

RAQUEL MAGGESISSI SANTOS

**MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO GABAÉRGICA
POR ÓXIDO NÍTRICO NA RETINA DE GALINHA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

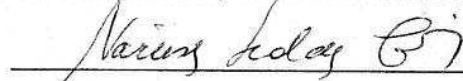
RAQUEL MAGGESISSI SANTOS

"MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO GABAÉRGICA POR ÓXIDO NÍTRICO NA RETINA DE GALINHA"

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 11 DE FEVEREIRO DE 2008



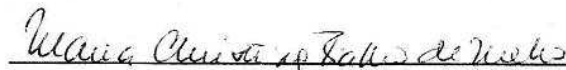
DRA. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOFÍSICA)



DRA. PATRÍCIA FRANCA GARDINO (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADORA



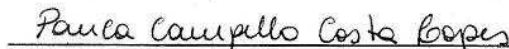
DRA. KARIN DA COSTA CALAZA (DOUTOR - U.F.F.) - CO-ORIENTADORA



DRA. MARIA CHRISTINA FIALHO DE MELLO (DOUTOR - UFRJ) - REVISORA



DRA. OLGA MARIA MARTINS SILVA DE ALMEIDA (DOUTOR - UERJ)



DRA. PAULA CAMPELLO COSTA LOPES (DOUTOR - U.F.F.)



DR. RICARDO AUGUSTO DE MELO REIS (DOUTOR - UFRJ)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO GABAÉRGICA POR ÓXIDO
NÍTRICO NA RETINA DE GALINHA**

RAQUEL MAGGESISSI SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadora: Dr^a Patrícia Franca Gardino

Co-orientadora: Dr^a Karin da Costa Calaza

Rio de Janeiro

Fevereiro/2008

Ficha Catalográfica

Santos, Raquel Maggesissi

Modulação da transmissão GABAérgica por óxido nítrico na retina de galinha / Raquel Maggesissi Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008. xiii, 115 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Patricia Franco Gardino e Karin da Costa Calaza

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica, 2008.

Referências bibliográficas: f. 94-115

1. Óxido nítrico - metabolismo. 2. Ácido gama-aminobutírico – metabolismo. 3. Ácido Glutâmico - metabolismo. 4. Embrião de galinha. 5. . Retina – fisiologia. 6. Biofísica – Tese. I. Gardino, Patricia Franco. II. Calaza, Karin da Costa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas. IV. Título.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Neurobiologia da Retina, do Programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e no laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Neurobiologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, sob orientação da Prof^a Dr^a Patrícia Franca Gardino e da Prof^a Dr^a Karin da Costa Calaza. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Agradecimentos

A realização desta trajetória foi possível graças ao imenso apoio que recebi da minha família. Foram (e são) muito valiosos para mim os conselhos recebidos, a torcida para alcançar um objetivo, a comemoração pelas conquistas, e o consolo diante das dificuldades. Por todo esse amor que constitui a base da minha força, agradeço à minha mãe, à minha irmã e ao meu pai.

Agradeço ao meu namorado Marcus por toda dedicação, por sempre estar disposto a me ajudar em todas as situações e por preencher a minha vida com muito amor e alegria. Quero agradecer à minha orientadora e amiga Karin, uma profissional excepcional com quem tive o privilégio de aprender muito. Dedicada e apaixonada pelo que faz, está sempre disposta a discutir projetos, artigos, tirar dúvidas, enfim, ela não mede esforços quando o assunto é a formação de seus alunos. Além de tudo, é a conselheira dos momentos difíceis. Agradeço também à minha orientadora Paty, por toda doçura e segurança que ela transmite. Na correria e tensão da defesa, eu entrava na sala dela achando que nada daria certo, e saía convicta de que nada daria errado.

Agradeço aos professores Ana Ventura, Maria Christina, Olga, Paulinha e Ricardo, por comporem a banca desta dissertação, contribuindo com o meu crescimento neste momento tão importante, ao professor Roberto por sua presença fundamental no meu trabalho e ao professor Fernando por seu apoio.

Quero agradecer aos meus amigos do laboratório pela oportunidade de conhecer várias pessoas fantásticas, de grande competência e criatividade. Gostaria de poder falar um pouco sobre cada uma, mas como desenvolvi meu projeto em dois laboratórios e em ambos estão várias pessoas que prezo muito, não poderei falar de todos. Mas não posso deixar de falar ao menos dos Karinérgicos da UFF, com os quais a convivência foi maior. Elisa, Rafael e Vivian, como eu adoro vocês! Elisa é toda carinhosa, prestativa e divertida, ela tem a alma cor de rosa. Rafael é o nosso Sorriso que adora fazer show ao vivo cantando pelas bancadas da vida. Vivian é a soma da dedicação de todas as pessoas do mundo, ficou tudo concentrado nela. Ela é incrível! Assim, estas pessoas e todas as outras que não pude mencionar, mas também estão em meu coração, tornam cada dia de trabalho em um dia com muita emoção.

Enfim, agradeço a todos os demais que estavam próximos durante este aprendizado, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para que este sonho se tornasse realidade.

Resumo

O óxido nítrico (NO) pode ser um fator importante no processamento da informação na retina ou em outras regiões do sistema nervoso central (SNC) por modular, entre outras coisas, a transmissão GABAérgica. No presente estudo foi verificada a ação do NO endógeno como modulador do sistema GABAérgico endógeno na retina intacta de galinha. Em retinas imunoprocessadas para GABA, a liberação deste aminoácido induzida por NMDA foi bloqueada por um inibidor da enzima que sintetiza NO (NOS) na camada de células ganglionares (CCG). Além disso, o tratamento com o precursor da síntese de NO, L-arginina (1mM), induziu diminuição do número de células GABA+ nesta camada celular. Em células amácrinas na camada nuclear interna (CNI) o inibidor da NOS e o tratamento com L-arginina (1mM) não tiveram efeito. Entretanto, o tratamento com L-arginina (100µM) ou com doador de NO, SNAP (500µM), aumentou o número de células GABA+ em ambas camadas. O efeito da L-arginina (100µM) foi bloqueado pelo inibidor da NOS, e a aplicação deste inibidor sozinho induziu redução do número de células GABA+. O tratamento em meio sem sódio bloqueou o efeito da L-arginina (100µM), sugerindo que NO inibe a liberação dependente de sódio e não a degradação de GABA. O efeito da L-arginina (100µM) foi bloqueado totalmente por um inibidor da enzima cinase dependente de GMPC (PKG) na CNI e parcialmente na CCG. O inibidor da PKG sozinho não afetou a liberação de GABA. A inibição da liberação basal de GABA pelo NO é dependente de cálcio, pois em meio sem cálcio o efeito do SNAP (500µM) não foi observado. Na retina de 8 dias embrionário (E8), o tratamento com L-arginina (100µM) inibiu a liberação basal de GABA apenas na CCG, enquanto em E14 a liberação foi inibida nos dois tipos celulares. Estes dados levantam a possibilidade de que a produção de NO em alta concentração (estimulada por receptores NMDA ou L-arginina 1mM) induzem liberação de GABA na CCG, enquanto a produção basal e moderada (estimulada por L-arginina 100µM ou SNAP 500µM) de NO inibem a liberação basal de GABA em ambos os tipos celulares, por mecanismo independente ou dependente de PKG, respectivamente. Portanto, o nível de excitabilidade neuronal pode depender da concentração de NO e de subseqüentes aumentos ou reduções na liberação de GABA.

Abstract

Nitric oxide (NO) can be an important factor in the information processing of the retina or other regions of the central nervous system (CNS) because it modulates, among other things, GABAergic transmission. In the present work, the action of endogenous NO as a modulator of the endogenous GABA was studied in the chick intact retina. In retina immunoprocessed for GABA, the release of this amino acid induced by NMDA was blocked by inhibitors of the enzyme that synthesizes NO (NOS) in the ganglion cell layer (GCL). Additionally, treatment with the precursor for the synthesis of NO, L-arginine 1 mM, induced an increase in the number of GABA+ cells in this layer. In amacrine cells of the inner nuclear layer (INL) the treatment with inhibitors of the NOS or with L-arginine (1mM) had no effect. However, treatment with L-arginine (100 μ M) or with a NO donor, SNAP (500 μ M), enhanced the number of GABA+ cells in both layers. The effect of L-arginine (100 μ M) was blocked by the addition of the NOS inhibitor, and this inhibitor alone induced an increase in the number of GABA+ cells. The absence of sodium blocked the effect of L-arginine (100 μ M), indicating that NO acts by inhibiting the sodium-dependent release and not on degradation of GABA. The effect of L-arginine (100 μ M) was totally blocked by an inhibitor of the cGMP-dependent kinase (PKG) in the GCL and partially in the INL. PKG inhibitor alone did not affect GABA. The effect of NO is calcium-dependent because the absence of this ion blocked the effect of SNAP (500 μ M). In retinas from 8 day old chick embryos (E8), the inhibition of GABA release by treatment with L-arginine (100 μ M) was observed only in the GCL, while in E14 it was observed both in the GCL and INL. These data suggest that production of high levels of NO (stimulated by activation of NMDA receptors or by L-arginine 1mM) induces GABA release in the GCL, while basal and moderate (stimulated by L-arginine 100 μ M or SNAP 500 μ M) levels of NO inhibit this release in both cell layers by mechanisms independent or dependent of PKG, respectively. Therefore, the level of neuronal excitability may depend on the concentration of NO and subsequent increases or decreases in GABA release.

Lista de abreviaturas

[³H]GABA - GABA tritiado

7-NI - 7-nitroindazole / inibidor específico da NOSn

ABC - avidina-biotina peroxidase

AI e II - arginase I e II

AL - arginino succinato liase

AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-iso-xazole-propiónico

AMPc - adenosina 3, 5 - monofosfato cíclico

AS - arginino succinato sintase

BSA - albumina de soro bovino

CAMKII - cinases dependente de cálcio/calmodulina II

CCG - camada de células ganglionares

CNE - camada nuclear externa

CNG - canal iônico dependente de nucleotídeo cíclico

CNI - camada nuclear interna

CNQX – 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

CPE - camada plexiforme externa

CPI - camada plexiforme interna

CTR - controle

DAB - diaminobenzidina tetrahydroclorito / cromógeno

DMEM – meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

E - dia embrionário

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético / quelante de Mg^{2+}

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FMN - flavina mononucleotídeo

GABA - ácido γ -aminobutírico

GABA+ - células GABA positivas

GABA-T - GABA-transaminase

GAD - descarboxilase do ácido glutâmico

GAT - transportador de GABA

GCs - guanilato ciclase solúvel

GMPc - guanosina 3'-5' monofosfato cíclico

GS-FDH - deidrogenase formaldeído dependente de glutationa

GTP - guanosina trifosfato

GVG - γ -vinil-GABA / análogo de GABA

IBMX – 3-isobutil-1-metil-xantina

iGluR- receptor ionotrópico de glutamato

IR-GABA – (célula) imunorreativa para GABA

KA - cainato

K_m - constante enzimática de Michaelis-Menten

KT5823 - ácido okadaico / inibidor da PKG

L-Arg - L-Arginina

L-NA - N ω -nitro-L-arginina / inibidor competitivo da NOS

mGluR - receptor metabotrópico de glutamato

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato

NMDA - N-metil-d-aspartato

NO - óxido nítrico

NOS - sintase do óxido nítrico

NOS_e ou NOS_{III} - sintase do óxido nítrico endotelial

NOS_i ou NOS_{II} - sintase do óxido nítrico induzida

NOS_n ou NOS_I - sintase do óxido nítrico neuronal

ODQ - 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona

PBS - tampão salina fosfato

PDE - fosfodiesterase

PE – pós-eclosão

PKA - proteína cinase dependente de AMPc

PKC - proteína cinase dependente de cálcio

PKG - proteína cinase dependente de GMPc

PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDa

SNAP - *S*-nitroso-*N*-acetil-penicilamina

SNC - sistema nervoso central

SSADH - semialdeído succínico deidrogenase

TBS - tampão tris salina

TF - tampão fosfato

TRIS – tris-(hidroximetil)-aminometano

VGAT - transportador vesicular de GABA

Zaprinast - 2-O-propoxifenil-8-azapurina-6-ona / inibidor de fosfodiesterase de GMPc

SUMÁRIO

Ficha catalográfica	iv
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
I. INTRODUÇÃO	1
1. GABA.....	1
2. GLUTAMATO.....	7
3. ÓXIDO NÍTRICO	8
3.1. Biossíntese de NO	9
3.2. Mecanismos de atuação do NO.....	12
3.3. Modulação da liberação de neurotransmissores por NO	14
3.3.1. Modulação da Transmissão GABAérgica por NO em diferentes regiões do SNC.....	16
4. A RETINA	18
4.1. Estrutura e desenvolvimento da retina.....	18
4.2. Localização Celular de Aminoácidos Neurotransmissores na Retina de Galinha	20
4.3. Fisiologia da retina	21
4.4 NO na retina	31
5. LIBERAÇÃO DE GABA NA RETINA	33
5.1. Liberação de GABA induzida por glutamato na retina	33
5.2. NO e Liberação de GABA Na Retina	33
II. OBJETIVOS	36
1. OBJETIVO GERAL.....	36

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
III. MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. REAGENTES	37
2. DISSECAÇÃO DAS RETINAS.....	37
3. EXPERIMENTO DE ESTIMULAÇÃO DO TECIDO.....	38
3.1. Estimulação do tecido.....	38
3.2. Fixação e Obtenção do Tecido.....	39
3.3. Imunohistoquímica	41
3.4. Análise quantitativa	43
4. DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE [³ H] GABA	44
IV. RESULTADOS	46
1. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO GABA ENDÓGENO	46
1.1 Papel do NO na Liberação de GABA estimulada por NMDA	46
1.2 Efeito do aumento da produção de NO estimulada por L-Arginina na liberação basal e/ou degradação de GABA endógeno.....	53
1.3 Efeito do NO na liberação de GABA exógeno	68
1.4 Mecanismos da modulação da liberação basal de GABA endógeno por NO: envolvimento da via NO-GCs-GMPc-PKG	69
1.5 Efeito do NO na atividade do receptor NMDA	72
1.6 Participação do cálcio no efeito do NO sobre a liberação basal de GABA.....	74
V. DISCUSSÃO	77
VI. CONCLUSÃO	92
VII. BIBLIOGRAFIA.....	94

I. INTRODUÇÃO

Neste trabalho estudaremos a modulação do sistema GABAérgico, principal neurotransmissor inibitório, pelo óxido nítrico utilizando o modelo da retina. Para tal, trataremos de alguns temas nesta introdução que julgamos importantes para a compreensão do nosso estudo, como os sistemas GABAérgico, glutamatérgico e nitrérgico, bem como a morfologia da retina.

1. GABA

Durante as décadas de 1950 e 1960 foram encontradas fortes evidências de que o ácido γ -aminobutírico (GABA) atuava como neurotransmissor inibitório no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados (Matsuda *et al.*, 1956; Roberts *et al.*, 1964). Na década de 1970, o GABA foi detectado no sistema nervoso de mamíferos (Bloom e Iversen, 1971). A descoberta da inibição sináptica direta, tendo o GABA como primeiro exemplo claro de neurotransmissor inibitório, alterou a concepção de transmissão sináptica, até então entendida apenas como transmissão excitatória (para revisão, Owens e Kriegstein, 2002). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), incluindo a retina de diferentes espécies de animais (Mosinger *et al.*, 1986; Yang, 2004; Yazulla *et al.*, 1989). No SNC o equilíbrio entre excitação e inibição neuronal é um fator essencial que deve ser mantido para proporcionar o desempenho correto de funções fisiológicas e evitar consequências patológicas. Agentes que bloqueiam a sinalização GABAérgica no SNC podem provocar convulsões, enquanto agentes que aumentam esta sinalização apresentam efeitos sedativos e anticonvulsivos (Ben-Ari, 2002).

O GABA é sintetizado a partir do glutamato em uma reação catalisada por duas isoformas da enzima descarboxilase do ácido glutâmico: GAD65 e GAD67 (Roberts e Kuriyama, 1968). O GABA já se encontra presente em fases precoces do desenvolvimento retiniano, sendo detectado a partir do 6º dia embrionário de galinha (E6), enquanto a enzima GAD é detectada apenas a partir de E10 (Hokoç *et al.*, 1990). Nos períodos que precedem à expressão de GAD, o GABA é sintetizado por uma via alternativa a partir de putrescina (De Mello *et al.*, 1976; De Mello *et al.*, 1993; Hokoç *et al.*, 1990). Ao longo do desenvolvimento, esta via alternativa é gradativamente substituída pelo aumento da atividade da GAD.

