relação a classificação de subtipos, foram necessárias algumas décadas até que fossem descritos três

tipos morfológicamente distintos de células horizontais. A princípio, para Ramón y Cajal (1909) existiam pelo menos duas classes dessas células na retina de mamíferos, mas Polyak (1941) contradisse esse ponto de vista sendo o primeiro a argumentar a favor da existência de apenas uma classe, e ainda estendeu para todos os mamíferos essa afirmação que foi concluída baseada apenas na retina de antropoides (DOS REIS *et al.*, 2002).

Posteriormente, Boycott e Dowling (1969) descreveram duas classes de horizontais na retina de macacos e acrescentaram que uma delas era específica para cones e a outra para bastonetes (DOS REIS *et al.*, 2002). Contudo, somente com a invenção da microscopia eletrônica foi possível revelar que os dendritos de todas as células horizontais de primatas fazem sinapses com cones, o que favoreceu novamente a proposta da existência de apenas uma classe de horizontais (BOYCOTT, KOLB, 1973).

Todas essas divergências estavam centradas nas células horizontais que, posteriormente, foram distinguidas e classificadas como H1 e H3 (KOLB *et al.*, 1994). Entretanto, mais uma vez essa distinção entre elas foi rejeitada por meio de um estudo de registro e injeção intracelular que revelou que esses dois tipos formavam um único mosaico acoplado por junções gap, o que as tornaria uma única classe de células (DACEY *et al.*, 1996).

Além do conflito entre esses dois tipos celulares, foi demonstrado ainda outro tipo de horizontal, que hoje corresponde à que é descrita por alguns estudos como H2. Este tipo está presente na retina de primatas e faz sinapses com pedículos de cones sensíveis à ondas de curto comprimento (cone azul) (KOLB *et al.*, 1980), achado que foi respaldado posteriormente por Goodchild *et al.* (1996).

Tendo em vista que a maioria desses estudos morfológicos de células horizontais demonstram existir diferenças quanto ao número de subtipos morfológicos de células horizontais presentes na retina de primatas conforme à presença ou não dos três tipos de cones

de acordo com os hábitos do animal (diurno ou noturno), e que são escassos os trabalhos com essa abordagem em material humano, este trabalho elegeu a população de células horizontais da retina humana como modelo para avaliar a qualidade da fotooxidação do aparelho construído visando prosseguir posteriormente com estudos destinados à análise morfométrica dessas células com finalidade de comparar os dados com os da literatura sobre essa abordagem e fornecer informações mais abrangentes acerca dessas células em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a qualidade do método de fotooxidação do marcador fluorescente DiI através do aparelho desenvolvido, utilizando como modelo as células horizontais da retina humana.

2.2 ESPECÍFICOS

- Comparar a qualidade da marcação das células reveladas pelo método de fotooxidação com o novo aparelho com as células reveladas pela técnica convencional de fotoconversão ao microscópio de fluorescência;
- Descrever as vantagens e/ou desvantagens da técnica realizada com o fotooxidador em relação à técnica convencional;
- Descrever o grau de detalhamento morfológico das células horizontais reveladas pelo método de fotooxidação do DiI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Globos oculares humanos foram obtidos a partir do Banco de Olhos do Hospital Ophir Loyola (HOL), subsequente à declarações escritas de familiares dos indivíduos falecidos que é um pré-requisito para o armazenamento de tecido neste banco. Os procedimentos com o tecido humano *post-mortem* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pará (protocolo nº 2012/20468) e autorizados pela Direção do HOL (ANEXO).

3.2 DISSECÇÃO DA RETINA E INSERÇÃO DO DiI

Durante o período da coleta de material, foram utilizados 30 globos oculares que, após um período máximo de 48 horas depois da enucleação, foram imersos em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4. Em seguida à captação de cada globo, retirava-se a íris e a lente para auxiliar na remoção do excesso de humor vítreo, e a retina era retirada com auxílio de microtesoura, pinça e pincel.

Os fragmentos da camada pigmentar, que por ventura continuassem agregados à retina, foram removidos com auxílio de um pincel. Uma vez limpa, a retina era aplanada inteira através de quatro cortes radiais a partir das bordas em direção à parte central, inicialmente sobre uma placa de *Petri*, formando quadrantes definidos pelos planos anatômicos – regiões superior, inferior, nasal e temporal.

Após a retina ser aplanada, o restante de humor vítreo era delicadamente retirado com uma microtesoura e pinças, sob um estereomicroscópio (BX41, Olympus, Japão) se procedeu a introdução de pequenos cristais de DiI, os quais foram inseridos no tecido por meio de uma agulha hipodérmica (Figura 3). A colocação dos cristais seguiu uma ordem centro-periferia

para cobrir os padrões de excentricidade da retina. Depois a retina era mantida em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4 em 37°C, na ausência de luz por duas a três semanas, para acelerar a migração do DiI.

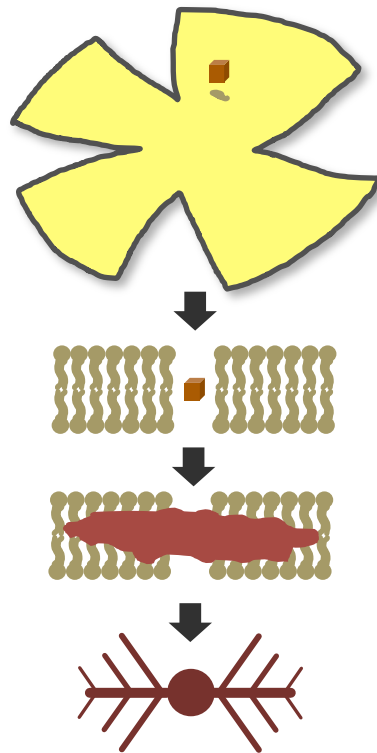


Figura 3 – Desenho ilustrativo do implante do cristal de DiI e sua difusão no plano hidrofóbico da membrana celular.

A maioria dos globos eram fixados cerca de 48 horas após a enucleação, que por conseguinte ocorria aproximadamente 10 horas após o óbito. Devido a esse longo período entre enucleação e fixação,, grande parte das retinas usadas (n=22) não apresentaram marcação satisfatória por contarem com poucas células marcadas, ou mesmo sem marcação de células íntegras. Portanto, apenas em oito delas foi possível marcar células em grande parte da área circunjacente ao implante do cristal.

3.3 FOTOOXIDAÇÃO DO DiI

Após o período de uma semana a dez dias de migração, o tecido era observado sob microscopia com fluorescência (80i, Nikon, Japão) para confirmar a difusão apropriada do DiI. Isso foi necessário, pois em alguns casos o corante se difundia de maneira inespecífica, possivelmente pela baixa qualidade de preservação do tecido, em função do tempo entre óbito e enucleação e/ou fixação.

Antes de iniciar a fotooxidação, a retina que se encontrava aplanada era completamente cortada em quadrantes pré-determinados (Figura 4) devido o tamanho da área capaz de ser fotooxidada pelo aparelho. Cada corte do tecido era lavado três vezes, por 10 minutos cada, em solução de Tris/HCl 0,1 M, pH 8,2 que era substituída a cada lavagem. Em seguida, o tecido era posicionado em uma cuba de acrílico, que recebeu uma lamínula redonda de vidro como fundo. E para evitar o deslocamento do tecido, um anel de aço inoxidável foi construído e nele foi fixado uma tela de Nylon® para equalizar a pressão sobre o tecido.



Figura 4. Vista anterior de uma retina humana esquerda aplanada. N: nasal; S: superior; T: temporal e I: inferior.

Para o processo de fotooxidação em si, a retina era posicionada na cuba de acrílico com a face do vítreo voltada para baixo, a fim de receber o feixe de luz diretamente, e ao

conjunto era adicionada uma solução DAB a 0,15% em Tris/HCl 0,1 M, pH 8,2. A reação de fotooxidação ocorreu submetendo-se o DiI ao seu comprimento de onda de excitação (549 nm) na presença da solução de DAB, que ao longo do processo era trocada a cada 30 minutos.