O GABA, sintetizado pela isoforma GAD65, é carregado em vesículas sinápticas por transportadores vesiculares (VGAT) (Fon e Edwards, 2001), enquanto o GABA sintetizado pela GAD67 serviria como metabólito (Waagepetersen *et al.*, 1999) ou como *pool* destinado à liberação não vesicular (Andrade da Costa *et al.*, 2000; Kaufman *et al.*, 1991). A liberação de GABA pode ocorrer por exocitose, dependente de cálcio (Ferreira *et al.*, 1994), ou por reversão do transportador, independente de cálcio e dependente de sódio (Calaza *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 1993; Hofmann e Möckel, 1991; Tapia e Arias, 1982; Yazulla e Kleinschmidt, 1983).

O efeito do GABA pode ser mediado pela ativação de receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) ou metabotrópicos (GABA_B). A ativação dos receptores GABA_A e GABA_C aumenta a condutância da membrana a íons cloreto (Cherubini e Strata, 1997; Macdonald e Olsen, 1994), enquanto a ativação de receptores GABA_B, que estão acoplados a canais de cálcio e potássio através da ativação de proteína G, geram uma cascata de segundos mensageiros (Bowery, 1989). A ativação de receptores para GABA, seja ionotrópico ou metabotrópico, gera hiperpolarização da membrana celular.

A sinalização GABAérgica é finalizada por meio de sua recaptação por transportadores para o interior de terminais pré-sinápticos ou de células de glia. Quatro tipos

de transportadores para GABA (GAT1, GAT2, GAT3 e GAT4) foram descritos no cérebro e diferem quanto à distribuição (Liu *et al.*, 1993; Worrall e Williams, 1994). Ao menos três isoformas deste transportador foram identificadas na retina de rato (GAT1, 2 e 3) (Johnson *et al.*, 1996). Dados farmacológicos indicam que em células da retina de galinha em cultura a liberação de GABA é inibida de forma diferente por bloqueadores da GAT1 ou da GAT2/3. Estes autores sugerem que a liberação de GABA na retina de galinha é mediada principalmente por GAT1 (Do Nascimento *et al.*, 1998).

Os transportadores realizam a recaptação por simporte de dois íons de sódio, um de cloreto e uma molécula de GABA (Borden *et al.*, 1992; Guastella *et al.*, 1990; Kavanaugh *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 1980; Mager *et al.*, 1993) (figura 1).

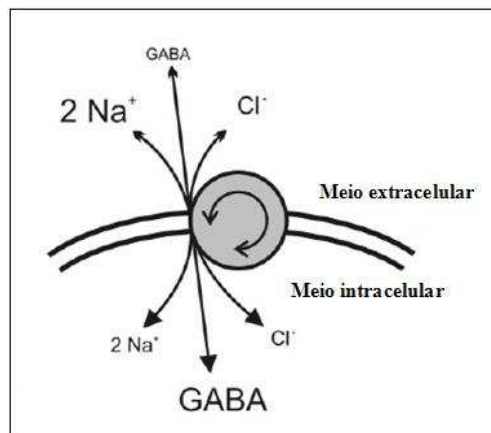


Figura 1. Esquema da recaptação de GABA. Transportadores de GABA são membros da família de transportadores dependentes de sódio e cloreto. Para a recaptação ocorre simporte de uma molécula de GABA, dois íons de sódio e um de cloreto. Este transporte pode ser revertido pelo aumento de sódio intracelular, levando à liberação de GABA (Adaptado de Richerson e Wu, 2003).

Este transporte pode ser bidirecional, pois se houver aumento de sódio intracelular próximo a estes transportadores ocorre reversão da direção do fluxo e conseqüentemente a liberação de GABA. Wu e colaboradores (2001) relataram que o aumento de GABA

intracelular induzido por um inibidor da degradação de GABA é suficiente para ativar o transporte reverso. Além disso, uma vez que sódio e cloreto podem ser transportados na ausência de GABA (Cammack *et al.*, 1994) é possível que ocorra transporte de GABA sem cloreto ou sódio ligados ao transportador. Outra alternativa é que o sódio seja transportado contra o seu gradiente em condições de aumento do GABA citosólico (Wu *et al.*, 2001).

Na retina de diferentes espécies, incluindo a de aves, a principal via de liberação de GABA é pela reversão do transportador e não pela via clássica de exocitose dependente de cálcio (Morán e Pasantes-Morales, 1983; Tapia e Arias, 1982; Yazulla e Kleinschmidt, 1983). Wu e colaboradores (2001) sugeriram que a liberação de GABA mediada por transportadores desempenha um papel importante na inibição neuronal em condições fisiológicas e patológicas.

Após sua recaptção o GABA é metabolizado pela enzima GABA-transaminase (GABA-T) (Hyde e Robinson, 1976). Na reação, o α -cetogluturato (formado a partir do metabolismo da glicose do ciclo de Krebs) é transaminado em glutamato e o GABA é metabolizado em semialdeído succínico. Assim, uma molécula de GABA só pode ser metabolizada se for formada uma molécula do precursor (glutamato). Esta reação é muitas vezes referida como GABA *shunt* (figura 2). A figura 3 esquematiza a transmissão do sistema GABAérgico.

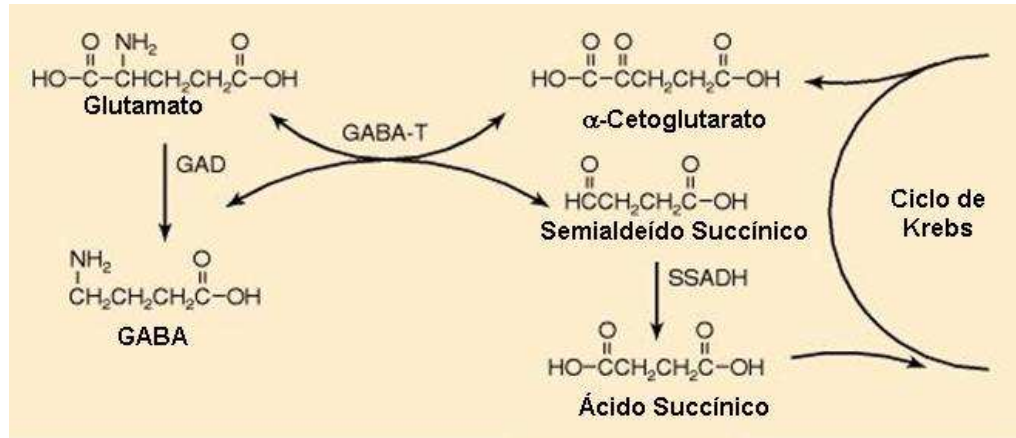


Figura 2. Síntese e degradação de GABA pelas enzimas GAD e GABA-T, respectivamente. GABA-T: GABA transaminase; GAD: Descarboxilase do ácido glutâmico; SSADH: semialdeído succínico desidrogenase (Adaptado de Siegel, 1999).

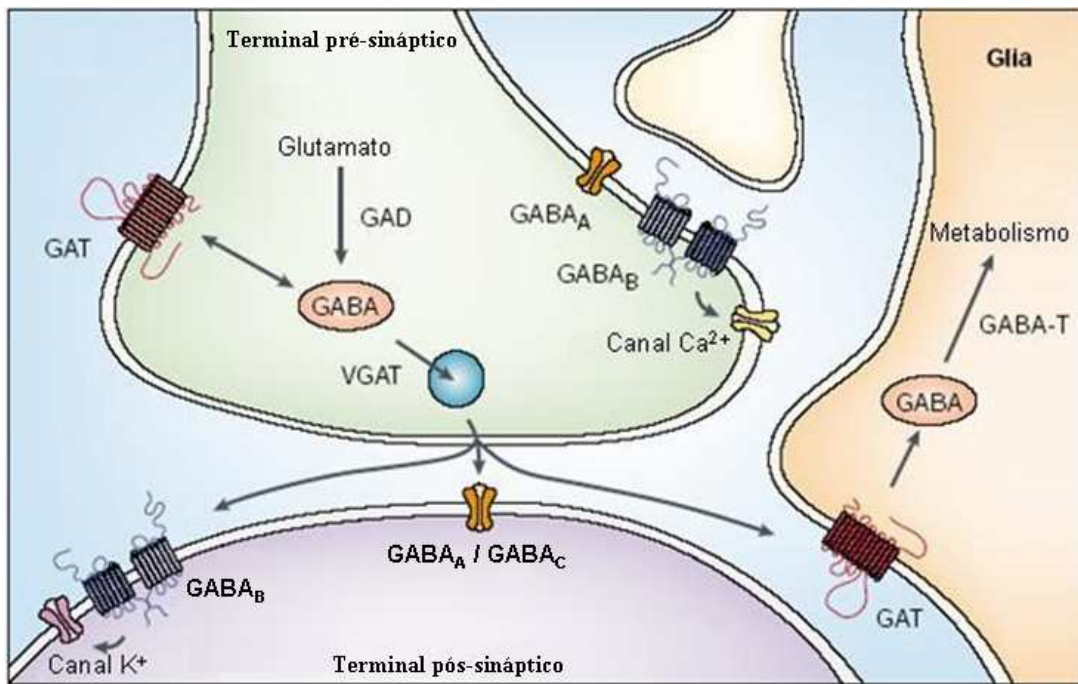


Figura 3. Neurotransmissão GABAérgica. O GABA é sintetizado em neurônios inibitórios pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e é transportado para o interior de vesículas por transportadores vesiculares (VGAT). A recaptação de GABA por neurônios e células da glia ocorre por atividade de transportadores de GABA (GAT). Na sequência, o GABA é metabolizado pela enzima GABA transaminase (GABA-T) (Adaptado de Owens e Kriegstein, 2002).

Apesar de sua função inibitória no cérebro adulto, durante o desenvolvimento o GABA exerce papel excitatório em função da expressão de transportadores de cloreto que geram gradiente que favorece a saída deste íon da célula (Liu *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 1999). Assim, a ativação de receptores ionotrópicos de GABA gera uma corrente de cloreto para fora da célula, despolarizando a membrana. Em neurônios do gânglio ciliar de galinha em E9 a resposta ao GABA é despolarizante, enquanto em E14 já é hiperpolarizante. Por outro lado, em neurônios da medula espinhal de galinha, o GABA já apresenta ação inibitória em E9 (Liu *et al.*, 2006). Na retina de galinha a resposta despolarizante ao GABA é máxima em E8, decaindo intensamente entre E12 e E14, quando já é hiperpolarizante (Catsicas e Mobbs, 2001). Sendo assim, a mudança de expressão dos transportadores que alteram o potencial de equilíbrio do cloreto pode ocorrer em diferentes períodos dependendo da região do SNC analisada.

É importante apontar que a ação despolarizante do GABA gera aumento de cálcio intracelular por ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem. Além disso, a despolarização é suficiente para remover o bloqueio de magnésio de receptores NMDA (ver item 2), permitindo assim entrada de cálcio. Assim, GABA atua em sinergia com receptores NMDA em neurônios imaturos (Ben-Ari *et al.*, 1997). Esta ação despolarizante GABAérgica tem sido relacionada com vários processos do desenvolvimento, desde a proliferação celular até o refinamento de circuitos neuronais (Ben-Ari *et al.*, 1994; para revisão, Ben-Ari, 2002). Considerando que quase todos os organismos, desde as bactérias até os humanos, podem sintetizar GABA (Gale, 1966; Haber *et al.*, 1970; Schales e Schales, 1946) não é surpreendente que este aminoácido esteja envolvido em múltiplas funções.

2. GLUTAMATO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, incluindo a retina (Thoreson e Witkovsky, 1999). Ele é produzido do α -cetoglutarato, um intermediário no ciclo do ácido tricarboxílico (Kandel *et al.*, 2003). A ação do glutamato ocorre através da ativação de receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os iGluRs apresentam características distintas e são identificados de acordo com seus agonistas específicos: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-iso-xazole-propiónico (AMPA), Cainato (KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Receptores AMPA e KA (historicamente chamados de receptores não-NMDA) são permeáveis aos íons Na^+ e K^+ , mas, na maioria das vezes, não são permeáveis ao Ca^{2+} . A ativação destes receptores causa influxo de Na^+ e despolarização da membrana. Receptores NMDA são permeáveis ao Na^+ , K^+ e também ao Ca^{2+} . Este receptor é composto por vários sítios modulatórios incluindo um sítio de reconhecimento para o magnésio. O magnésio extracelular bloqueia o receptor em potenciais negativos da membrana sendo necessária uma pré-despolarização (classicamente mediada pelos receptores não-NMDA) para que o magnésio desbloqueie o canal (Mayer *et al.*, 1984). Concomitante à despolarização é necessária a ligação de glutamato e glicina (ou D-serina) para ativar o receptor (Lester *et al.*, 1993; Mothet *et al.*, 2000).

Os mGluRs são receptores acoplados à proteína G e ativam segundos mensageiros. São subdivididos em 3 grupos: grupo I (mGluR1 e mGluR5) acoplados à proteína G que ativa fosfolipase C; grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, 6–8), ambos acoplados a proteína G que inibe a atividade da adenilato ciclase (para revisão, Yang, 2004). Após ser liberado, o glutamato é captado da fenda sináptica por neurônios e células de glia (Danbolt, 2001).

O glutamato tem um papel crucial na fisiologia da retina e toda a farmacologia definida para receptores glutamatérgicos é encontrada neste tecido (Fletcher e Hack, 2000; Massey e Maguire, 1995). A ativação de iGluRs na retina induz a liberação de substâncias neuroativas como glicina (revisão Bernath, 1992), dopamina (Gustincich *et al.*, 1997) e GABA em retinas de várias espécies (Calaza *et al.*, 2001, 2003; Hofmann e Möckel, 1991; Kamada *et al.*, 1981; Morán e Pasantes-Morales, 1983; Osborne e Herrera, 1994; Perez e Davanger, 1994; Schwartz, 1982; Tapia e Arias, 1982; Yang *et al.*, 1997; Yazulla *et al.*, 1985).

De acordo com Marc e Liu (2000), a maioria das células amácrinas da retina são GABAérgicas e recebem aferências glutamatérgicas de células bipolares. Estas células bipolares, por sua vez, são moduladas por sinapses recíprocas de células amácrinas GABAérgicas, que representam um *feedback* negativo. Portanto, interações entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico na retina são funcionalmente importantes.

3. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira gasosa com várias funções no organismo. Embora tenha sido originalmente identificado como fator relaxante derivado do endotélio (Cohen *et al.*, 1996; Furchgott e Zawadzki, 1980; Furchgott, 1999; McDonald e Murad, 1995), o NO apresenta importantes funções de sinalização em macrófagos, neurônios, células endócrinas, fibras do músculo esquelético e outros tipos celulares (Bredt e Snyder, 1992; Hibbs *et al.*, 1987; Shimizu-Sasamata *et al.*, 1998; Stamler e Meissner, 2001). Além disso, o NO está envolvido com diversas doenças relacionadas ou não ao SNC, como artrite (Jang e Murrell, 1998), cardiomiopatia (Kooy *et al.*, 1997), doenças autoimunes (Kelly e Gold, 1999), esclerose (Abe *et al.*, 1995), câncer (Wink *et al.*, 1998), diabetes (Chan *et al.*,

2000; Sjoeholm, 1998), doenças neurológicas (Bolanos *et al.*, 1997; Heales *et al.*, 1999) e isquemia (Hangai *et al.*, 1996; Samdani *et al.*, 1997). O papel do NO em muitas destas doenças é contraditório, pois o NO eventualmente apresenta efeitos opostos dependendo do modelo experimental, da concentração de NO e do meio onde ele é produzido, resultando em dados controversos na literatura científica (para revisão, Davis *et al.*, 2001).

No SNC, o NO está envolvido com a regulação da liberação de neurotransmissores (Kano *et al.*, 1998; Lonart *et al.*, 1992; Sandor *et al.*, 1995), plasticidade neuronal (Dinerman *et al.*, 1994a; Schuman e Madison, 1991), aprendizado e memória (Prickaerts *et al.*, 1997; Qiang *et al.*, 1997), expressão de genes (Rabkin e Klassen, 2007), proliferação celular (Magalhães *et al.*, 2006), morte e sobrevivência neuronal (Choi *et al.*, 2002). Além disso, o NO tem sido descrito como mediador do efeito excitotóxico do glutamato (Dawson *et al.*, 1991).

3.1. Biossíntese de NO

O NO é sintetizado através da atividade de uma família de enzimas conhecida como sintase do óxido nítrico (NOS), que apresenta ao menos três isoformas classificadas de acordo com o tecido ou ordem em que foram identificadas: NOS I ou NOS neuronal (nNOS) (Mayer *et al.*, 1990), NOS II ou NOS induzida (iNOS) (Hevel *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 1992) e NOS III ou NOS endotelial (eNOS) (Lamas *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 1991;).

As isoformas nNOS e eNOS são classificadas como constitutivas uma vez que sua ativação não requer que a enzima seja sintetizada para iniciar a produção de NO, embora a síntese da enzima possa ser regulada por certos estímulos (Hirsch *et al.*, 1993; Koeberle e Ball, 1999; Verge *et al.*, 1992). As isoformas constitutivas são ativadas pelo complexo cálcio/calmodulina durante condições de aumento de cálcio intracelular.

Ao contrário das isoformas constitutivas, a ativação da iNOS requer necessariamente síntese da enzima, que pode ser estimulada por mediadores inflamatórios e irá atuar na resposta contra microorganismos invasores (Marletta, 1993). Além disso, a iNOS é a única isoforma que tem ativação independente de cálcio, pois a enzima já possui um complexo cálcio/calmodulina ligado a ela desde sua síntese (Cho, 1992). A indução da expressão da iNOS resulta na produção de NO em quantidade muito maior que aquela produzida pelas isoformas constitutivas (revisão, Garcia e Stein, 2006), podendo inclusive ser deletéria para o hospedeiro caso haja ativação persistente dessa enzima (Heneka e Feinstein, 2001; Kröncke *et al.*, 2001).

Por ser um gás e sofrer rápida difusão é importante que o NO tenha sua produção bem regulada. Estudos bioquímicos indicam que a nNOS pode ser fosforilada pelas proteínas cinases dependente de cálcio/calmodulina II (CAMKII), proteína cinase dependente de cálcio (PKC) (Nakane *et al.*, 1991), proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (Bredt *et al.*, 1992; Brune e Lapetina, 1991; Dinerman *et al.*, 1994b) e proteína cinase dependente de guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (PKG) (Dinerman *et al.*, 1994b). Com exceção da fosforilação por PKC, que aumenta a atividade da NOS (Nakane *et al.*, 1991), a fosforilação por qualquer uma das cinases mencionadas reduz a atividade catalítica da NOS (Dinerman *et al.*, 1994b; Nakane *et al.*, 1991). Por outro lado, a nNOS pode sofrer desfosforilação pela calcineurina e ter sua atividade aumentada (Dawson *et al.*, 1993).

Todas as isoformas da NOS formam um homodímero que catalisa a formação de L-citrulina e NO a partir de L-arginina, utilizando oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-substratos e, como cofatores, utiliza flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetrahydrobiopterina, heme, cálcio/calmodulina e possivelmente zinco (Stuehr, 1999). A L-arginina é captada por uma família de transportadores transmembranas de aminoácidos catiônicos denominados CAT

(*cationic amino acids transporters*) que engloba sistemas de captação que diferem em relação a algumas propriedades (dependência de sódio e afinidade). Na retina a arginina é captada por um sistema de alta afinidade de forma independente de sódio (Cossenza e Paes de Carvalho, 2000; Pow, 2001).

A arginina pode servir a outros fins além da produção de NO, como por exemplo, a síntese de proteínas, uréia, creatina e agmatina. As vias e as enzimas envolvidas no ciclo da arginina e na síntese de NO estão apresentadas na figura 4.

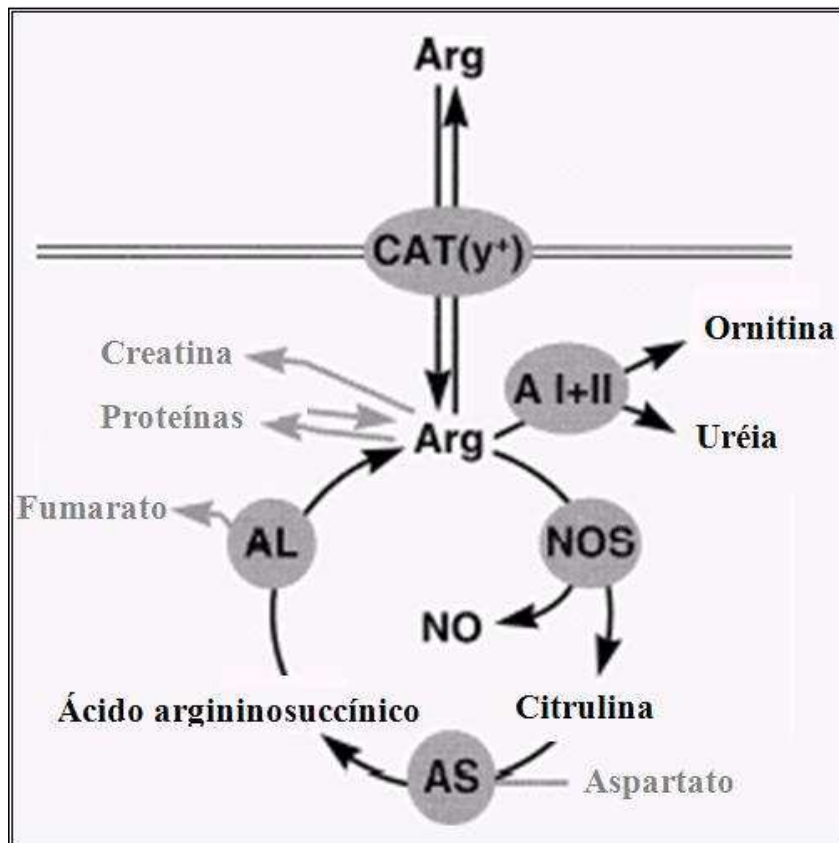


Figura 4. Ciclo da arginina e síntese de NO. A enzima sintase do NO (NOS) utiliza L-Arg como substrato para formar NO e citrulina. A célula pode captar L-Arg por transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) e/ou reciclá-la a partir de citrulina pelas enzimas arginino succinato sintase (AS) e arginino succinato liase (AL). As enzimas arginase I e II (AI e II) degradam L-Arg formando uréia e ornitina. (Adaptado de Braissant *et al.*, 1999).

Embora a concentração de L-arginina no meio intracelular encontre-se acima do K_m enzimático da NOS, e portanto teoricamente saturante para a produção de NO, foi demonstrado que um suplemento extracelular é necessário para que haja produção de NO (Kurz e Harrison, 1997). Essa dependência da captação de arginina para produção de NO foi chamado de “paradoxo da arginina”. A hipótese é que a arginina esteja compartimentalizada no meio intracelular e não esteja disponível para a NOS. A captação pode ser o mecanismo responsável por fornecer o *pool* de arginina direcionado para a produção de NO (Kakuda *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 2001).

3.2. Mecanismos de atuação do NO

Os efeitos do NO apresentam dois principais mecanismos de ação: os dependentes do segundo mensageiro guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (GMPc), produzido após a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) (Murad, 1986) (figura 5); e os GMPc-independentes, mediados por espécies nitrogenadas reativas (Wade e Castro, 1990; Magalhães *et al.*, 2006). A principal via pela qual NO exerce sua sinalização é a dependente de GMPc. Este segundo mensageiro foi descoberto na urina, não muito após a descoberta do AMPc (Ashman *et al.*, 1963). Mais tarde, foi verificado que o GMPc estaria presente em quase todas as células (Hardman e Sutherland, 1969), sendo agora reconhecido como segundo mensageiro regulador de vários eventos de sinalização celular, como ativação de canais iônicos (Light *et al.*, 1990; Anthony *et al.*, 2000), fosfodiesterases (PDEs) (Mullershausen *et al.*, 2003) e PKG (Smolenski *et al.*, 1998) (figura 5). Existem duas isoformas de GCs e ambas geram GMPc a partir de GTP intracelular: a GC ligada à membrana plasmática, que é um receptor catalítico ativado pelo peptídeo natriurético atrial; e GC solúvel (GCs) que é citosólica e alvo (ou receptor) de NO (Friebe *et al.*, 1997). A via NO/GCs/GMPc/PKG se destaca como efetora de

muitos efeitos fisiológicos do NO (Bie e Zhao, 2001; Reyes-Harde *et al.*, 1999; Wang e Robinson, 1997)

As vias independentes de GMPc são mediadas por espécies nitrogenadas reativas, produzidas pela reação do NO com oxigênio (O_2) ou superóxido (O_2^-). Segundo Beckman e Koppenol (1996), ao contrário do que muitos pensam, o NO não é necessariamente um radical livre altamente reativo. O NO é uma molécula não reativa que contém um elétron desemparelhado. A maioria das moléculas biológicas não interage com NO porque apresentam elétrons emparelhados. Portanto, NO apenas reage com moléculas que possuem elétrons desemparelhados como o O_2 , O_2^- e complexos heme de proteínas como a GCs e hemoglobina.

A interação de NO com O_2 produz NO^+ que pode interagir com grupos tióis (SH) de resíduos de cisteína presentes em proteínas, causando S-nitrosilação (Stamler *et al.*, 2001). Um exemplo é o receptor NMDA que quando nitrosilado tem sua atividade reduzida (Takahashi *et al.*, 2007). Confirmando a idéia de que para ser um evento regulatório fisiologicamente importante a nitrosilação deveria ser reversível; Liu e colaboradores (2001) descreveram uma enzima, conservada de bactérias a humanos, capaz de regular o nível de S-nitrosotióis por meio da regulação do nível de glutathione. A enzima oxida a nitrosoglutationa produzindo glutathione e amônia. A glutathione se liga ao NO (formando nitrosoglutationa) impedindo-o de exercer nitrosilação.

Em algumas condições NO pode interagir com O_2^- , formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um dos seus derivados mais reativos que pode estar envolvido na morte celular induzida por NO (Crow e Beckman, 1995). A produção de $ONOO^-$ pode resultar em nitração de resíduos de tirosina (Reiter *et al.*, 2000). Similar à nitrosilação, a nitração de resíduos de tirosina em proteínas pode alterar sua função (Boulos *et al.*, 2000; Gole *et al.*, 2000; Scherrer e

Stoeckenius, 1985). Kamisaki e colaboradores 1998 encontraram evidências da atividade de uma enzima que poderia reverter a nitração – uma enzima de-nitrase (figura 5).

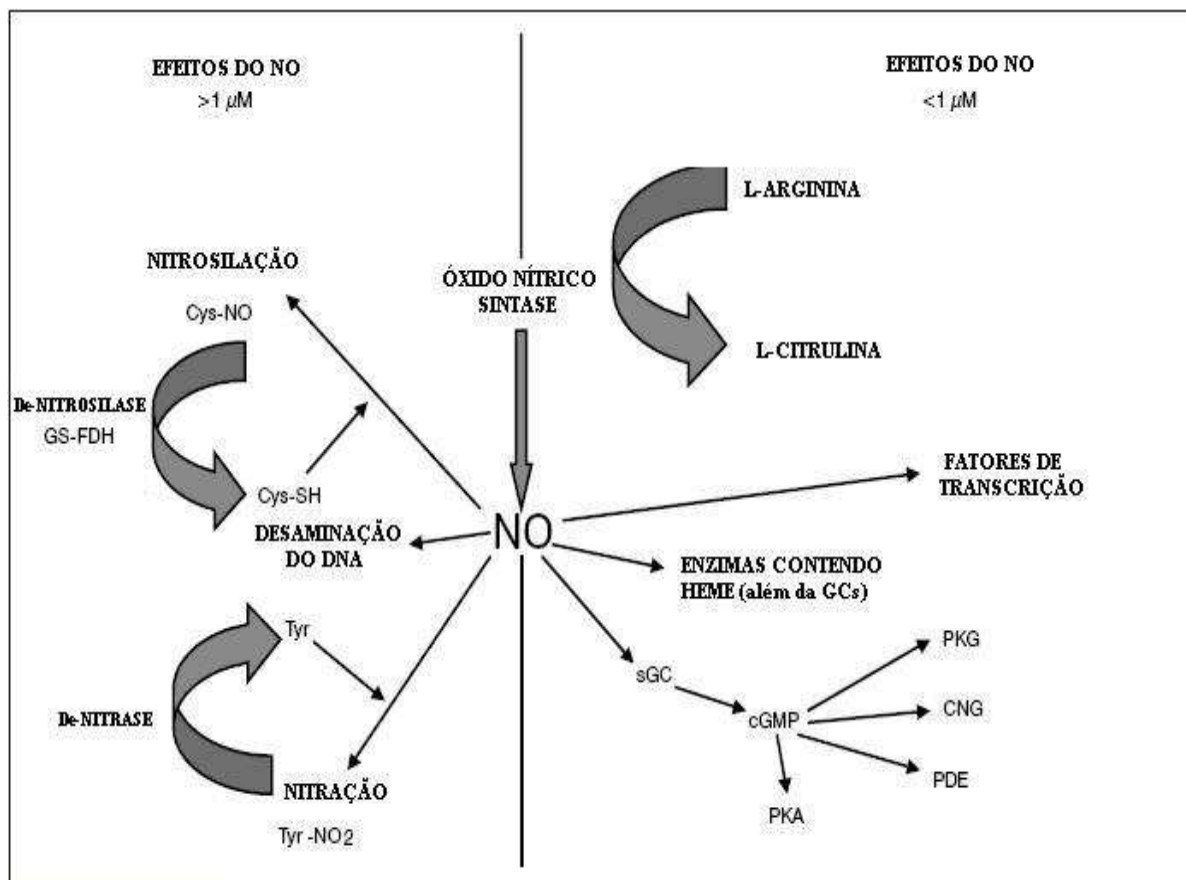


Figura 5. Sumário dos efeitos de NO de acordo com sua disponibilidade. Cys: cisteína; SH: tiol; GS-FDH: deidrogenase formaldeído dependente de glutatona; Tyr: tirosina, sGC: guanilato ciclase solúvel; PKA: proteína cinase dependente de AMPc; PKG: proteína cinase dependente de GMPc; CNG: canal iônico dependente de nucleotídeo cíclico; PDE: fosfodiesterase (Modificado de Hanafy *et al.*, 2001).

3.3. Modulação da liberação de neurotransmissores por NO

No SNC de diversas espécies, o NO estimula a liberação de vários neurotransmissores convencionais, como acetilcolina (Hirsch *et al.*, 1993; Trabace e Kendrick, 2000), dopamina (Hirsch *et al.*, 1993), glutamato (Prast e Philippu, 2001; Segieth *et al.*, 1995), serotonina

(Ginap e Kilbinger, 1998) e GABA (Li *et al.*, 2002; Ohkuma *et al.*, 1995; Ozaki *et al.*, 2000; Wall, 2003). Mas, efeitos inibitórios também foram relatados na liberação de dopamina (Guevara-Guzman *et al.*, 1994), glutamato (Kamisaki *et al.*, 1995) e GABA (Getting *et al.*, 1996).

Apesar de várias vias poderem estimular a produção de NO por gerarem despolarização e elevações no Ca^{2+} intracelular, o influxo de Ca^{2+} resultante da ativação do receptor NMDA representa o principal mecanismo pelo qual NO é gerado no cérebro (Garthwaite *et al.*, 1989; Garthwaite e Boulton, 1995). Os receptores NMDA estão presentes seletivamente na densidade pós-sináptica de sinapses excitatórias e são associados fisicamente a NOS pela proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDa (PSD-95) (Brenman *et al.*, 1996). A PSD-95 possui um conjunto de sítios de interação com outras proteínas, entre eles os domínios PDZ, que medeiam a interação da NOS com os receptores NMDA (Christopherson *et al.*, 1999) (figura 6).