O progresso da fotooxidação era observado sob microscópio óptico (Labophot 2, Nikon, Japão) após 90 a 120 minutos de início da reação para estimar o tempo necessário para o término do processo que, em geral, durava aproximadamente três horas para cada área irradiada e cerca seis a sete horas para um dos quatro cortes de uma retina.

Após a fotooxidação, o tecido era lavado seguindo os critérios anteriores, e as impurezas presentes no tecido decorrentes da reação eram removidas com auxílio de um pincel e sob estereomicroscopia, para posterior montagem em lâmina-lamínula com *Mowiol*®.

As retinas montadas foram observadas sob microscopia óptica de campo claro para selecionar e fotografar as células horizontais com melhor qualidade de marcação, assim como registrar a posição XY de cada célula para posterior relação entre morfologia e excentricidade. As células foram fotomicrografadas em passos de 10 µm no eixo Z para realizar, em seguida, a sobreposição de imagens com o programa Helicon Focus. Para a captura das imagens foi usado um programa específico para esse fim que permitiu a correção automática de cor com melhora substancial da qualidade das imagens (NIF Elements F3.2, Nikon, Japão).

3.4 APARELHO PARA FOTOOXIDACÃO

O aparelho foi desenhado para substituir a microscopia COM fluorescência para esse processo. Nele, a lâmpada de mercúrio usada para irradiar luz no tecido, empregada na microscopia com fluorescência convencional, foi substituída por um LED de alta potência (XR7090GRN, Cree) alimentado por um microchip regulador de tensão (LM 317, Texas

Instruments) configurado para trabalhar como fonte de corrente constante. A corrente nominal para esse LED é de 350 mA em 3,6 V, mas se optou por uma corrente de 320 mA, ajustada pela fonte de corrente do regulador. Essa diferença aumentou substancialmente a vida útil do LED e não comprometeu o processo de fotooxidação.

O circuito completo foi montado em uma placa de circuito impresso circular (Figura 5). O espectro de emissão do LED foi medido com um spectroradiômetro (SpectraScan 705, PhotoResearch, EUA). O LED de alta potência foi fixado dentro de uma câmara cilíndrica de alumínio e isolado eletricamente da câmara por um anel de Teflon®. Um dissipador de calor foi aparafusado à parte inferior da câmara do LED e uma pasta térmica foi adicionada para aumentar a eficiência na transferência de calor.

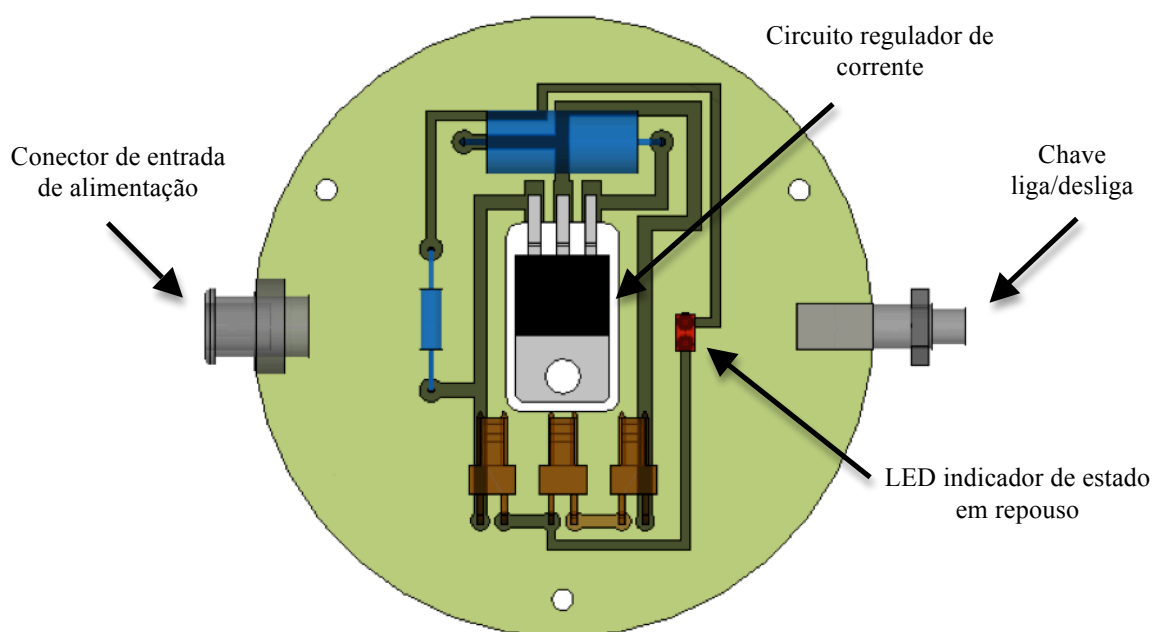


Figura 5 – Desenho da disposição dos componentes eletrônicos que compõem o circuito da fonte de corrente constante. Notar que o regulador de tensão foi posicionado ao centro do circuito para aproveitar a maior área possível do dissipador de calor.

O conjunto, LED mais placa de circuito impresso (PCI), foi fixado dentro de um cilindro de acrílico transparente, desenhada e construída no LBC. Esse cilindro foi equipada com um conector de alimentação externa (NIM-CAMAC 00,250 séries, Lemo, Suíça) e uma

chave liga/desliga (Spst micromini interruptor, RadioShack, EUA), que controla o estado do LED de alta potência. Na parte inferior do cilindro foi adicionado um dissipador de calor de alumínio necessário para a dissipação de 1,8 W de potência gerado pelo circuito regulador (Figura 6).

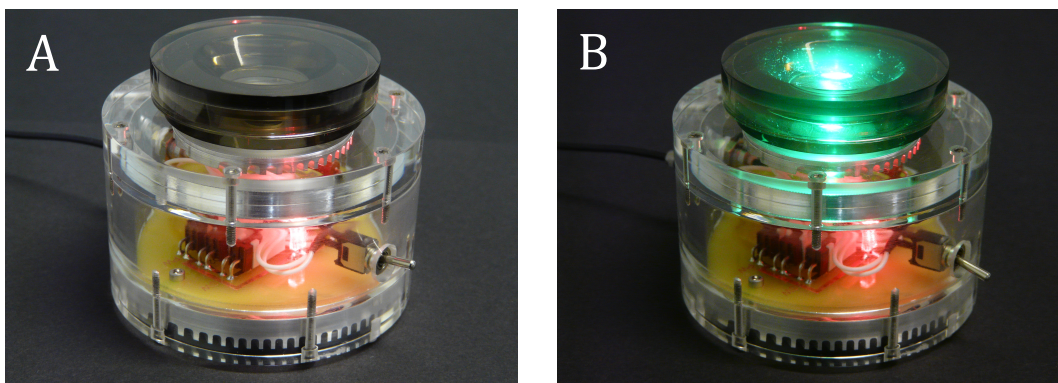


Figura 6 - Aparelho Fotooxidador. A) Em repouso, indicado pelo LED vermelho. B) Em estado ativo, LED verde ligado.

A fim de assegurar que o calor gerado pelo LED não sobreaquecesse o tecido, adicionou-se um dissipador de calor ao LED. Para confirmar a eficácia do desenho, a cuba onde a fotooxidação é processada foi preenchida com água deionizada (resistência de 18,6 M Ω) e se mediu a variação da temperatura na cuba durante quatro episódios de 30 minutos de iluminação contínua, ou seja, a duração similar a dos episódios de iluminação utilizada para reações de fotooxidação controladas. As medições de temperatura foram realizadas com um termômetro digital (Fluke 51 K/J, Fluke Corporation, EUA).

Percebeu-se que a partir de uma temperatura média de $25,55 \pm 0,24$ °C, sob iluminação contínua o LED causou apenas um aumento de $3,52 \pm 0,17$ °C no interior da cuba, com a temperatura máxima não superior a 29,3 °C. Esse nível de aumento da temperatura não afetou claramente a integridade do tecido, assim como, a qualidade da fotooxidação nos experimentos, confirmando que o sistema de dissipação de calor é funcional e adequado para os fins desejados. O desenho completo do dispositivo para fotooxidação a LED pode ser encontrado em Da Silva Filho, Santos e Costa (2013).