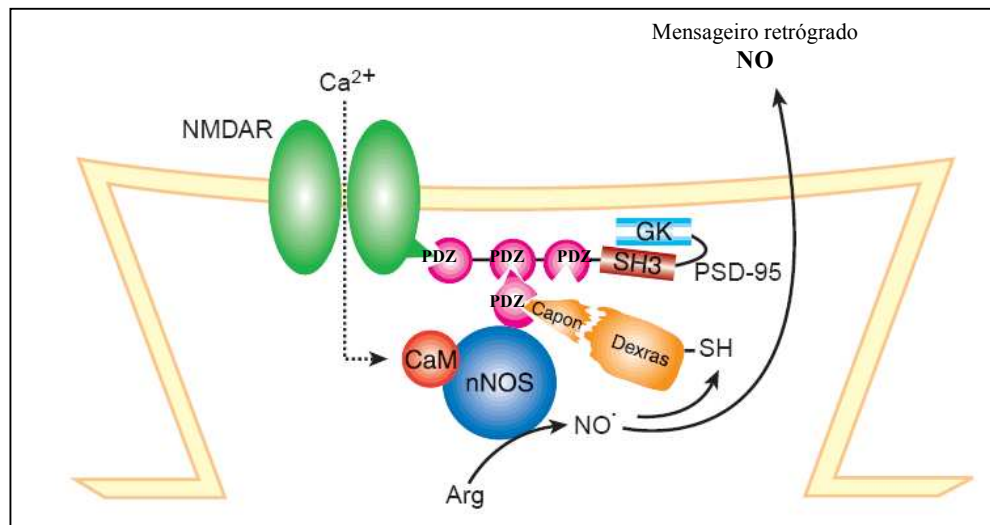


Figura 6. Produção de NO a partir da atividade de receptores NMDA. A ativação de receptores NMDA gera influxo de cálcio e formação do complexo cálcio-calmodulina. Este complexo ativa a NOS que utiliza L-Arginina para sintetizar NO e citrulina. A PSD-95 possui três domínios PDZ, um domínio SH3 e um domínio homólogo a guanilato cinase (GK). Receptor NMDA e NOS são acoplados a PSD95 por meio de domínios PDZ, permitindo a ativação da NOS especificamente por

influxo de Ca^{2+} induzido por glutamato. Arg: L-arginina; CaM: calmodulina. (Adaptado de Brett, 2003).

O NO produzido pela ativação de receptores NMDA pode se difundir, atuar na própria célula ou ainda atuar na célula pré-sináptica como mensageiro retrógrado. Em ambas as regiões, NO pode modular a atividade de diferentes proteínas (Schuman e Madison, 1994).

O NO pode mediar a liberação de neurotransmissores estimulada pela ativação de receptores NMDA. Estudos no córtex cerebral ou estriado mostram que inibidores da NOS bloqueiam o efeito da estimulação de receptores NMDA (Hirsch *et al.*, 1993). A NOS também está presente em terminais pré-sinápticos possibilitando que a ativação de receptores NMDA pré-sinápticos module a liberação de neurotransmissores, via produção de NO. Foi demonstrado em preparações de sinaptossomas de hipocampo que a estimulação da NOS, pela administração de arginina, inibe a liberação por exocitose de glutamato e GABA por um mecanismo dependente de GMPc (Sequeira *et al.*, 1997; Sequeira *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não está claro se *in vivo* a NOS pré-sináptica pode ser estimulada por ativação de receptores NMDA. Além disso, não foi identificada a presença de proteína equivalente a PSD-95 nos terminais pré-sinápticos, apesar de existirem alguns candidatos em potencial (Butz *et al.*, 1998).

3.3.1. Modulação da Transmissão GABAérgica por NO em diferentes regiões do SNC

O NO pode modular a liberação de GABA em várias regiões do SNC como córtex cerebelar (Kuriyama e Ohkuma, 1995; Ohkuma *et al.*, 1995), hipocampo (Lonart *et al.*, 1992; Segovia *et al.*, 1994), hipotálamo (Li *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2000), estriado (Segovia *et al.*,

1994; Segovia e Mora, 1998), tronco encefálico (Saransaari e Oja, 2006) e retina (Ientile *et al.*, 1997; Yu e Eldred, 2005).

No hipotálamo, a ativação de receptores NMDA aumenta a atividade GABAérgica por mecanismo dependente de NO (Bains e Ferguson, 1997). Nesta região do cérebro, NO atua na região pré-sináptica estimulando a liberação de GABA (Bains e Ferguson, 1997; Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Ozaki *et al.*, 2000; Stern e Ludwig, 2001); e na região pós-sináptica, modulando a atividade do receptor GABA_A (Bains e Ferguson, 1997; Li *et al.*, 2002; Stern e Ludwig, 2001).

No tronco encefálico de camundongos, doadores de NO estimulam a liberação de GABA basal ou estimulada por despolarização com alto potássio *in vitro*. O efeito do NO neste modelo é independente de GMPc e atua como mensageiro retrógrado estimulando diretamente a liberação de GABA (Saransaari e Oja, 2006).

O efeito do NO na liberação de GABA é, em alguns casos, atribuído à formação de peroxinitrito. Como mostrado por Ohkuma e colaboradores (1995), no córtex cerebral de camundongos, um seqüestrador de peroxinitrito ou a adição de peroxinitrito reduzem e aumentam, respectivamente, a liberação de [³H]GABA induzida por doadores de NO.

Além de modular a liberação de GABA, o NO pode modular a síntese e a degradação de GABA em algumas regiões do SNC. Na retina de galinha, o uso de um doador de NO (SNAP) reduz mais de 60% a atividade da enzima GAD (Almeida *et al.*, 2002). No cérebro de rato, o tratamento com L-Arginina não afeta a atividade da GAD, mas inibe a atividade da enzima GABA-T (Paul e Jayakumar, 2000). No hipocampo, a utilização de inibidor da enzima GABA-T induz aumento na liberação de GABA de 250-450% em relação ao controle (Jayakumar *et al.*, 1999). Isto sugere que o aumento da liberação de GABA por NO pode ser uma consequência do seu efeito inibitório sobre a GABA-T. Ainda não é conhecido quando

estes dois mecanismos estão interligados ou quando são independentes, até porque não sabemos detalhes sobre quais regiões do SNC o NO pode inibir GABA-T.

Os efeitos da L-Arg no sistema nervoso são geralmente atribuídos à produção de NO (Jayakumar *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002; Paul e Jayakumar, 2000), por ser o substrato natural para a produção deste neuromodulador. Entretanto, Shen e colaboradores (1997) relataram que L-Arg é capaz de potencializar a transmissão GABAérgica no mesencéfalo de rato por mecanismo independente de NO. É sugerido que a L-Arg atue inibindo o transportador de GABA potencializando a transmissão GABAérgica por inibir a recaptação deste neurotransmissor (Shen *et al.*, 1997). A ação de L-Arg sobre o transportador teria como consequência não só a inibição da recaptação de GABA, mas também a inibição da sua liberação mediada pela reversão do transportador.

4. A RETINA

4.1. Estrutura e desenvolvimento da retina

A retina é um órgão sensorial especializado que se localiza na parte posterior do globo ocular. As células da retina estão distribuídas em camadas, intercaladas por plexos sinápticos. A camada mais externa, próxima ao epitélio pigmentado, é chamada de camada nuclear externa (CNE), onde se encontram os corpos celulares dos fotorreceptores. Na camada nuclear interna (CNI), encontram-se os corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas. Nesta camada localizam-se também os corpos celulares das células de Müller, o principal tipo glial da retina, que se estende por toda a extensão radial da retina. Na camada de células ganglionares (CCG) são encontradas as células ganglionares e células amácrinas deslocadas. Layer e Vollmer (1982) relataram que na retina de galinha em desenvolvimento, 23% (\pm 3%) das células na CCG são amácrinas deslocadas. Ehrlich e Morgan (1980)

relataram que na retina de galinha madura, as células amácrinas deslocadas correspondem a 30-35% do total de células na CCG.

Os fotorreceptores, as células bipolares e as células horizontais fazem conexões sinápticas na camada plexiforme externa (CPE). As células bipolares, amácrinas e células ganglionares fazem contato na camada plexiforme interna (CPI) (para revisão ver Kolb, 2003) (figura 7).

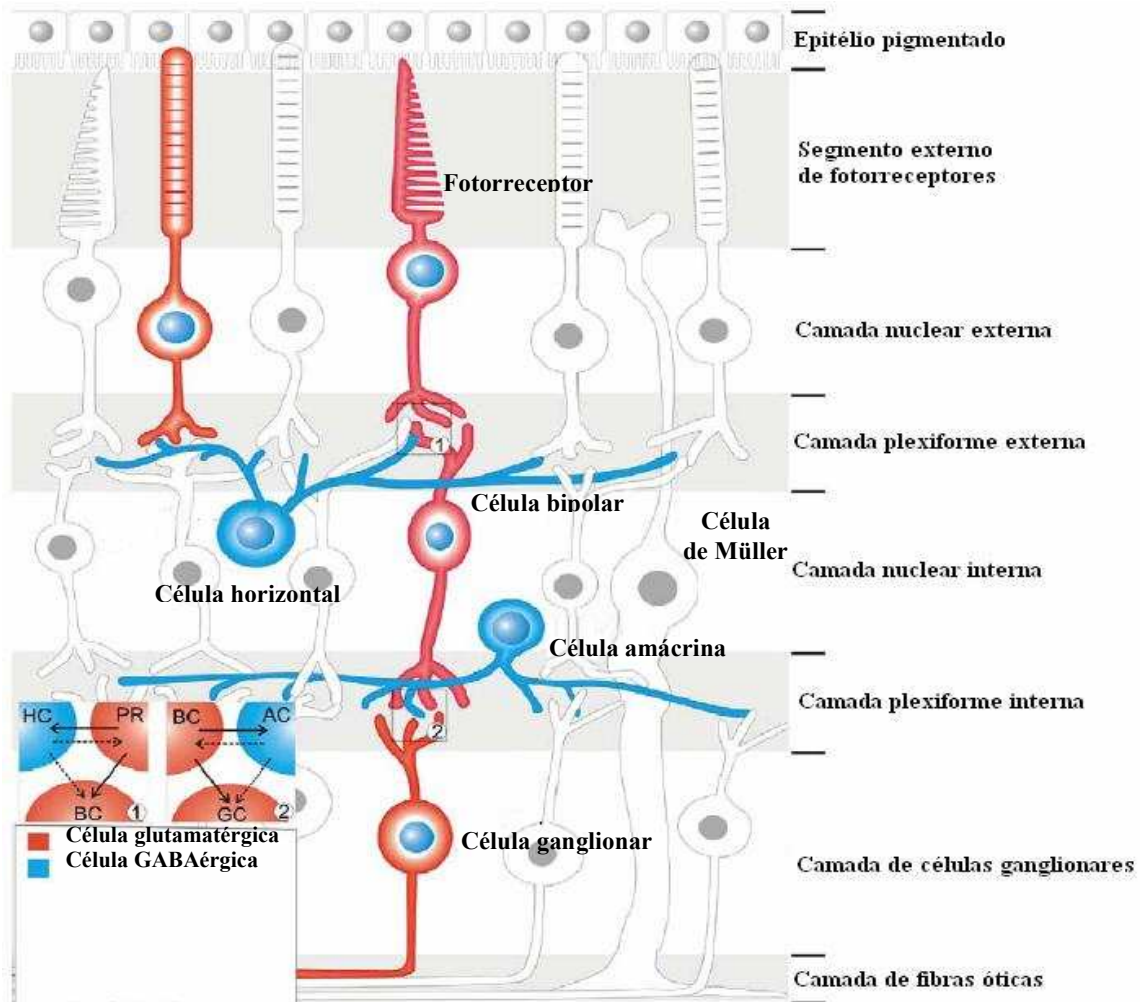


Figura 7. Representação da estrutura laminar da retina. As células da retina estão dispostas em camadas de corpos celulares intercaladas por plexos. Em vermelho: células que utilizam o

glutamato como neurotransmissor. Em azul: células que utilizam o GABA como neurotransmissor (Modificado de Yang, 2004).

A retina é derivada embriologicamente do tubo neural, sendo portanto integrante do SNC. O desenvolvimento da retina de embrião de galinha dura cerca de três semanas e está completo no momento da eclosão (para revisão, Mey e Thanos, 2000). As primeiras células a sofrerem diferenciação na retina de vertebrados são as células ganglionares. Na retina de galinha, essas células começam a surgir em E2 e são sucedidas por fotorreceptores, em seguida células de Muller, células amácrinas, células horizontais e células bipolares, que são os últimos neurônios a deixarem o ciclo mitótico. Entre E12 e E13, as células da CNI estão totalmente geradas, tendo padrão de estratificação essencialmente estabelecido em E16 (para revisão, Mey e Thanos, 2000). O segmento externo dos fotorreceptores apenas se inicia a partir de E16 (Hughes e LaVelle, 1974) e as primeiras respostas à luz surgem logo em seguida (E17) (Hanawa *et al.*, 1976).

A CPI inicia sua formação em E7 e as primeiras sinapses ocorrem por volta de E13, enquanto a CPE surge por volta de E9 e suas primeiras sinapses são observadas em E17 (Hering e Kroger, 1996; Mey e Thanos, 2000).

4.2. Localização Celular de Aminoácidos Neurotransmissores na Retina de Galinha

Aminoácidos neurotransmissores excitatórios como o glutamato e o aspartato, ou inibitórios como o GABA e a glicina, tem sido detectados em células da retina de galinha pós-eclosão pelo método de imunohistoquímica (Kalloniatis e Tomisich, 1999; Sun e Crossland, 2000). Foi verificado uma extensa colocalização destes neurotransmissores na maioria dos

neurônios, inclusive ocorrendo casos de colocalização dos quatro neurotransmissores na mesma célula. Entretanto, células da via vertical de sinalização (ver item 4.3) (fotorreceptores, bipolares e ganglionares) geralmente apresentavam imunorreatividade para glutamato e aspartato, mas não para GABA e glicina (Barnstable, 1993; Massey e Maguire, 1995, Sun e Crossland, 2000). De forma oposta, células da via lateral (ver item 4.3) (horizontais e amácrinas) apresentavam imunorreatividade para GABA e/ou glicina em adição ao glutamato e aspartato (Sun e Crossland, 2000) (figura 7). É mais provável que o glutamato em células da via lateral tenha função de precursor metabólico para síntese de GABA, e não papel de neurotransmissor (Kalloniatis e Fletcher, 1993).

Na retina de mamíferos, células de Müller podem captar GABA liberado por neurônios (Andrade da Costa *et al.*, 2000; Morán *et al.*, 1986), mas trabalhos realizados em tecido intacto indicam que células de Müller não realizam esta captação na retina de galinha (Calaza *et al.*, 2001; Marshall e Voaden, 1974).

4.3. Fisiologia da retina

A luz que atravessa a córnea e o cristalino é projetada na retina, onde é convertida em sinal elétrico pelos fotorreceptores. Existem dois tipos de fotorreceptores: bastonetes, responsáveis pela visão noturna; e cones, responsáveis pela visão diurna e visão de cores. Ambos os tipos de fotorreceptores possuem pigmentos visuais que absorvem a luz. As células do epitélio pigmentado possuem melanina, um pigmento preto que absorve qualquer luz não capturada pelos fotorreceptores. Este processo auxilia a formação de uma imagem mais nítida. Os fotorreceptores estão localizados na camada mais externa da retina, próxima ao epitélio pigmentado, de forma que todas as outras células deste tecido estão mais internas e portanto mais próximas do humor vítreo. Assim, a luz deve atravessar todas essas camadas de

neurônios da retina antes de atingir os fotorreceptores. Os axônios neuronais nas camadas da retina são amielínicos e relativamente transparentes, de forma que a luz não sofre distorções ao atravessar estas camadas celulares (para revisão, Kolb, 2003).

Em alguns animais, como os primatas, existe na região central da retina um deslocamento dos neurônios para o lado, permitindo que a luz tenha acesso direto aos fotorreceptores. Esta região é denominada fóvea, onde a imagem visual recebida é menos distorcida e onde os cones que respondem ao verde e ao vermelho estão concentrados. Muitos outros mamíferos apresentam uma área especializada na retina onde os cones estão concentrados. Em gatos, cachorros e também em galinhas, a imagem é focalizada em uma região especializada da retina chamada de *área centralis*, onde há concentração de cones. Em outros animais, como esquilos, coelhos e tartarugas, a retina apresenta uma faixa horizontal com predominância de cones, denominada *visual streak* ou faixa visual, que pode detectar movimentos rápidos de predadores (para revisão, Kolb, 2003).

A ativação de moléculas do pigmento visual pela luz leva a uma redução na concentração citoplasmática de GMPc, por induzir a ativação da fosfodiesterase que metaboliza esta molécula. A redução na concentração de GMPc fecha canais iônicos dependentes deste nucleotídeo cíclico seletivos a cátions no segmento externo, enquanto no segmento interno o efluxo de potássio por canais seletivos não é interrompido. Desta forma, o fotorreceptor é hiperpolarizado em resposta à luz. Na ausência do estímulo luminoso, os canais dependentes de GMPc conduzem um influxo de corrente que tende a despolarizar o fotorreceptor. A hiperpolarização induzida pela luz reduz a liberação de glutamato pelos fotorreceptores, enquanto a despolarização induzida pelo escuro estimula o terminal pré-sináptico do fotorreceptor a liberar glutamato para os neurônios pós-sinápticos (para revisão ver Varela *et al.*, 2005).

A informação visual é transmitida dos fotorreceptores para células bipolares, que transmitem para células ganglionares; estas, por sua vez, geram potenciais de ação que se propagam pelo nervo óptico e levam a informação a regiões superiores do encéfalo para um processamento posterior, necessário à percepção visual. Esta sinalização entre fotorreceptores, bipolares e ganglionares é conhecida como via direta ou vertical e é sinalizada por glutamato, sendo modulada por células horizontais e amácrinas GABAérgicas que formam a via lateral (figura 7: notar via vertical representada por células em vermelho e via lateral por células em azul) (Barnstable, 1993; Kalloniatis e Fletcher, 1993; Morán *et al.*, 1986; Sun e Crossland, 2000; Yazulla, 1986).

A atividade da via lateral modulatória resulta na formação dos campos receptores. O campo receptor de uma célula é a área da retina que esta célula monitora (Hartline, 1938). Estes campos são concêntricos e, quando estimulados pela luz, o centro e a periferia geram respostas diferentes na célula. A célula é classificada como centro-ON quando a luz incidente no centro do seu campo receptor a excita e a luz incidente na periferia do seu campo a inibe. Na situação inversa, a célula é classificada como centro-OFF, ou seja, a célula é inibida pela luz incidente no centro do seu campo receptor e excitada pela luz na periferia desse campo. Na retina, as células que apresentam campo receptor centro-ON e centro-OFF são as bipolares e ganglionares (Bishop, 1984; Rodieck, 1973).

Cada cone estabelece sinapse tanto com células bipolares centro-ON e centro-OFF. No escuro, os cones liberam glutamato que inibe (hiperpolariza) células bipolares de centro-ON e excita (despolariza) as células bipolares centro-OFF (figura 8), ocorrendo o oposto na presença da luz (Bishop, 1984; Rodieck, 1973). Esta diferença na resposta celular é resultante da expressão de receptores de glutamato com diferentes características. Em células bipolares de centro OFF, o glutamato ativa iGluRs, gerando despolarização da membrana. Em células

bipolares de centro-ON, o glutamato ativa mGluRs, especificamente, mGluR6. Uma hipótese é que a ativação deste receptor resulte na ativação de fosfodiesterase do GMPc, reduzindo a disponibilidade deste mensageiro e fechando canais iônicos dependentes de GMPc. Assim a célula é hiperpolarizada como ocorre em fotorreceptores em resposta à luz (Yang, 2004).

Células bipolares de centro-ON estabelecem sinapses com células ganglionares de centro-ON, assim como células bipolares de centro-OFF estabelecem sinapses com células ganglionares de centro-OFF (figura 8).

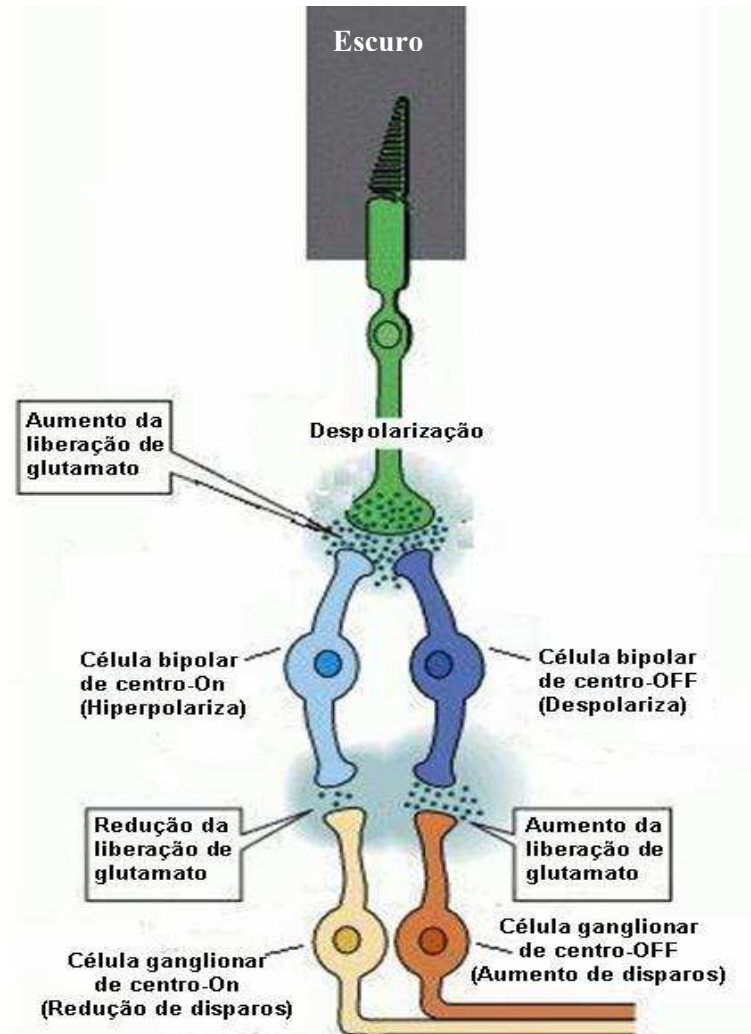


Figura 8. As células bipolares formam vias paralelas da sinalização de um mesmo cone. A célula bipolar de centro-ON se hiperpolariza pela ausência de iluminação no centro de seu campo receptor induzindo redução dos disparos das células ganglionares de centro-ON. A célula de centro-OFF mostra uma resposta oposta (Modificado de Purves *et al.*, 2001).

Células ganglionares centro-ON podem sinalizar rápidos aumentos da intensidade da luz no centro de seus campos receptores aumentando rapidamente a taxa de disparos. Estas mesmas células não podem sinalizar uma rápida diminuição da intensidade da luz porque estão disparando em baixa frequência no estado de repouso. Em contraste, as células ganglionares de centro-OFF podem sinalizar diminuições rápidas de iluminação no centro de

seu campo receptor aumentando rapidamente sua taxa de disparos (Rodieck, 1973; Schiller, 1986).

Células horizontais são aptas a liberar GABA quando despolarizadas (Vardi e Sterling, 1994). Possivelmente esta liberação consiste em um mecanismo pelo qual a informação na periferia é transmitida ao centro do campo receptor (figura 9). É possível que esta transmissão envolva duas vias: a primeira, envolve uma via de feedback de células horizontais para cones. Células horizontais na periferia do campo receptor, despolarizadas pelo glutamato liberado por cones (na ausência de estímulo luminoso), poderiam liberar GABA para cones no centro deste campo. Estes cones seriam então hiperpolarizados (resposta idêntica à gerada pela luz) e transmitiriam o sinal para células bipolares (para revisão Kolb, 2003) (figura 9).

Na segunda via possível, os sinais da periferia são transmitidos por células horizontais diretamente para células bipolares no centro do campo receptor (para revisão, Kolb, 2003). Para ambas as vias, a modulação lateral realizada pelas células horizontais faz com que a presença de luz na periferia mimetize a ausência de luz no centro do campo receptor, otimizando o contraste. Entretanto, já foram encontrados alguns indícios de que o mecanismo de feedback entre células horizontais e fotorreceptores envolveria um mecanismo adicional não-GABAérgico, efático (Tatsukawa *et al.*, 2005).

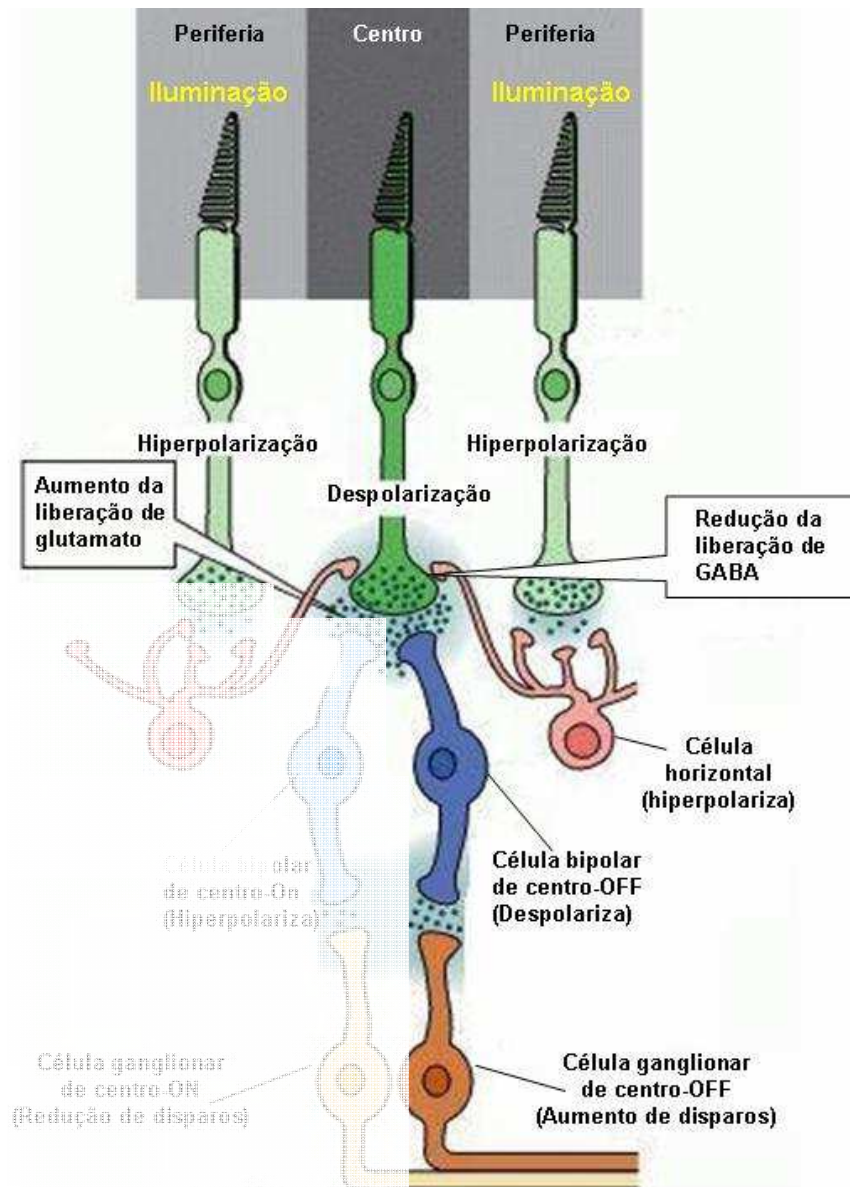


Figura 9. Via de cones. Quando a periferia do campo receptor de uma célula bipolar de centro-OFF é iluminada, os cones localizados nesta região se hiperpolarizam em resposta à luz. Células horizontais pós-sinápticas a estes cones também se hiperpolarizam, reduzindo a liberação de neurotransmissor inibitório (GABA) para cones pós-sinápticos localizados no centro do campo receptor da célula bipolar de centro-OFF. Como resultado, os cones são despolarizados (o efeito oposto da absorção da luz pelos cones). Isso, por sua vez, permite que a célula bipolar de centro-OFF seja despolarizada, o efeito oposto da iluminação no centro do campo receptor. (Modificado de Purves *et al.*, 2001).

Ao contrário dos cones, que são pré-sinápticos às células bipolares de centro-ON e OFF, os bastonetes são pré-sinápticos apenas às células bipolares de centro-ON (Dacheux e

Raviola, 1986) (figura 10). Estas células bipolares de bastonetes não realizam sinapse diretamente com células ganglionares, ao invés disso, transmitem a informação para células amácrinas II (AII) que, por sua vez, realizam sinapses com células bipolares (ON e OFF) de cones (Kolb e Famiglietti, 1974). Células AII, que são despolarizadas em resposta ao estímulo luminoso, formam sinapse elétrica (*gap junctions*) com células bipolares de cone centro-ON, e sinapse inibitória glicinérgica com células bipolares de cone de centro-OFF (DeVries e Baylor, 1995) (figura 10). Assim, as células bipolares centro-ON de cones transmitem à células ganglionares centro-ON a informação luminosa transduzida pelos bastonetes. Desta forma, a sinalização de cones e bastonetes é transmitida ao cérebro pelas mesmas células ganglionares do tipo ON. A transmissão do sinal OFF da via de cones é inibida pela via de bastonete, ressaltando assim o sinal ON (figura 10).

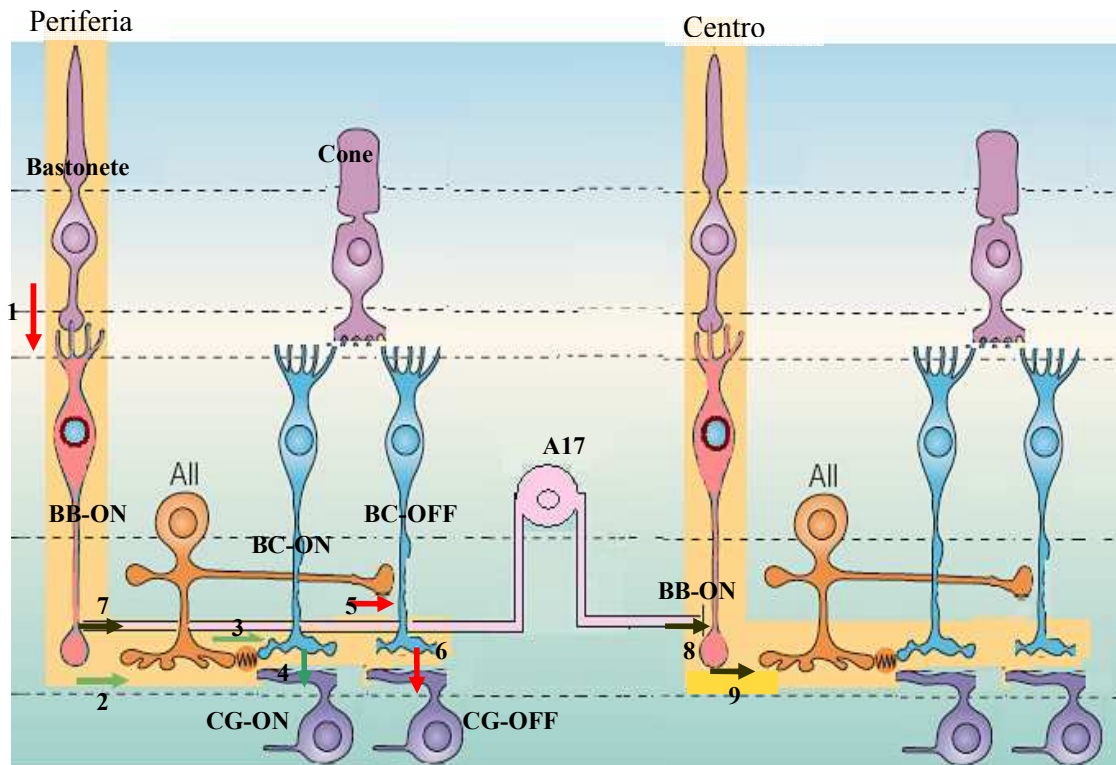


Figura 10. Via de bastonetes. Na via ON, o bastonete hiperpolarizado pela luz reduz a liberação de glutamato (1, seta vermelha), gerando resposta despolarizante na célula bipolar de centro-ON (BB-ON) que então libera glutamato e excita a célula amácrina II (AII) (2, seta verde). A célula AII despolariza a célula bipolar de cone centro-ON através de sinapse elétrica (3, seta verde), consequentemente gerando ativação da célula ganglionar de centro-ON por sinapse glutamatérgica (4, seta verde). Na via OFF, a sinalização é parecida, sendo que nesta via a célula AII quando despolarizada realiza sinapse inibitória glicinérgica com célula bipolar de cone centro-OFF (5, seta vermelha), reduzindo a liberação de glutamato e causando desta forma a hiperpolarização da célula ganglionar de centro-OFF (6, seta vermelha). A célula bipolar de bastonete periférica quando despolarizada pela luz ativa a célula amácrina 17 (A17) (7, seta preta) que libera GABA e inibe a célula bipolar de bastonete no centro do campo receptor (8, seta preta). Desta forma a célula AII central é inibida (9, seta preta), a mesma resposta desta célula ao escuro. AII: célula amácrina glicinérgica II; A17: célula amácrina GABAérgica 17; BB-ON: célula bipolar de bastonete centro-ON; BC-ON: célula bipolar de cone centro-ON; BC-OFF: célula bipolar de cone centro-OFF; CG-ON: célula ganglionar centro-ON; CG-OFF: célula ganglionar centro-OFF (Modificado de Wässle, 2004)

Além de fazer sinapse com células AII glicinérgicas, as células bipolares de bastonete também realizam sinapse com células amácrinas GABAérgicas (A17) (Kolb *et al.*, 1981) (figura 10). Células A17 classicamente realizam sinapses recíprocas com células bipolares de bastonete, cuja função não é totalmente compreendida (Hartveit, 1999).