4 RESULTADOS

As imagens usando o novo método de iluminação para fotooxidação do traçador fluorescente apresentou elevada qualidade de detalhes da morfologia neuronal nos tecidos processados, pois o DiI marcou corpos celulares, árvores dendríticas e projeções axonais, além de tufos (clusters) dendríticos, uma característica típica de células horizontais (Figura 7).

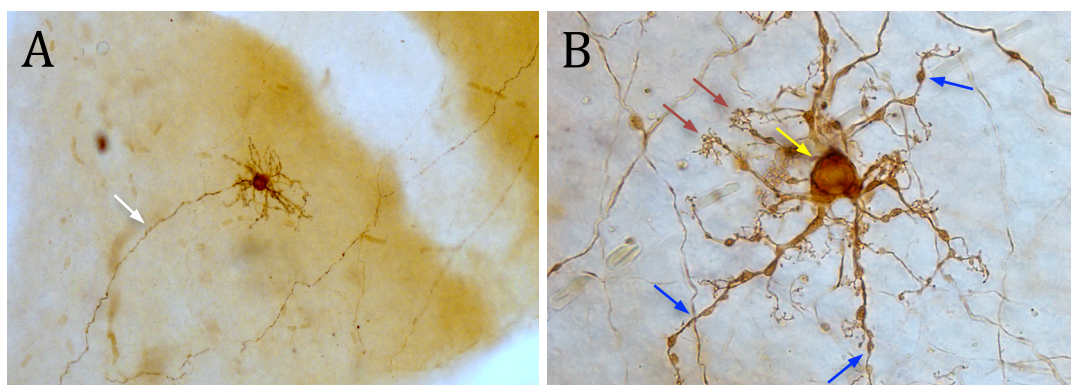


Figura 7 – Exemplo dos detalhes da morfologia de células horizontais de tecido que foi fotooxidado com o novo aparelho. A) Célula observada em objetiva com aumento de 20x, seta branca identificando o axônio. B) Célula fotografada em objetiva de 100x, seta amarela identifica o corpo celular, setas azuis apontam dendritos e as vermelhas os tufos (clusters) dendríticos.

Assim, foi possível observar inclusive diferenças qualitativas na disposição dos neuritos e no tamanho das células de acordo com a excentricidade da retina (Figura 8), o que é importante para estudos quantitativos e mais detalhados acerca da classificação dos subtipos morfológicos e do mosaico das células horizontais na retina humana.

Resultados similares foram obtidos em reações de fotoconversão realizadas com microscópio Eclipse 80i, confirmando a qualidade da fotooxidação do novo aparelho (Figuras 9 e 10), e permitindo identificar, apenas pela observação, algumas características descritas por Kolb (1973) para células horizontais de retina humana (Figura 11). Do mesmo modo, o tempo total de iluminação necessário para obter fotooxidações de boa qualidade foi próximo para ambos os métodos, 2 a 3 horas, e foi possível notar que as células pré e pós-fotooxidação não apresentaram perda evidente da qualidade da marcação.

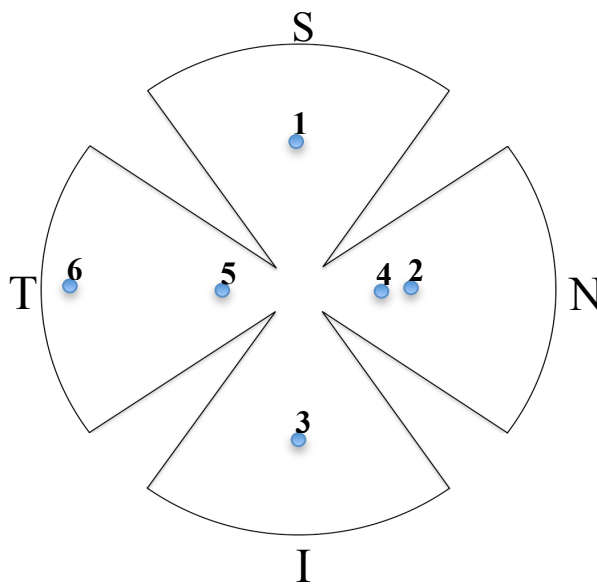
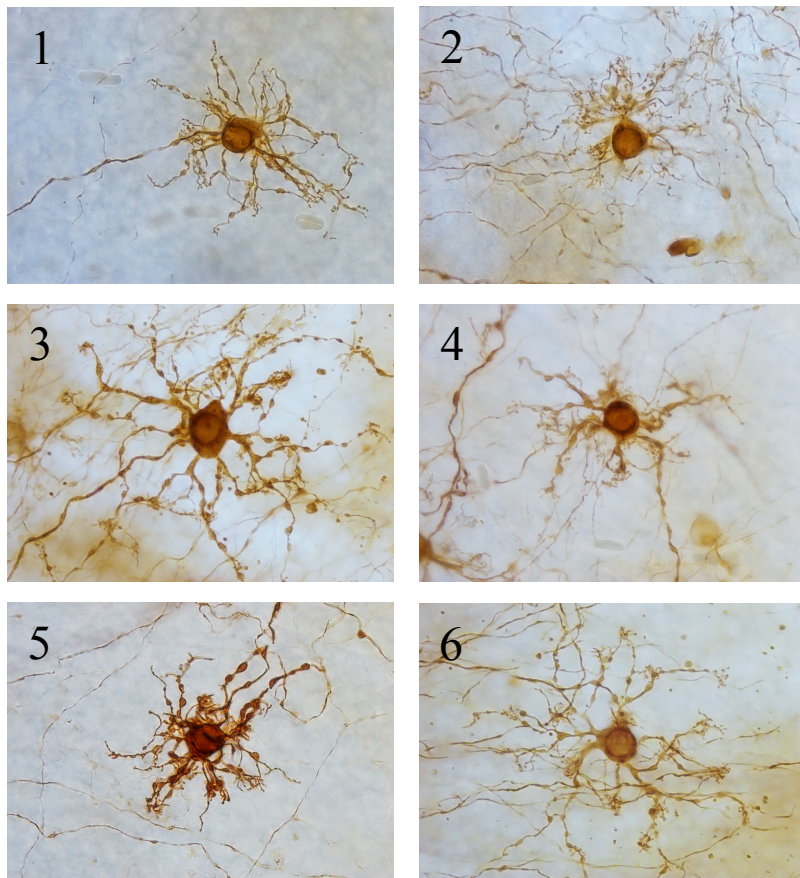


Figura 8 – Exemplos de células horizontais conforme a excentricidade linear na retina a partir da fóvea como referência.

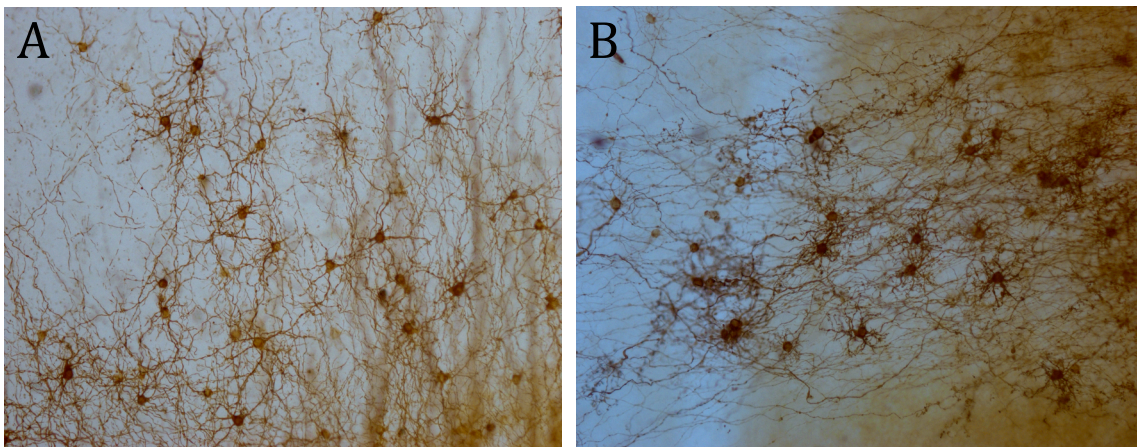


Figura 9 – Comparação entre os tecidos fotooxidados por meio das duas técnicas. A) Células horizontais fotooxidadas no microscópio, objetiva de 20x. B) Células horizontais fotooxidadas no aparelho de LED, objetiva de 20x.