Células horizontais formam sinapses GABAérgicas de feedback com cones (figura 9) mas não com bastonetes (Baylor *et al.*, 1971), sugerindo que células bipolares de bastonete não apresentam campo receptor concêntrico (Bloomfield e Xin, 2000). Entretanto, Bloomfield e Dacheux (2001) propuseram um modelo no qual a transmissão GABAérgica de células A17 seria capaz de gerar campo receptor concêntrico para células AII. De acordo com o modelo proposto, a estimulação luminosa na periferia do campo receptor de uma célula AII ativaria uma célula bipolar de bastonete periférica que excitaria uma célula A17. Os sinais gerados pela célula A17 seriam então propagados lateralmente através de seus extensivos dendritos. Estas células realizariam sinapses GABAérgicas de feedback com uma célula bipolar de bastonete central, resultando na redução da liberação de glutamato e conseqüente hiperpolarização da célula AII pós-sináptica (Figura 10). Desta forma, enquanto a célula AII periférica é despolarizada pelo estímulo luminoso periférico, a célula AII central é hiperpolarizada pelo mesmo estímulo periférico. Isto favoreceria a sinalização dos bastonetes periféricos e desfavoreceria a sinalização dos bastonetes centrais.

Desta forma, enquanto células horizontais GABAérgicas realizam modulação lateral negativa na via de cones, gerando campos receptores concêntricos para células bipolares de cones, as células amácrinas GABAérgicas realizariam modulação lateral negativa na via de bastonetes, gerando campos receptores concêntricos para células AII.

Esta organização onde a via vertical é modulada pela via lateral é fundamental para a percepção de contrastes, um aspecto de total importância para o processamento visual realizado na retina. Devido à organização centro/periferia do campo receptor, as células ganglionares respondem apenas fracamente à iluminação uniforme; respondem melhor quando as intensidades da luz no centro e na periferia são bem diferentes. Estas, portanto, são mais sensíveis ao contraste da entrada visual do que à sua intensidade luminosa absoluta.

Portanto, é evidente a importância do estudo da modulação do sistema GABAérgico para a compreensão do funcionamento da circuitaria retiniana, tão importante para a qualidade da visão. Além disso, por ter a mesma origem embriológica e propriedades neuroquímicas semelhantes à de outras regiões do SNC, a retina é um excelente modelo para estudos biológicos e bioquímicos do desenvolvimento e da comunicação neuronal (Coulombre, 1955). Assim, o estudo do sistema GABAérgico na retina é adicionalmente útil para a compreensão da regulação deste sistema em outras regiões do SNC.

4.4 NO na retina

O sistema nitrérgico foi caracterizado em retinas de embriões de galinha a partir de 8 dias de desenvolvimento (De-Faria *et al.*, 1995; Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996). Utilizando método de histoquímica para NADPH-diaforase e imunomarcagem para NOS, Fischer e Stell, 1999 analisaram a colocalização de atividade NADPH-diaforase com a expressão de NOS e verificaram que diversos tipos celulares do globo ocular de galinha são produtores de NO: subpopulações de células amácrinas, ganglionares e células de glia, além de células da coróide, esclera e epitélio pigmentado. A variedade e a distribuição de células produtoras de NO encontradas no globo ocular de galinha sugerem que este mensageiro desempenhe muitas funções diferentes. Desta forma, além de funções relacionadas ao processamento visual na retina, o NO também estaria relacionado a respostas de células de glia a insultos excitotóxicos e, possivelmente, a regulação do crescimento do globo ocular pela retina.

A atividade enzimática da NOS é maior em retinas de embriões de galinha de E8 e E9, decrescendo em retinas de E1-E14 e atingindo níveis mínimos em E15 (Ientile *et al.*, 1996; Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996). Entretanto, o efeito da ativação de receptores NMDA na

estimulação da atividade enzimática da NOS em cultura de células da retina de galinha é maior em E14 (retinas de E8 cultivadas por 6 dias) do que em idades anteriores, como E11 (retinas de E8 cultivadas por 3 dias) (Ientile *et al.*, 1997).

Muitos trabalhos realizados em diferentes espécies (peixes, anfíbios e mamíferos) relatam atuação do NO na adaptação à luz, promovendo fenômenos na retina externa como movimentos fotomecânicos em cones, formação de espículas e desacoplamento de junções comunicantes em células horizontais (para revisão, Djamgoz, 2000). Enfatizando estes dados, a produção de NO é estimulada pela luz em células bipolares e amácrinas, dependendo da espécie (para revisão Djamgoz, 2000; Neal *et al.*, 1998). Muitas evidências sugerem que a dopamina seja liberada na retina de vertebrados durante a exposição à luz, promovendo as alterações típicas da adaptação vistas em fotorreceptores e células horizontais (Djamgoz e Wagner, 1992). Estes dados levantam a indagação sobre uma relação entre NO e dopamina no processo de adaptação. Haamedi e Djamgoz, (2002), investigaram esta possível relação na retina de carpa e relataram que o efeito de NO é independente de dopamina, enquanto o efeito de dopamina é dependente de NO. Assim, o grupo sugeriu a via: luz → dopamina → NO → movimentos fotomecânicos de cones + formação de espículas em células horizontais.

Os efeitos do NO na adaptação à luz na retina externa também envolve regulação de respostas eletrofisiológicas por meio de modulação de receptores ionotrópicos de glutamato, pois o NO reduz a afinidade do receptor pelo ligante de forma dependente de GMPc/PKG (para revisão, Djamgoz, 2000; McMahon e Schmidt, 1999).

5. LIBERAÇÃO DE GABA NA RETINA

5.1. Liberação de GABA induzida por glutamato na retina

A ativação de iGluRs induz liberação de GABA por meio da reversão do transportador de GABA, um mecanismo independente de Ca^{2+} extracelular, mas dependente de Na^+ (Carvalho *et al.*, 1995; Do Nascimento e De Mello, 1985; Duarte *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Schwartz, 1987; Tapia e Arias, 1982; Yazulla, 1983; Yazulla e Kleinschmidt, 1983).

O efeito do glutamato na liberação de [^3H]GABA em cultura pode ser parcialmente revertido pelo antagonista de receptor NMDA (MK801) e totalmente bloqueado pela adição conjunta deste antagonista com antagonista de receptor não-NMDA (CNQX), confirmando que ambos os subtipos de receptores ionotrópicos participam deste processo (Duarte *et al.*, 1993).

Os estudos realizados por Calaza e colaboradores (2001, 2003) com retina intacta de galinha identificaram os tipos celulares que liberam GABA em resposta a diferentes aminoácidos excitatórios. No período de E14 até pós-eclosão, verificou-se que glutamato e cainato (KA) induzem liberação de GABA em células amácrinas e horizontais, enquanto NMDA induz liberação de GABA apenas em células amácrinas. Portanto, a liberação de GABA de diferentes populações celulares da retina é regulada distintamente pela ativação de receptores glutamatérgicos.

5.2. NO e Liberação de GABA Na Retina

Na retina de primatas foi demonstrado a colocalização das enzimas GAD e NOS, indicando que células que expressam GABA estariam aptas a sintetizar NO (Andrade Da Costa e Hokoç, 2003). A mesma colocalização foi relatada em retina de coelho e rato (Oh *et*

al., 1998). Estes dados contribuem para a idéia de um papel modulatório do NO no metabolismo GABAérgico na retina.

Como comentado anteriormente, a produção de NO está intimamente relacionada com a ativação de receptores NMDA, o que levanta a indagação sobre o envolvimento do NO na liberação de GABA mediada por glutamato na retina. Ientile e colaboradores (1997) relataram que o inibidor da NOS, N-nitro-L-arginina (L-NA), reduziu a liberação de [³H]-GABA induzida por NMDA em células da retina de embrião de galinha de E14 em cultura, sugerindo que a liberação de [³H]GABA induzida pela ativação de receptor NMDA é dependente de NO. Este estudo também relatou que a exposição de células da retina a um doador de NO aumenta a liberação de [³H]-GABA (Ientile *et al.*, 1997). Esta via é dependente de GMP_c já que inibidores da fosfodiesterase do GMP_c, como zaprinast e IBMX, aumentam a liberação de [³H]-GABA induzida por NMDA na retina de galinha (Ientile *et al.*, 1997).

Yu e Eldred, (2005) realizaram um extenso estudo sobre a liberação de GABA induzida por NO na retina de tartaruga, utilizando métodos imunohistoquímicos, e relataram que a estimulação de células amácrinas com um doador de NO induz a liberação de um análogo de GABA (GVG). Este efeito foi atribuído principalmente à produção de peroxinitrito, sendo observada uma conexão direta entre a liberação de GABA dependente de cálcio e os níveis de peroxinitrito na camada interna da retina. Como relatado por Ohkuma e colaboradores (2001), o peroxinitrito é capaz de ativar influxo por um canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L e do tipo P/Q. Por outro lado, peroxinitrito pode inibir canais de sódio por oxidar grupos sulfidríla destas proteínas (DuVall *et al.*, 1998). Isto sugere que o peroxinitrito ative a liberação de GABA dependente de cálcio, mas por outro lado, iniba a liberação de GABA dependente de sódio, realizada pela reversão do transportador.

O NO pode estimular a liberação de glutamato em fotorreceptores mediada pela ligação de GMP_c a canais de sódio (Kurenny *et al.*, 1994). Desta forma, o aumento da

liberação de glutamato dos fotorreceptores, evocada por GMP_c , poderia por sua vez aumentar a liberação de GABA de células horizontais.

Estes dados indicam que o NO pode ser um importante fator no processamento visual da retina por modular a transmissão GABAérgica. Entretanto, estes estudos são limitados pela utilização de doadores de NO, [3H]-GABA e análogos de GABA (GVG), deixando muitas questões em aberto com relação à viabilidade fisiológica da interação entre NO e GABA sintetizados endogenamente. Além disso, não foi realizado na retina de galinha um estudo onde as conexões celulares tenham sido preservadas e não sabemos ainda se a modulação detectada no desenvolvimento (E14) por Ientile e colaboradores (1997) seria relevante na retina madura. Por outro lado, não são conhecidos quais tipos celulares poderiam participar desta modulação nestes dois momentos e, ainda, se as vias são as mesmas verificadas na retina de tartaruga por Yu e Eldred (2005). Ainda, resta verificar se NO pode modular a atividade da GABA-T na retina como descrito em outras regiões do SNC. Sendo assim, muitos ensaios precisam ainda ser realizados para que se possa avançar na compreensão da modulação que o sistema nitrérgico exerce sobre o sistema GABAérgico na retina e sua importância para a fisiologia deste tecido.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os efeitos do óxido nítrico na transmissão GABAérgica na retina de galinha durante o desenvolvimento e principalmente na retina madura, quando toda a circuitaria encontra-se desenvolvida e o contato com a luz estabelecido. Estudamos a liberação de GABA endógeno induzida por doador de NO e por L-arginina, substrato de sua síntese, avaliando indiretamente a presença de GABA não liberado pelo método de imunohistoquímica.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

⊃ Investigar se o NO é mediador da liberação de GABA induzida pela ativação de receptores NMDA.

⊃ Verificar o efeito do precursor de NO, L-arginina, na imunorreatividade ao GABA em retinas nas idades de E8, E14 e PE.

⊃ Averiguar se eventuais efeitos da L-arginina sobre o sistema GABAérgico são inteiramente mediados pela produção de NO, ou se há algum efeito direto deste aminoácido.

⊃ Verificar se a resposta ao NO depende da ativação de sua via clássica de atuação, na qual é estimulada a produção de GMPc que pode ativar PKG.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Ovos de galinha *White Leghorn* fertilizados eram obtidos numa granja local da cidade do Rio de Janeiro. Retinas embrionárias de 8 e 14 dias e retinas de animal PE estagiados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951) eram utilizadas em diferentes protocolos experimentais. Os procedimentos para o uso de animais estavam de acordo com o guia para manipulação e uso de animais do *National Institute of Health* (Bethesda, EUA) e aprovado pela comissão de animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

1. REAGENTES

Amersham Biosciences: [³H] GABA

BIOMOL: 7-NI

CALBIOCHEM: KT 5823

ISOFAR: Paraformaldeído

Sigma: L-glutamato, glicina, anticorpo primário contra GABA (coelho), gelatina, DAB, NMDA, L-arginina, EDTA e SNAP.

Vector: Anticorpo secundário (cabra-x-coelho); kit ABC elite

GIBCO: DMEM

2. DISSECAÇÃO DAS RETINAS

Os ovos de embriões de E8 e E14 eram retirados da incubadora e abertos numa placa de Petri onde o embrião era sacrificado por decapitação. Era realizada a remoção dos globos

oculares por pinçamento do nervo óptico. Os animais PE permaneciam em uma gaiola com água e ração abundantes e eram aquecidos por uma lâmpada localizada no interior da gaiola. O animal era retirado da gaiola e rapidamente decapitado para a remoção dos olhos.

Após a enucleação era realizado um corte no globo ocular com o auxílio de uma navalha, e a metade anterior (desprovida de retina) e o humor vítreo eram desprezados. A metade posterior do globo ocular onde a retina estava localizada era acondicionada em Hanks' ou Ringer Locke para realização da estimulação do tecido com diferentes drogas.

Para cada experimento era utilizado apenas um animal. Para os ensaios onde havia dois grupos experimentais, cada retina de um único animal formava um dos grupos experimentais. Para os ensaios onde havia quatro grupos experimentais, as duas retinas de um único animal eram repartidas ao meio formando quatro grupos experimentais. A retina controle era escolhida aleatoriamente e as demais formavam qualquer dos outros grupos experimentais.

3. EXPERIMENTO DE ESTIMULAÇÃO DO TECIDO

3.1. Estimulação do tecido

Para medida da liberação de GABA endógeno, as retinas dos diferentes grupos experimentais eram acondicionadas em diferentes pocinhos de uma placa de 24 poços, com volume final de 500µl de Hanks' ou Ringer Locke acrescidos ou não de drogas. Era administrada L-arginina em diferentes concentrações (100µM, 500µM ou 1mM) ou diferentes condições do meio (com Na⁺ ou sem Na⁺) durante 25 ou 60 minutos, de acordo com o experimento. Nos experimentos em que era utilizado o Hanks' sem sódio, este íon era substituído por lítio. Em alguns experimentos eram realizadas pré-incubações por 10 minutos com diferentes drogas, dependendo do experimento: inibidor específico da nNOS, 7-nitroindazole (7-NI) (100µM); inibidor da PKG, ácido okadaico (KT5823) (1µM); ou NMDA

(10 μ M ou 100 μ M). Após a pré-incubação com uma destas drogas era realizada a incubação com L-arginina por 25 minutos ou com NMDA na presença da respectiva droga pré-incubada. Em alguns ensaios era realizada pré-incubação com L-arginina (100 μ M) por 5 minutos seguida de incubação com NMDA (10 μ M ou 100 μ M) por 20 minutos na presença de L-arginina.

Os grupos experimentais tratados com NMDA eram estimulados em solução de Hanks' ou Ringer Locke sem MgCl₂ e na presença de quelante de Mg²⁺ (EDTA 2mM) e glicina (2mM).

A incubação com SNAP em diferentes concentrações (100 μ M, 250 μ M ou 500 μ M) ou diferentes condições do meio (com Ca⁺ ou sem Ca⁺) era realizada por 30 ou 60 minutos.

Para todos os casos, o grupo controle permanecia em Hanks' ou Ringer Locke sem adição de drogas. Durante o período de estimulação as retinas eram mantidas a 37°C sob agitação freqüente.

Antes da incubação das retinas, a solução de Hanks' ou de Ringer Locke era borbulhada com uma mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% de CO₂ por cerca de 15 minutos. Em seguida o pH era ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de HCl 1N ou NaOH 1N (ou LiOH 1N para experimentos onde retirava-se o Na⁺ do meio).

3.2. Fixação e Obtenção do Tecido

As retinas de todos os experimentos mencionados passavam por etapas idênticas que vão da fixação até a imunohistoquímica e posterior análise, como será descrito.

As retinas eram fixadas em paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,16M, pH 7,2 à temperatura ambiente por 1h (E8 e E14) ou 3h (PE). Em seguida eram feitas três lavagens em TF (0,16M), pH 7,2 por 10 minutos.

Para preparo de cortes de retina em criostato elas eram crioprotegidas por imersão em solução de TF 0,16M, pH 7,2 com concentrações crescentes de sacarose, inicialmente 15% e posteriormente 30% (pernoite). Em seguida era retirado o excesso de sacarose com o auxílio de papel de filtro e a retina era então montada em meio de inclusão (OCT) (Sakura Finetek, Torrance, CA) e congelada em nitrogênio líquido ou gelo seco. Todas as retinas de um mesmo experimento eram congeladas simultaneamente num único bloco de OCT e coletadas na mesma lâmina (Figura 11). Cortes transversais de 12 μ m de retinas eram obtidos em criostato à temperatura de -15°C a -20°C.

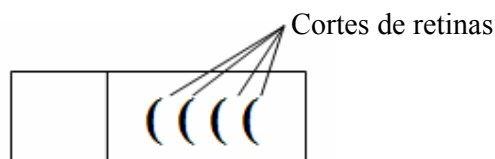


Figura 11. Esquema de uma lâmina contendo quatro cortes de retina de um mesmo experimento (uma retina controle e três experimentais). As retinas são congeladas em um mesmo bloco e os cortes são coletados na mesma lâmina.

Após a coleta dos cortes, as lâminas secavam à temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, eram armazenadas em caixas fechadas, envolvidas com filme plástico, e mantidas a -20°C até o momento da utilização.

As lâminas eram gelatinizadas previamente à obtenção dos cortes, no mínimo com um dia de antecedência, e ficavam no mínimo 8 horas secando à temperatura ambiente antes de serem utilizadas. O preparo da gelatina consistia de sua diluição a 0,5%, acrescida de alumínio de cromo 0,2% em água destilada, sendo a solução aquecida durante o processo de diluição.

3.3. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica era empregada com o objetivo de observar a presença de GABA na retina. Os cortes histológicos a serem processados para imunohistoquímica eram previamente lavados em tampão salina fosfato (PBS) três vezes por 10 minutos. Em seguida, os cortes eram incubados durante 1 hora com albumina de soro bovino (BSA) 2% com a finalidade de bloquear marcações inespecíficas causadas pelo anticorpo secundário. Todas as diluições desse protocolo eram feitas em PBS com detergente triton 0,25%, permitindo que os anticorpos penetrassem no tecido e na célula para visualizar marcação intracelular. Após incubação com BSA, era feita incubação por um pernoite com anticorpo primário policlonal contra GABA (produzido em coelho e utilizado na diluição 1:4000 - Sigma).

Após um pernoite, os cortes passavam por três lavagens em PBS por 10 minutos para remoção do excesso de anticorpo primário que não se ligou ao antígeno no tecido. Os cortes eram então reagidos por 2 horas com anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário (cabra-x-coelho; 1:200, Vector). Três lavagens em PBS por 10 minutos eram realizadas para lavar o excesso de anticorpo secundário.

A reação era revelada pela aplicação do complexo avidina-biotina peroxidase (ABC) utilizando kit ABC elite (1:50) durante 1h30min. A avidina e biotina apresentam grande afinidade e o preparo do complexo ABC consistia em misturar a avidina e a biotina marcada com peroxidase de modo que houvesse ligação entre elas, por pelo menos 30 minutos antes da aplicação, conforme recomendação do fabricante. Ao entrar em contato com o tecido, a avidina (já ligada à biotina marcada com peroxidase do complexo ABC) se liga à biotina do anticorpo secundário (figura 12).

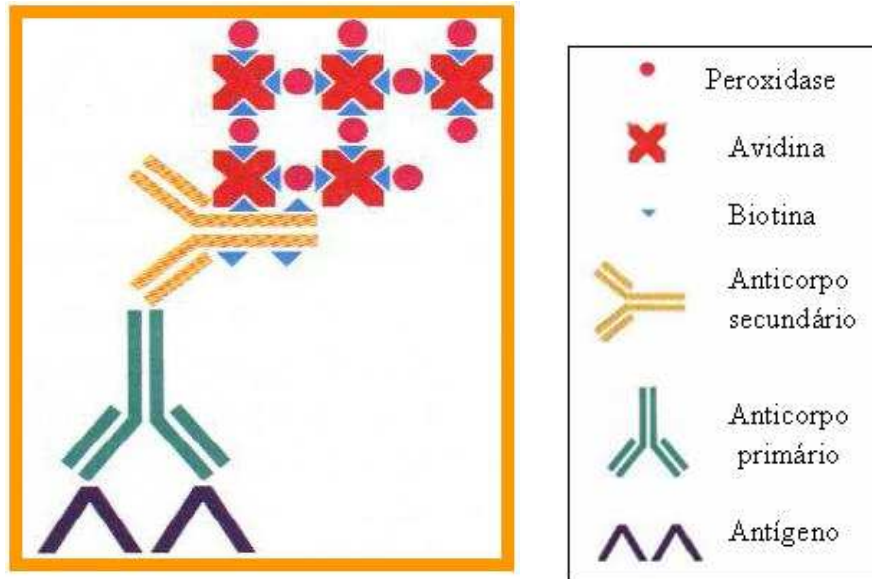


Figura 12. Esquema representativo do método do complexo avidina biotina peroxidase (Ferro, 2007).

Após a incubação com ABC, os cortes passavam por uma lavagem em PBS por 10 minutos seguida de duas lavagens em tampão tris salina (TBS) por 10 minutos. Era utilizado o cromógeno diaminobenzidina tetrahydroclorito (DAB) para revelar a reação. Para preparo, misturava-se o peróxido de hidrogênio com DAB (1mg/ml) diluído em tampão tris 0,1M, pH= 7,6. Os cortes eram expostos à mistura por 10 minutos. A peroxidase presente no complexo ABC reage com o peróxido de hidrogênio provocando sua decomposição em água e oxigênio atômico, assim a peroxidase oxida indiretamente o DAB ao reagir com o peróxido de hidrogênio. A oxidação do DAB forma um precipitado de cor castanha no local da reação.

Os cortes eram em seguida lavados três vezes em TBS por 10 minutos e então adicionava-se aos cortes algumas gotas de glicerol tamponado (40% em tampão fosfato 0,2M) e uma lamínula era cuidadosamente sobreposta aos cortes e selada com uma camada de esmalte em seu contorno.

Deve-se notar que os cortes de retina controles e experimentais foram colhidos na mesma lâmina, sofrendo o mesmo processamento imunohistoquímico. Deste modo não existiam diferenças no processamento imunohistoquímico em tais retinas que possam ser responsáveis pela diferença encontrada na quantificação de células.

3.4. Análise quantitativa

Estudamos a modulação da transmissão GABAérgica por NO em células amácrinas e em células da camada de células ganglionares da retina. A escolha dos tipos celulares teve como base o trabalho de Fisher e Stell (1999) que relataram a presença de NOS nestes tipos celulares da retina de galinha por meio da colocalização de atividade NADPH-diaforase com a imunomarcagem para NOS. Decidimos priorizar estes tipos celulares em detrimento das células horizontais que, embora também sejam GABAérgicas, não apresentariam a enzima NOS. Eram contadas as células GABA-positivas (GABA+) localizadas na camada de células ganglionares e nas três primeiras fileiras da porção mais interna da CNI, na região correspondente às células amácrinas. O total de células marcadas na retina controle era considerado 100%, sendo os outros valores comparativos a este.

Os cortes eram observados em microscópio óptico Axioskop Zeiss com objetiva de 40x e ocular de 10x. Foram analisados pelo menos dois experimentos de cada tipo de tratamento. Para cada experimento eram analisadas no mínimo três amostras (ou três lâminas como a da figura 11), nas quais eram contadas as células GABA+ em 6 a 8 campos de cada corte de retina. No grupo controle, em um campo eram contadas cerca de 100-150 células marcadas para GABA na camada de células amácrinas e cerca de 30-50 células marcadas para GABA na camada de células ganglionares. Em cada amostra era calculada a porcentagem de células

marcadas para GABA nas retinas experimentais em relação a 100% do controle da mesma amostra. Estes cálculos eram realizados para as três amostras em cada um dos três experimentos. Os dados eram analisados estatisticamente usando one-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni para comparar três ou mais grupos. Para comparar dois grupos experimentais era utilizado o teste T. Para todos os casos era considerado o erro padrão da média na estatística.

4. DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE [³H] GABA

Os globos oculares eram dissecados conforme descrito anteriormente. Em seguida eram transferidos para uma placa de Petri onde era feito o explante descolando-se totalmente a retina do epitélio pigmentado e picotando-a em pequenos fragmentos com o auxílio de pinças. Em seguida, os explantes eram incubados em DMEM acrescido de 0,3 µCi de [³H] GABA durante 90 minutos a 37°C. Após o período de incorporação, os explantes eram lavados 6 vezes com uma solução de Hanks' contendo 12 mM de glicose a 37°C, com a finalidade de retirar o excesso de radioatividade não captada pelos explantes.

A perfusão era realizada dividindo-se igualmente os explantes nos suportes contendo papel de filtro como o da Figura 13. Os filtros recebiam trocas sucessivas de 0,5 ml de Hanks' contendo 4mM de glicose com ou sem drogas em pulsos de 12 minutos a 37°C. Após cada pulso, era retirada a tampa do suporte de forma que as frações pudessem ser coletadas em um tubo de ensaio.

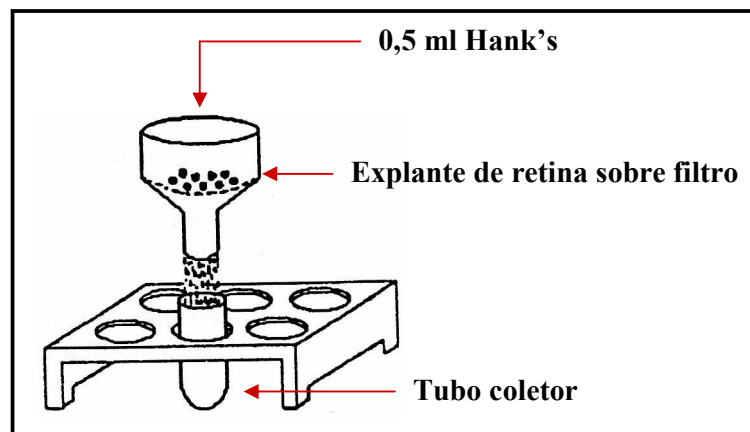


Figura 13. Esquema representando o suporte contendo filtro que recebe o explante e por onde é realizada a perfusão. O Hanks' 4mM de glicose com ou sem drogas era utilizado em incubação de 12 minutos e em seguida recolhido em tubo de ensaio (Adaptado de Do Nascimento *et al.*, 1991)

As três primeiras coletas eram basais (perfusão apenas em Hanks' contendo 4mM de glicose), o quarto e quinto pulsos eram estimulados com L-arginina (100 μ M) ou glutamato (2mM), diluídos em Hanks' contendo 4mM de glicose. Os três últimos pulsos eram basais. Eram retirados 100 μ l de cada fração coletada para determinação da radioatividade liberada a cada troca de solução. No final da perfusão, os explantes eram lisados com 1ml de água destilada a fim de obter todo o conteúdo radioativo que não foi liberado. Os explantes eram finalmente submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e centrifugados em uma microcentrífuga por 1 minuto. Uma alíquota de 100 μ l deste sobrenadante coletada para determinação da radioatividade por cintilação. Para avaliar a liberação de [3 H] GABA, as frações liberadas eram somadas com a fração intracelular (não liberada) e este total era considerado como 100% de [3 H] GABA captado durante o carregamento. A liberação de [3 H] GABA em cada fração era calculada em relação ao total de [3 H] GABA captado.

IV. RESULTADOS

1. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO GABA ENDÓGENO

1.1 Papel do NO na Liberação de GABA estimulada por NMDA

Para investigar o papel do NO na liberação de GABA induzida pela ativação de receptores NMDA, retinas de animal PE foram pré-incubadas com ou sem um inibidor específico da NOSn, 7NI (100 μ M), por 10 minutos e em seguida estimuladas ou não com NMDA (100 μ M) por 30 minutos, na presença ou não de 7-NI (100 μ M). A imunohistoquímica para GABA indicou que o tratamento com NMDA induziu aumento na liberação de GABA (Figura 14), como confirmado pela contagem de células que indicou redução de 53% no número de células amácrinas (Figura 15A) e de 38% no número de células da CCG (Figura 15B) marcadas para GABA (GABA+).

A liberação de GABA estimulada por NMDA não foi bloqueada pelo antagonista da NOSn em células amácrinas (Figura 14 e 15A), sugerindo que nestas células a liberação de GABA estimulada por NMDA não é mediada por NO. Na CCG, o tratamento com 7-NI bloqueou o efeito do NMDA (Figura 14 e 15 B). Isto indica que o NO poderia mediar a liberação de GABA induzida por NMDA na CCG.

O tratamento com 7-NI sozinho induziu redução de 34% no número de células amácrinas (Figura 15A) e de 43% no número de células na CCG GABA+ (Figura 15B) em relação ao controle, sugerindo que o óxido nítrico basal poderia estar inibindo a liberação basal de GABA e/ou sua degradação nos dois tipos celulares, já que foi relatado que, em algumas regiões do SNC, o NO pode inibir a degradação de GABA por inibir a enzima GABA-T (Jayakumar *et al.*, 1999; Paul e Jayakumar, 2000; Paul e Ekambaram, 2005).

Assim, haveria um possível efeito bifásico na população celular da CCG. Talvez este efeito esteja relacionado à disponibilidade de NO: A produção de NO em alta concentração, aquela gerada pela ativação de receptores NMDA, poderia estimular a liberação e/ou degradação de GABA; enquanto o NO basal, cuja ação é bloqueada pelo inibidor da NOS, estaria inibindo a liberação basal de GABA e/ou sua degradação. Assim, fisiologicamente, o NO em concentração basal seria um modulador negativo da liberação e/ou degradação de GABA, e um modulador positivo quando sua concentração é alta na CCG. Em células amácrinas apenas ocorreria modulação negativa.