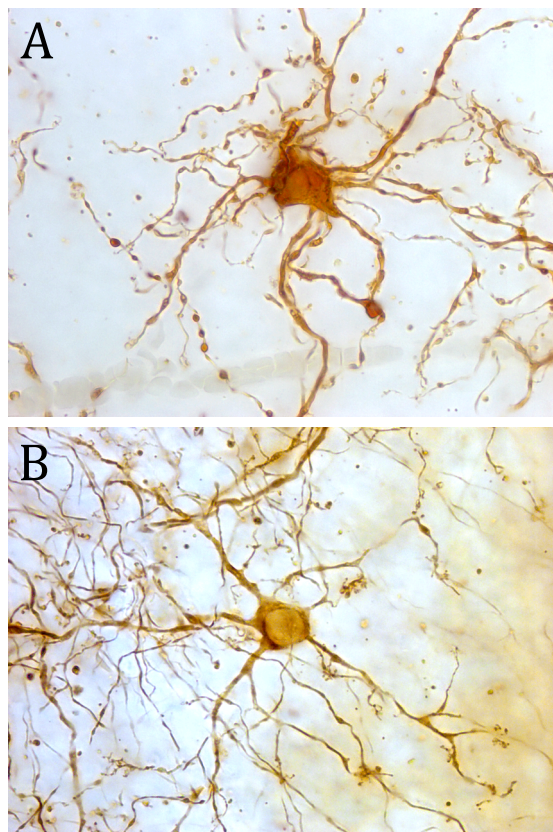


Figura 10 – Comparação da qualidade da fotooxidação por meio das duas técnicas. A) Célula horizontal fotooxidada no microscópio, objetiva de 100x. B) Célula horizontal fotooxidada no aparelho, objetiva de 100x.

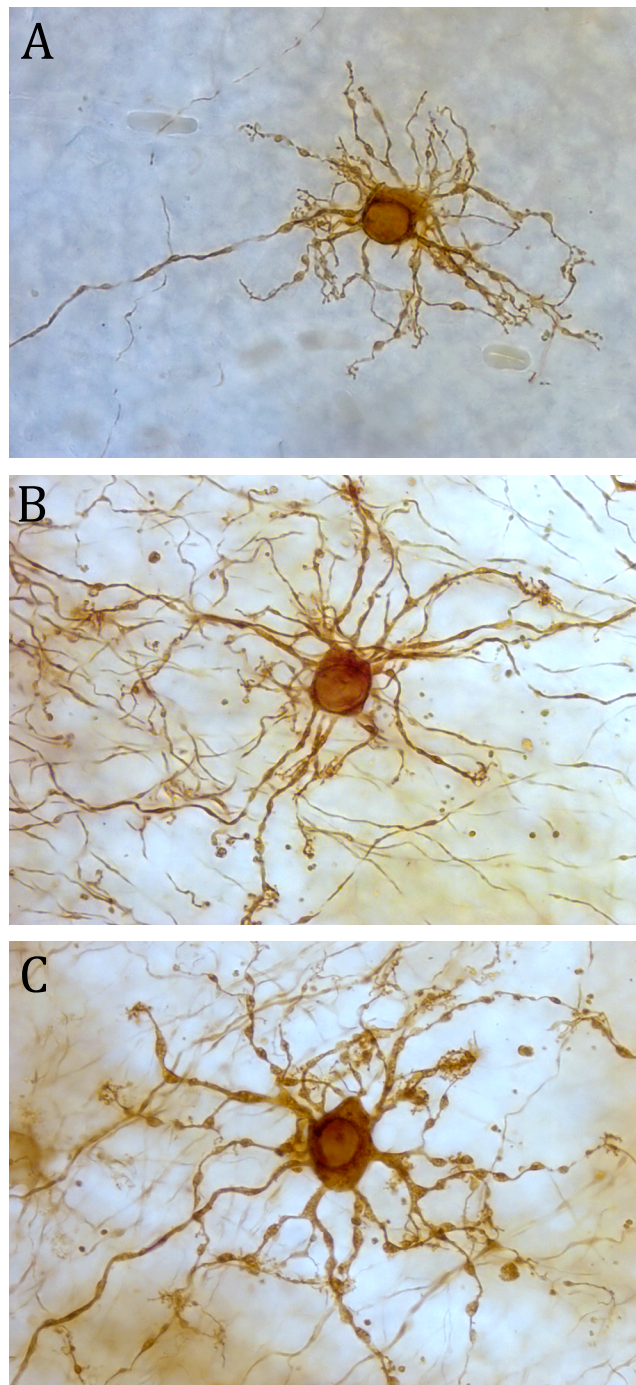


Figura 11 – Exemplos de células horizontais com características descritas por Kolb *et al.* (1994) para a classificação em H1, H2 e H3, objetiva de 100x. A) H1: tamanho inferior ao de H3, área da árvore dendrítica menor e disposta em forma radial. B) H2: processos celulares mais finos em comparação com H1 e H3, árvore dendrítica mais difusa e axônio com conformação menos linear que o dos outros tipos. C) H3: maior que H1, árvore dendrítica assimétrica e com dois ou três dendritos principais semelhantes ao axônio em espessura.

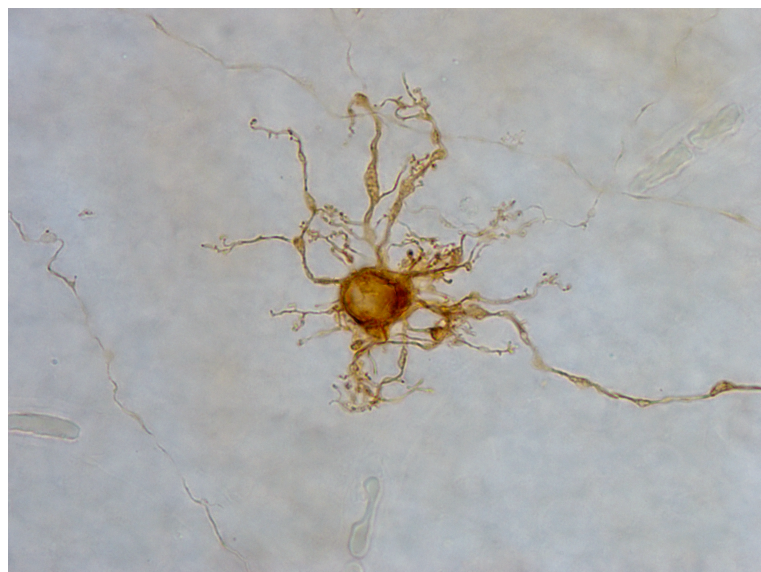
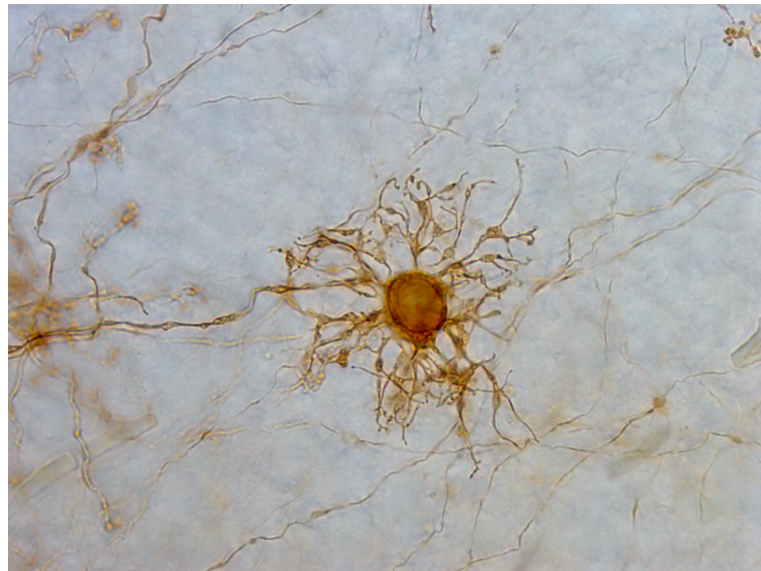
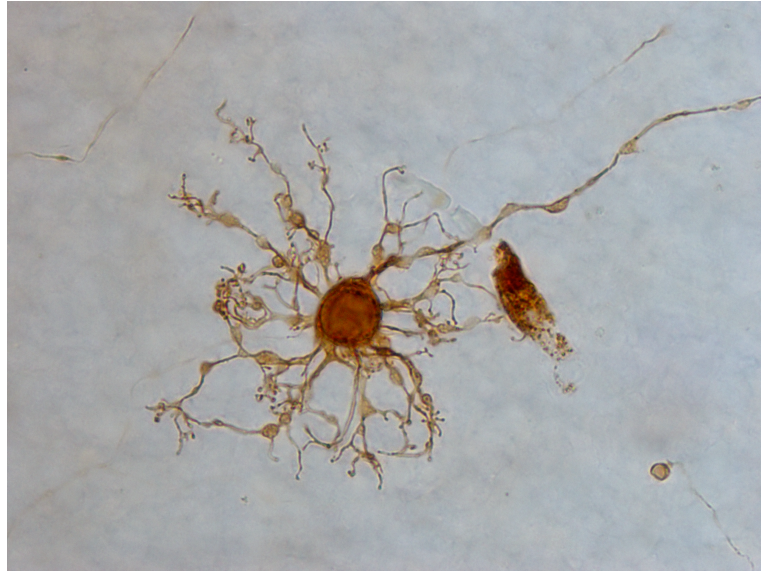


Figura 12 – Exemplos de células horizontais similares às H1 descritas por Kolb *et al.* (1994).

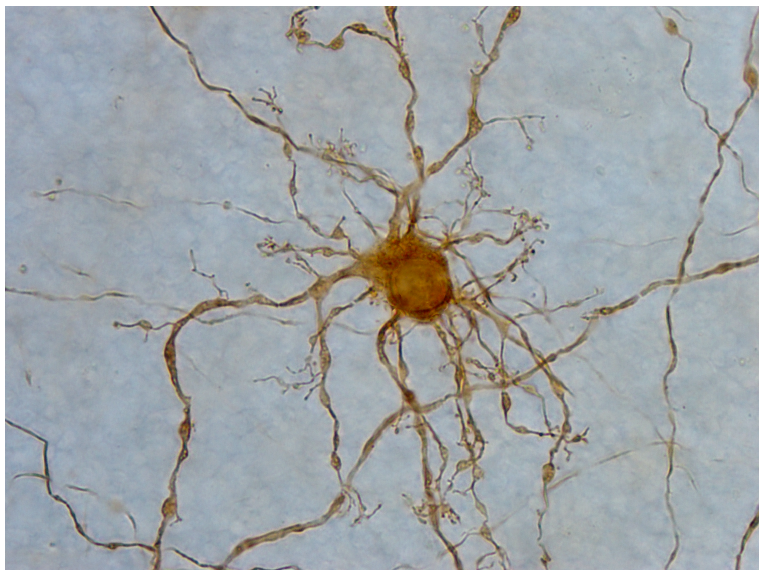
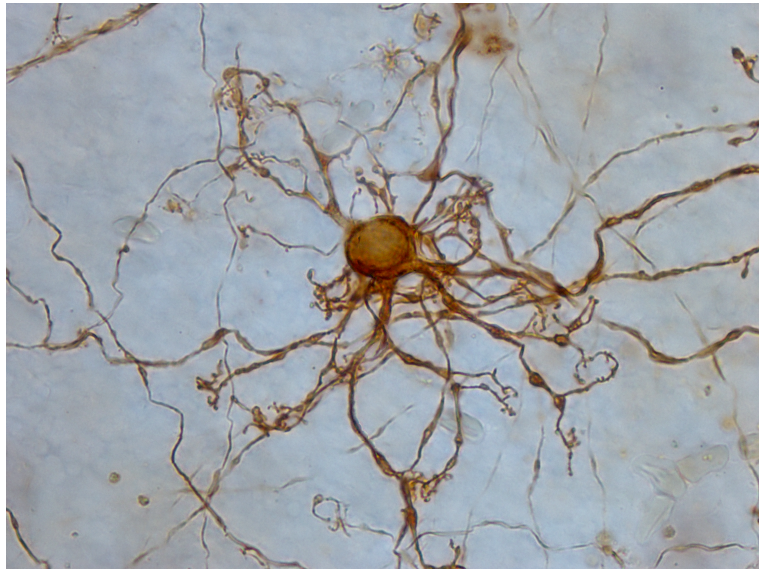
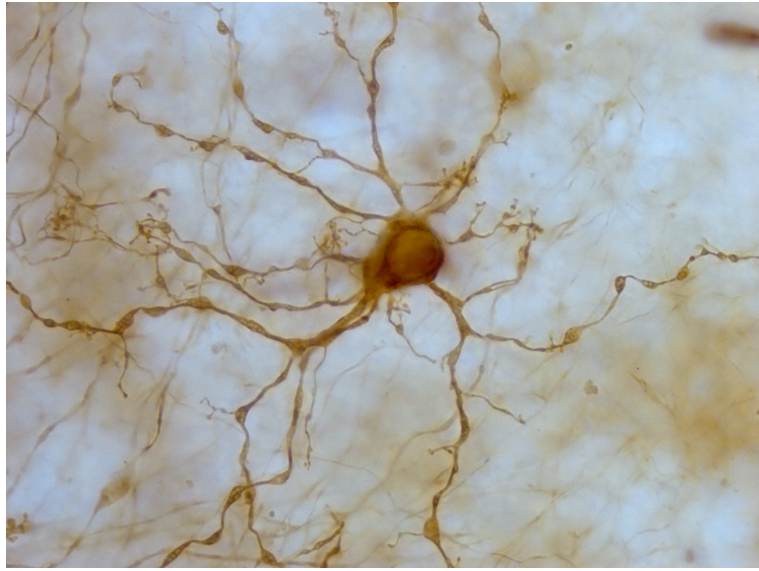


Figura 13 – Exemplos de células horizontais similares às H2 descritas por Kolb *et al.* (1994).

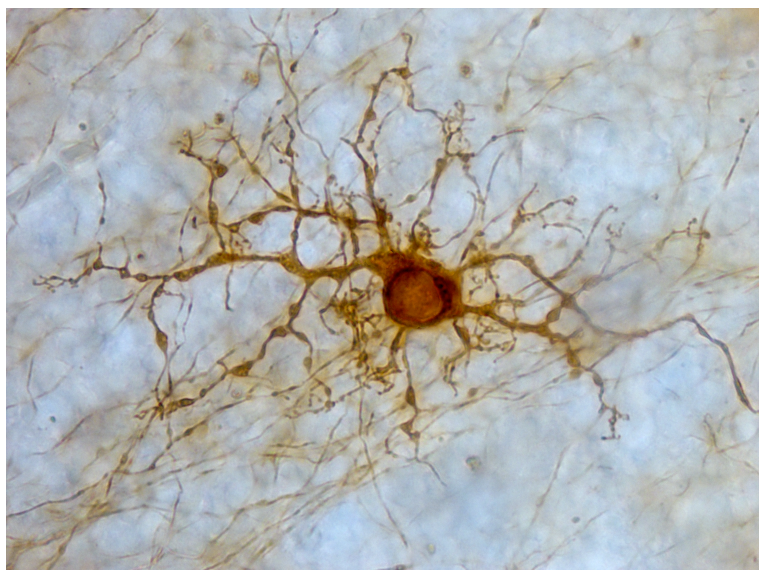
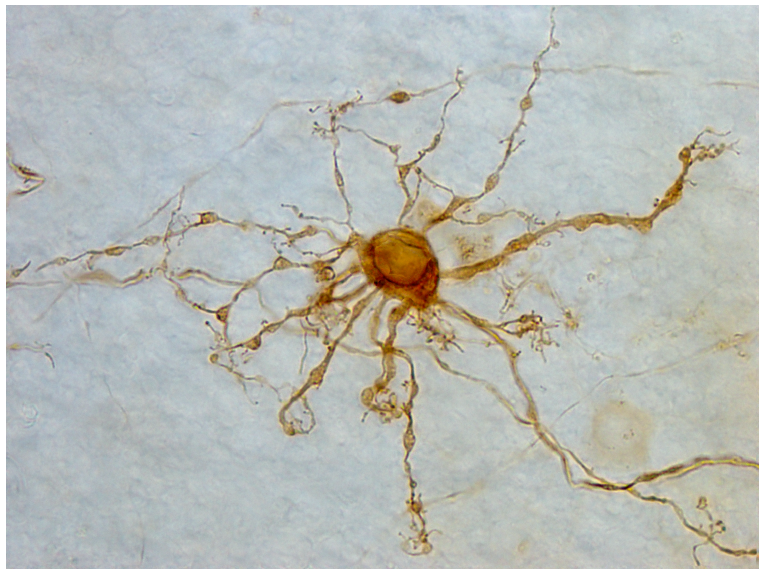
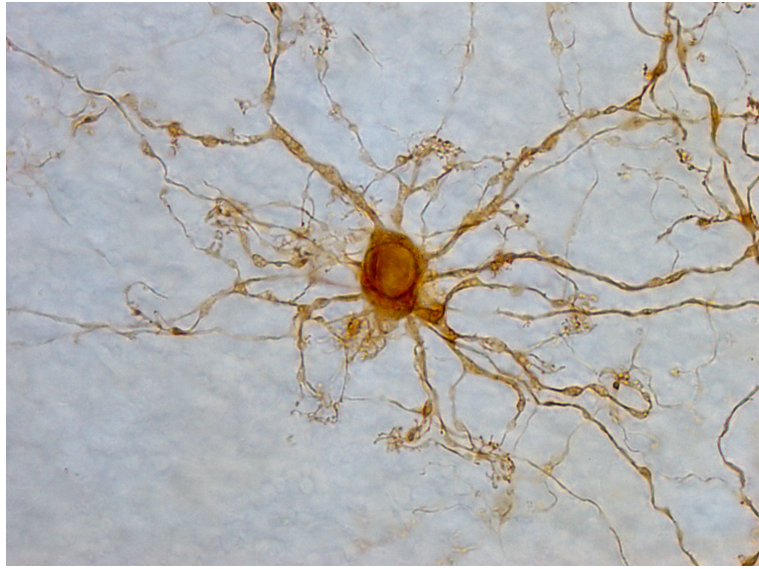


Figura 14 – Exemplos de células horizontais similares às H3 descritas por Kolb *et al.* (1994).

5 DISCUSSÃO

Além das vantagens conhecidas da fotooxidação, como o realce do contraste e ausência de fotodegradação, o método empregado neste estudo tornou desnecessário o uso de microscópio com fluorescência e permitiu a fotooxidação simultânea de diversas regiões marcadas com DiI em amostras grandes de tecidos, diferentemente do que ocorre quando a fotooxidação é feita no microscópio, em que a área submetida à fotooxidação depende do foco da área da lente objetiva.

Essas vantagens tornam esse método mais eficiente com relação ao custo e ao tempo quando comparado com protocolos convencionais de fotooxidação, especialmente para amostras grandes de tecido como a retina humana. Tem-se ainda a ausência de necessidade da microscopia com fluorescência e, conseqüentemente de lâmpadas de mercúrio para essa reação, o que torna o aparelho deste estudo uma eficiente ferramenta alternativa para os atuais protocolos.

Portanto, a área de campo iluminada no microscópio de fluorescência convencional ($\approx 5,5 \text{ mm}^2$) e no fotooxidador ($\approx 42 \text{ mm}^2$), a vida útil da lâmpada de arco em vapor de mercúrio (2.500 horas) e do LED (100.000 horas), e o fato de que o sucesso da reação de fotooxidação dura cerca de três horas, permitem estimar que a área máxima possível de ser fotooxidada com uma lâmpada de mercúrio durante o tempo de vida útil dela é de aproximadamente 4.583 mm^2 , enquanto a área máxima de tecido possível de ser fotooxidada no aparelho utilizado neste estudo durante o tempo de vida do LED é de $1.400.000 \text{ mm}^2$.

Desse modo, combinando os benefícios do LED com o da área do campo de iluminação, acredita-se que a expressiva diminuição de custo sem perda da qualidade do material representa uma importante vantagem para a pesquisa voltada para estudos detalhados da morfologia celular, bem como o mapeamento de estruturas cerebrais.

O método de fotooxidação realizado neste estudo utilizou o DiI, no entanto, a estrutura do aparelho fotooxidador permite um amplo grau de customização pois o LED pode ser trocado por outro com espectro de emissão diferente para realizar a reação de fotooxidação com qualquer outro marcador fluorescente, como corantes e proteínas fluorescentes modificadas geneticamente, uma vez que os LEDs têm um espectro de emissão relativamente amplo.

A técnica de fotooxidação tem sido amplamente empregada em trabalhos com traçadores neuronais para estudo da morfologia de neuritos (MARANTO, 1982; BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; PRUSKY, ARJANNIKOVA, 1999; MEZEY, CSILLAG, 2003, DOS SANTOS *et al.*, 2005). E a utilização de fluorocromos retrógrados e anterógrados para marcar neuritos é uma abordagem clássica para estudo da morfologia celular em tecido nervoso. Assim, a fotooxidação fluorescente com DAB melhora esse método por eliminar o risco de perda do material marcado por fotodegradação e por fornecer imagens com melhor contraste visual para reconstrução manual ou em computador (MARANTO, 1982; BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; MEZEY, CSILLAG, 2003, DOS SANTOS *et al.*, 2005).

Outra importante vantagem dos produtos gerados pela fotooxidação fluorescente com DAB é que eles são eletron-densos e osmiofílicos, o que permite a visualização sob microscopia eletrônica (MEISSLITZER-RUPPITSCH *et al.*, 2009; BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; PAPADOPOULOS, DORI, 1993; GRABENBAUER *et al.*, 2005; SHU *et al.*, 2011; DANTUMA *et al.*, 1998). Nesse contexto, a abordagem utilizada neste estudo tem um amplo alcance de aplicações, desde o estudo de reconstrução de processos neuronais e mapeamento de projeções de longo alcance até a análise da ultraestrutura celular e molecular sob microscopia eletrônica.

Desse modo, os resultados produzidos estão dentro da qualidade necessária para a reconstrução morfológica para estudo de neuritos (BARTHELD, CUNNINGHAM, RUBEL, 1990; SINGLETON, CASAGRANDE, 1996; SANTOS *et al.*, 2012). Além disso, a qualidade das imagens obtidas com o método de iluminação empregado neste estudo apresentou o mesmo nível das imagens obtidas no microscópio com lâmpada de mercúrio. Logo, ambos os métodos exibiram marcações altamente detalhadas das células e dos processos celulares.

Quanto à técnica de inserção do DiI no tecido, pode ocorrer vazamento do cristal para fora das células, o que geralmente se deve a um dano causado pelo próprio material utilizado para colocar o corante, ponta da pipeta ou agulha por exemplo, ou devido à inadequada fixação do tecido, sendo que quando ocorre em virtude deste último fator o vazamento é mais difuso (PRUSKY, ARJANNIKOVA, 1999). Essa marcação difusa foi encontrada em considerável quantidade de material, provavelmente devido ao longo intervalo de tempo que ocorreu entre o óbito e a preservação do globo ocular em solução fixadora para a maior parte do material obtido, o qual era difícil de controlar diretamente por interferir em procedimentos internos do hospital.

Apesar desse viés, foi satisfatória a quantidade de material aproveitada, pois foi possível preservar e dissecar algumas retinas em período inferior a 24 horas após o óbito, as quais apresentaram a melhor qualidade e quantidade de células marcadas. Nessa situação, o mais indicado, portanto, é controlar com cuidado o preparo das soluções e dissecar o mais breve possível a retina para garantir melhores condições do tecido para as marcações.

O marcador fluorescente DiI pode ser usado para converter DAB em uma marcação opaca e eletrônica densa (MARANTO, 1982; REAVES *et al.*, 1982; SANDELL, MASLAND, 1988; BUHL, LÜBKE, 1989). E, está bem estabelecido que o DAB oxida na presença de oxigênio reativo produzido por iluminação (KACZA, 1997). Devido a fotooxidação necessitar de iluminação intensa de uma região pequena do tecido, as células situadas na periferia ou na

área fora da iluminação são convertidas de forma incompleta, limitando o número de células que podem ser recuperadas (PACE, TIEMAN, TIEMAN, 2002).

Essa foi uma dificuldade também encontrada neste estudo que, no entanto foi revertida pelo deslocamento da área irradiada ao longo da reação. Além desse fator, era comum marcar células muito próximas, o que pode dificultar uma análise posterior individual dos neurônios, mas como o DiI marca uma quantidade considerável de células, foi possível compensar essa dificuldade pelo aumento do número de neurônios isolados que foram marcados.

É importante destacar, inclusive, que algumas das medidas seguidas como protocolo foram importantes para a obtenção da qualidade obtida na marcação celular, como: a filtração da solução de DAB antes de ser utilizada, feito preferencialmente com filtros com porosidade de 40 micrômetros de diâmetro ou menos; a troca periódica da solução de DAB durante o processo de fotooxidação, sendo que neste trabalho foi obtido melhor resultado quando essa troca ocorria a cada 30 minutos; a lavagem regular dos materiais usados nos experimentos, mantendo-os livres de contaminantes químicos ou biológicos; e o posicionamento da área principal de interesse no centro do feixe de luz do LED durante a reação.

Além dessas medidas, foram realizadas adaptações do protocolo para fotooxidação de marcadores fluorescentes descrito por Masland (1988) como: manutenção do tecido em temperatura de 37° C para acelerar a difusão do DiI, e ajuste do tempo de troca do DAB conforme a necessidade do processo para o tecido em estudo.

Tais modificações associadas ao emprego do novo aparelho melhoraram substancialmente o procedimento de fotooxidação, pois reduziram o tempo entre inserção do DiI e a fotooxidação, dispensaram o uso de microscopia para fotooxidar, aumentaram a área e, conseqüentemente o número de células, apresentando boa qualidade dos detalhes das células marcadas.

O principal benefício de utilizar corantes fluorescentes para injeção intracelular é a capacidade de monitorar visualmente o procedimento (PACE, TIEMAN, TIEMAN, 2002). Dessa forma, é possível prosseguir com a reação até obter a qualidade desejada, e neste estudo a qualidade obtida permite realizar estudos morfológicos detalhados de análise do tamanho do corpo celular e do campo dendrítico, disposição da árvore dendrítica, dos tufo (clusters) dendríticos e axônios, bem como permitir análise quantitativa das alterações que ocorrem conforme a excentricidade e as regiões da retina.

Assim, o fluorescente DiI pode ser usado para marcação anterógrada e retrógrada de vias neuronais como uma ferramenta útil no campo da neurobiologia por permitir o estudo de redes neurais (HONIG, HUME, 1989; MURAOKA *et al.*, 2007) e, quando seguido do processo de fotooxidação com o aparelho descrito neste estudo, além de prevenir a perda de material por fotodegradação, torna o processo mais rápido, menos oneroso e sem perda evidente de qualidade.

Além de permitir a identificação de circuitos neurais devido à boa marcação de axônios é possível classificar tipos celulares e, mais especificamente, quanto às células horizontais nota-se a necessidade de desenvolver mais estudos morfológicos, pois não se encontram dados morfométricos muito bem estabelecidos para essa população de células na espécie humana da mesma forma que se encontra descrito para outros primatas.

Além disso, os poucos trabalhos com esse propósito em material humano não são recentes e utilizam outras técnicas de marcação, principalmente a de impregnação pela prata (técnica de Golgi). Pode-se, inclusive, tentar classificá-las com base na morfologia axonal tendo em vista a diversidade encontrada durante a observação das células para avaliar a qualidade do aparelho deste estudo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo processo de fotooxidação empregando a luz produzida em dispositivo de estado sólido, o LED, foram promissores. O processo foi capaz de revelar detalhes finos da morfologia celular, um indicativo a mais da eficiência da técnica utilizada, que demonstrou ser capaz de induzir reações de fotooxidação com segurança por resultar em marcação de alta qualidade das células no tecido nervoso com eficiência superior à dos métodos disponíveis anteriormente.

Além disso, o dispositivo permitiu a redução considerável do custo dessa técnica, que originalmente acontece em microscópio com fluorescência, convencional ou confocal. Um outro ponto a ser considerado é que o novo método permitiu ao investigador processar áreas maiores de tecido, reduzindo substancialmente o tempo de fotooxidação e sem perda de qualidade.

REFERÊNCIAS

AJIOKA, I; MARTINS, R. A; BAYAZITOV, I. T; DONOVAN, S; JOHNSON, D. A; FRASE, S; CICERO, S. A; BOYD, K.; ZAKHARENKO, S. S; DYER, M. A. Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. **Cell**, v. 131, p. 378-390, 2007.

BARTHELD, C. S. Von; CUNNINGHAM, D. F; RUBEL, E. W. Neuronal tracing with DiI: decalcification, cryosectioning and photoconversion for light and electron microscopic analysis. **J Histochem Cytochem**, v. 38, n. 5, p. 725-733, 1990.

BENTIVOGLIO, M; SU, H. S. Photoconversion of fluorescent retrograde tracers. **Neuroscience Letters**, v. 113, p. 127-133, 1990.

BOYCOTT, B. B; KOLB, H. The horizontal cells of the rhesus monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v.148, n. 1, p. 115-140, 1973.

BOYCOTT, B. B; DOWLING, J. E. Organization of the primate retina: Light microscopy. **Phil. Trans. B**, v. 255, p. 109-176, 1969.

CAPANI, F; DEERINCK, T. J; ELLISMAN, M. H; BUSHONG, E; BOBIK, M, et al. Phalloidin-Eosin Followed by Photo-oxidation A Novel Method for Localizing F-Actin at the Light and Electron Microscopic Levels. **J Histochem Cytochem**, v. 49, p. 1351–1361, 2001.

CHOI, D., LI, D; RAISMAN, G. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Flu- oro-Gold and DiI. **J. Neurosci. Methods**, v. 117, p. 167–172, 2002.

DACEY, D. M; LEE, B. B; STAFFORD, D. K; POKORNY, J; SMITH, V. C. Horizontal cells of the primate retina: cone specificity without spectral opponency. **Science**, New York, v. 271, p. 656-659, 1996.

DANTUMA, N. P; PIJNENBURG, M. A. P; DIEDEREN, J. H. B; HORST, D. J. V. der. Electron Microscopic Visualization of Receptor-mediated Endocytosis of DiI-labeled Lipoproteins by Diaminobenzidine Photoconversion. **J Histochem Cytochem**, v. 46, p. 1085–1089, 1998.

DA SILVA FILHO, M; SANTOS, D. V; COSTA, K. M. A new low cost wide-field illumination method for photooxidation of intracellular fluorescent markers. **Revista Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.

DEERINCK, T. J; MARTONE, M. E; LEV-RAM, V; GREEN, D. P; TSIEN, R. Y, et al. Fluorescence photooxidation with eosin: a method for high resolution immunolocalization and in situ hybridization detection for light and electron microscopy. **J Cell Biol**, v. 126, p. 901–910, 1994.

DOS REIS, J. W. L.; CARVALHO, W. A.; SAITO, C. A.; SILVEIRA, L. C. L. The morphology of horizontal cells in the retina of the capuchin monkey. *Cebus paella*: how many horizontal cells classes are found in dichromatic primates? **Journal of Comparative Neurology**, v. 443, p. 105-123, 2002.

DOS SANTOS, S. N.; DOS REIS, J. W. L.; DA SILVA FILHO, M.; KREMERS, J.; SILVEIRA, L. C. L. Horizontal cell morphology in nocturnal and diurnal primate: a comparison between owl-monkey (*Aotus*) and capuchin monkey (*Cebus*). **Vis Neurosci**, v. 22, n. 4, p. 405-415, 2005.

GAN, W.; GRUTZENDLER, J.; WONG, W. T.; WONG, R. O. L.; LICHTMAN, J. W. Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. **Neuron**, vol. 27, 219–225, 2000.

GHOSH, K. K.; GRÜNER, T. U. Synaptic input to small bistratified (blue-ON) ganglion cells in the retina of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. **J Comp Neurol**, v. 413, p. 417–428, 1999.

GHOSH, K. K.; MARTIN, P. R.; GRÜNERT, U. Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World, the marmoset *Callithrix jacchus*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 379, p. 211-225, 1997.

GODEMENT, P. et al. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. **Development**, v. 101, p. 697–713, 1987.

GOODCHILD, A. K.; CHAN, T. L.; GRÜNERT, U. Horizontal cells connections with short-wavelength-sensitive cones in macaque monkey retina. **Visual Neuroscience**, v. 13, p. 833-845, 1996.

GRABENBAUER, M.; GEERTS, W. J. C.; FERNADEZ-RODRIGUEZ, J.; HOENGER, A.; KOSTER, A. J, et al. Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. **Nat Methods**, v. 2, p. 857–862, 2005.

HOLMQVIST, B. I.; OSTHOLM, T.; EKSTROM, P. DiI tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemo architectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. **J. Neurosci. Meth**, v. 42, p. 45-63, 1992.

HONIG, M. G; HUME, R. I. DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathway tracing. **TINS**, v. 12, p. 333-335, 1989.

KOLB, H.; MARIANI, A; GALLEGGO, A. A second type of horizontal cell in the monkey retina. **Journal of Comparative Neurology**, v. 189, p. 31-44, 1980.

KOLB, H.; FERNANDEZ, E.; SCHOUTEN, J.; AHNELT, P.; LLNBERG, K, A.; FISHER, S. K. Are there three types of horizontal cell in the human retina? **The Journal of Comparative Neurology** 343:370-386, 1994.

LÜBKE, J. Photoconversion of diaminobenzidine with different fluorescent neuronal markers into a light and electron microscopy dense reaction product. **Microsc Res Tech**, v. 24, p. 2-14, 1993.

MARANTO, A. R. Neuronal mapping: a photooxidation reaction makes Lucifer yellow useful for electron microscopy. **Science**, v. 217, p. 953-955, 1982.

MEISLITZER-RUPPITSCH, C; RÖHRL, C; NEUMÜLLER, J; PAVELKA, M; ELLINGER, A. Fotooxidation technology for correlated light and electron microscopy. **J Microsc**, v. 235, p. 322-335, 2009.

MEZEY, S. E; CSILLAG, A. The light and electron microscopic characterisation of identified striato-ventro tegmental projection neurons in the domestic chick (*Gallus domesticus*). **Neurosci Res**, v. 47, p. 299–308, 2003.

PAPADOPOULOS, G. C; DORI, I. DiI labeling combined with conventional immunocytochemical techniques for correlated light and electron microscopic studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 46, p. 251-258, 1993.

PEICHL, L.; GONZALEZ-SORIANO, J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. **Vis. Neurosci**, v. 11, p. 501-517, 1994.

POCHE, R. A; REESE, B. E. Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. **Development**, v. 136, p. 2141–2151, 2009.

POLYAK, S. L. The retina. **University of Chicago Press**, Chicago, v. 83, n. 4, p. 597-601, 1941.

PRUSKY, G; ARJANNIKOVA, T. Intracellular filling and reconstruction of identified neurons in fixed rat brain slices. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 3, p. 313–319, 1999.

RAMÓN y CAJAL, S. **Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés**. Paris: A. Maloine, 1909.

RAMÓN y CAJAL, S. La rétine des vertébrés. La cellule. Cap. 9, p. 125-255. In: RODIECK, R. W. **The vertebrate retina**. MAGUIRE, D; RODIECK, R. W. transls. San Francisco: Freeman, p. 775-904, 1893.

RAVEN, M. A; OH, E. C; SWAROOP, A.; REESE, B. E. Afferent control of horizontal cell morphology revealed by genetic respecification of rods and cones. **J. Neurosci**, v. 27, p. 3540-3547, 2007.

SANDELL, J. H. MASLAND, R. H. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. **J Histochem Cytochem**, v. 36, p. 555-559, 1988.

SANTOS, D. V. V; COSTA, K. M; VAZ, M. C. G; DA SILVA FILHO, M. Relationships between dendritic morphology, spatial distribution and firing patterns in rat layer 1 neurons. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 0-0, 2012.

SHU X, LEV-RAM V, DEERINCK TJ, QI Y, RAMKO EB, et al. A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms. **PLoS Biol**, v. 9, 2011.

SINGLETON, C. D; CASAGRANDE, V. A. A reliable and sensitive method for fluorescent photoconversion. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 64, p. 47-54, 1996.

SQUIRE, L. R; BERG, D; BLOOM, F; DU LAC, S; GHOSH, A. **Fundamental Neuroscience**. 3^a.ed. Academic Press, 2008.

VIDAL-SANZ, M; VILLEGAS-PEREZ, M. P; BRAY, G. M; AGUAYO, A. J. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. **Exp Neurol**, v. 102, p. 92–101, 1988.

ANEXO – AUTORIZAÇÃO PARA A PESQUISA



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
HOSPITAL OPHIR LOYOLA



DIRETORIA DE ENSINO E PESQUISA
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA
DIVISÃO DE PESQUISA
RE-AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

Belém, 10 de maio de 2012

À Chefia,
da Divisão de Banco de Olhos.

Sr. Chefe,

Apresentamos os pesquisadores **Alexandre Marques Rosa** (pesquisador responsável), os professores Doutores(as): **Carolina Beltrame Del Debbio, Cristiano Neiva Pessôa, Dânia Emi Hamassaki, Dora Selma Fix Ventura, Manoel da Silva Filho, Silene Maria Araújo de Lima** e os alunos, **André Maurício Passos Liber, Flávia Moura Gaia Farias, Juliana Fonseca de Araújo, Lucas Daniel de Almeida Fernandes, Phelipe Augusto Rabelo Paixão e Priscila Sayami Akamine**, os mesmos estão autorizados a realizar pesquisa de dados, no período de **10/05/12 a 30/12/12**, para o projeto intitulado: **“Análise Imunocitoquímica em retina humana de olhos captados de doadores de córnea”**. O referido está de acordo com a Resolução nº 196/96 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pará- ICS/UFPA.

Esclarecemos que o projeto acima citado Processo Nº 2012/20468 obedeceu todos os trâmites legais dentro desta Instituição culminado nesta autorização. Os mesmos estão LIBERADOS para o início da pesquisa, sendo obrigatório entregar a esta Divisão, os relatórios de acompanhamento e o trabalho de conclusão ao final da pesquisa obedecendo a regulamentação de Projetos de Pesquisa do HOL.

Certos de Vossa atenção colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,

Rinaldo Antônio Almeida Gonçalves
Chefe da Divisão de Pesquisa