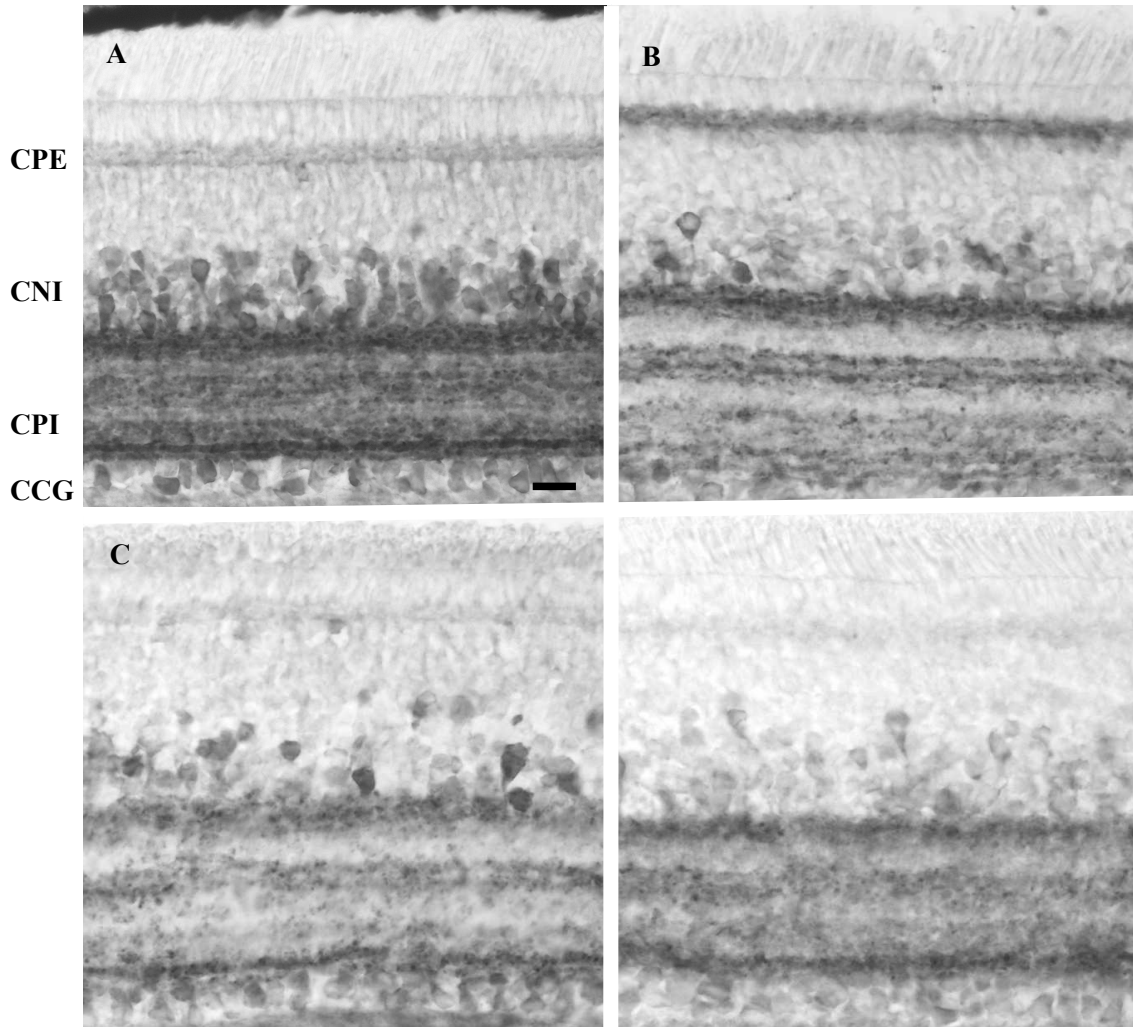


Figura 14. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE imunorreativa para GABA (IR-GABA). As retinas foram pré-incubadas com ou sem 7-NI (100 μ M) durante 10 minutos e em seguida incubadas com ou sem NMDA (100 μ M) por 30 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks' durante todas as etapas. B) Retina incubada com NMDA (100 μ M) apresenta redução na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. C) Retina pré-incubada com um inibidor da NOS (7-NI 100 μ M) e incubada com NMDA (100 μ M) na presença de 7-NI. O 7-NI bloqueou o efeito de NMDA em células da CCG, mas não em células amácrinas. D) Retina pré-incubada e incubada apenas na presença de 7-NI apresenta liberação de GABA em células amácrinas e na CCG. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = 20 μ m.

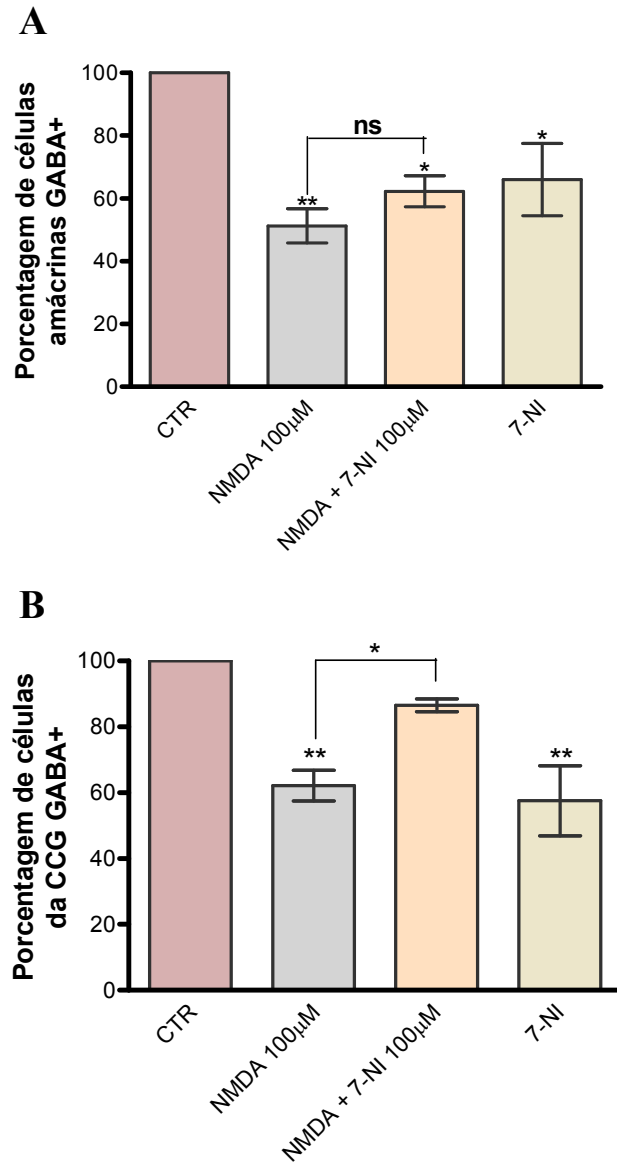


Figura 15. Histograma da quantificação de células amácrinas (A) e de células da CCG (B) marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE, sob diferentes condições de incubação. (CTR e NMDA: N=5; NMDA + 7-NI e 7-NI: N=3. Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P< 0,01).

Como nossos dados sugerem que a liberação de GABA induzida por NMDA é dependente de NO na CCG, nós investigamos em seguida se a produção de NO estimulada pela administração de seu precursor L-arginina potencializaria o efeito do NMDA. Realizamos uma pré-incubação com ou sem L-arginina (100µM) durante 5 minutos seguida de incubação com ou sem NMDA (100µM) na presença ou não de L-arginina (100µM), por

20 minutos. A L-arginina não potencializou a liberação de GABA estimulada por NMDA na camada de células amácrinas (Figura 16C e 17A), como esperado já que o efeito do NMDA nesta população é independente de NO. Entretanto, na CCG também não houve potencialização do efeito do NMDA pela L-arginina (Figura 17B). Isto sugere que a ativação de receptores NMDA induza a atividade máxima da enzima NOS, de forma que o aumento no substrato L-arginina não seja capaz de aumentar a produção de NO.

Quando administrada sozinha, a L-arginina (100 μ M) induziu aumento na imunorreatividade ao GABA em relação à retina controle nas duas camadas celulares estudadas (Figura 16D). Houve um aumento de 62% no número de células amácrinas GABA+ (Figura 17A), e de 34% no número de células da CCG GABA+ (Figura 17B). É improvável que este efeito tenha ocorrido pelo aumento da captação de GABA já que este aminoácido não foi fornecido pelo tratamento. Também não é provável que o aumento da imunorreatividade para GABA tenha ocorrido pelo aumento de sua síntese, uma vez que foi descrito que o NO inibe a atividade da GAD na retina de galinha (Almeida *et al.*, 2002). Sendo assim, o efeito deve ocorrer pela inibição da liberação basal e/ou da degradação de GABA, como sugerido anteriormente pelo tratamento com 7-NI (Figura 15).

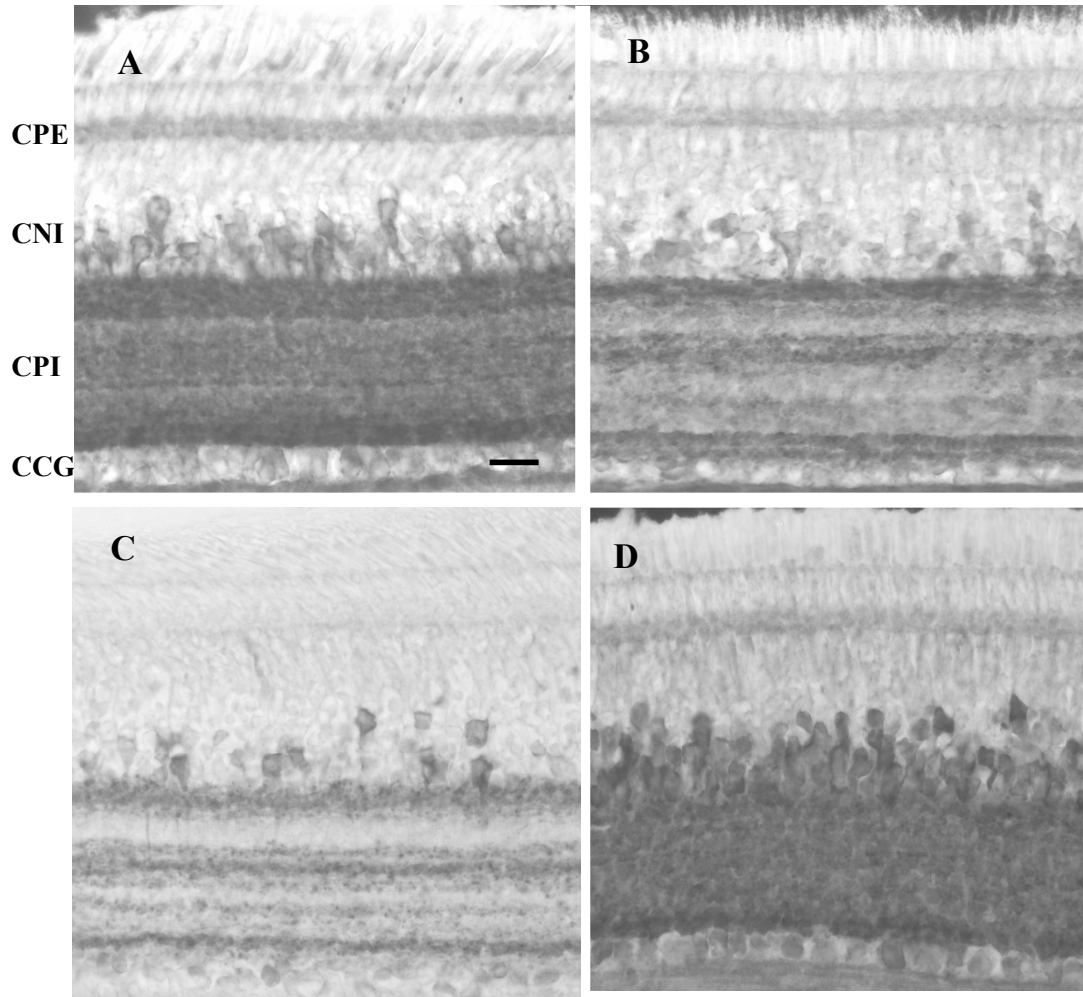


Figura 16. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina ($100\mu\text{M}$) durante 5 minutos, e em seguida estimuladas ou não com NMDA ($100\mu\text{M}$) por 20 minutos na presença ou não de L-arginina. A) Retina controle mantida em Ringer Lock. ou Hanks'. B) Retina incubada apenas na presença de NMDA $100\mu\text{M}$ apresenta redução da imunoreatividade para GABA em células amácrinas e da CCG. C) Retina pré-incubada com L-arginina e incubada na presença de NMDA $100\mu\text{M}$ + L-arginina $100\mu\text{M}$. A L-arginina não afeta a liberação de GABA induzida por NMDA em células amácrinas e em células da CCG D) Retina incubada apenas na presença de L-arginina $100\mu\text{M}$ apresenta aumento na imunoreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = $20\mu\text{m}$.

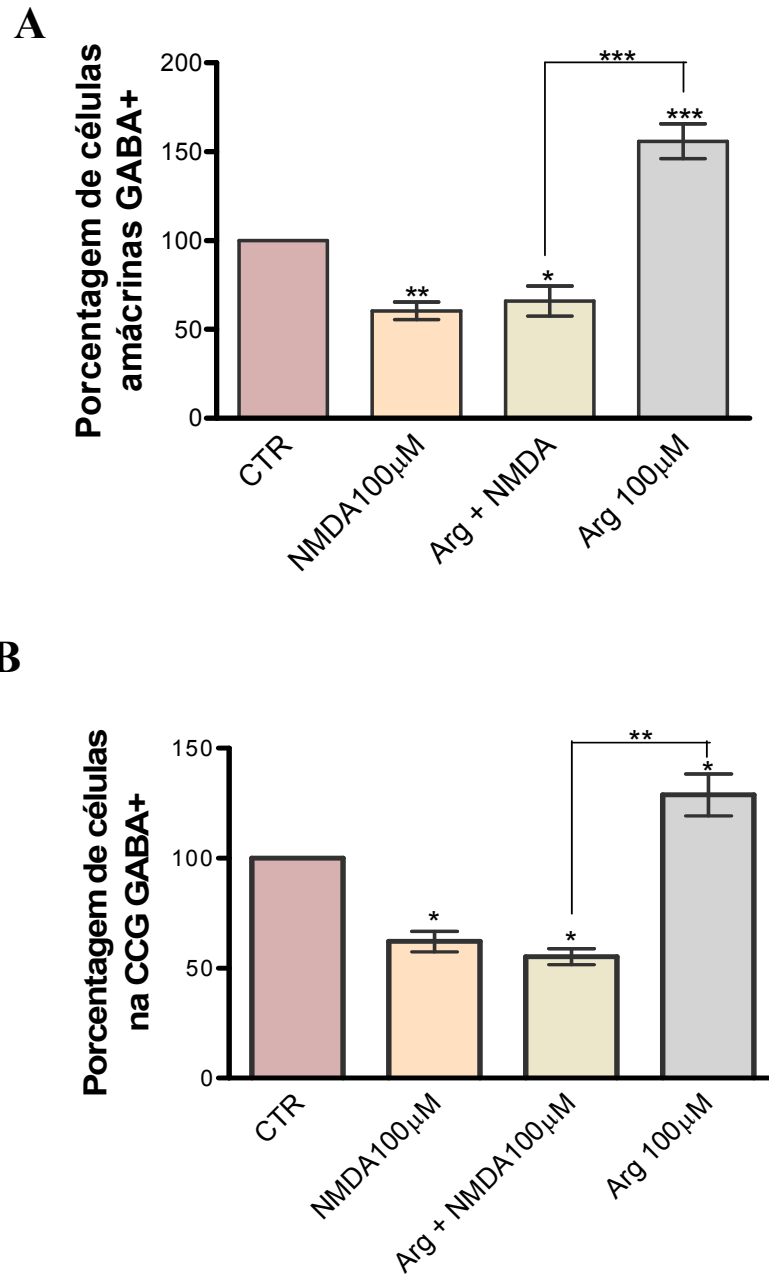


Figura 17. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animal PE, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (CTR e L-arginina (100µM): N=7; NMDA; N=5; L-arginina + NMDA; N=3). (B) Células da CCG (CTR e L-arginina (100µM): N=12; NMDA; N=5; L-arginina + NMDA; N=3). (Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P< 0,01).

1.2 Efeito do aumento da produção de NO estimulada por L-Arginina na liberação basal e/ou degradação de GABA endógeno

Para estudar os efeitos do NO no sistema GABAérgico independente da ativação de receptores NMDA, nos perguntamos se a biossíntese de NO estimulada pela administração de doses crescentes de L-arginina poderia modular a liberação basal e/ou a degradação de GABA. Retinas de animais PE foram incubadas com ou sem L-arginina em diferentes concentrações (100 μ M, 500 μ M e 1mM) durante 25 minutos de incubação.

Como visto anteriormente, L-arginina (100 μ M) aumenta a imunorreatividade para GABA nos dois tipos celulares estudados. Os tratamentos com 500 μ M ou 1mM de L-arginina durante 25 minutos não tiveram efeito em células amácrinas (Figura 19A). Entretanto, na CCG, 1mM de L-arginina induziu redução de 35% no número de células GABA+ (Figura 19B), corroborando para nossa hipótese de que na CCG a disponibilidade de NO em alta concentração estimula a liberação de GABA, enquanto doses menores geram efeito oposto na liberação ou mesmo inibem a degradação de GABA.

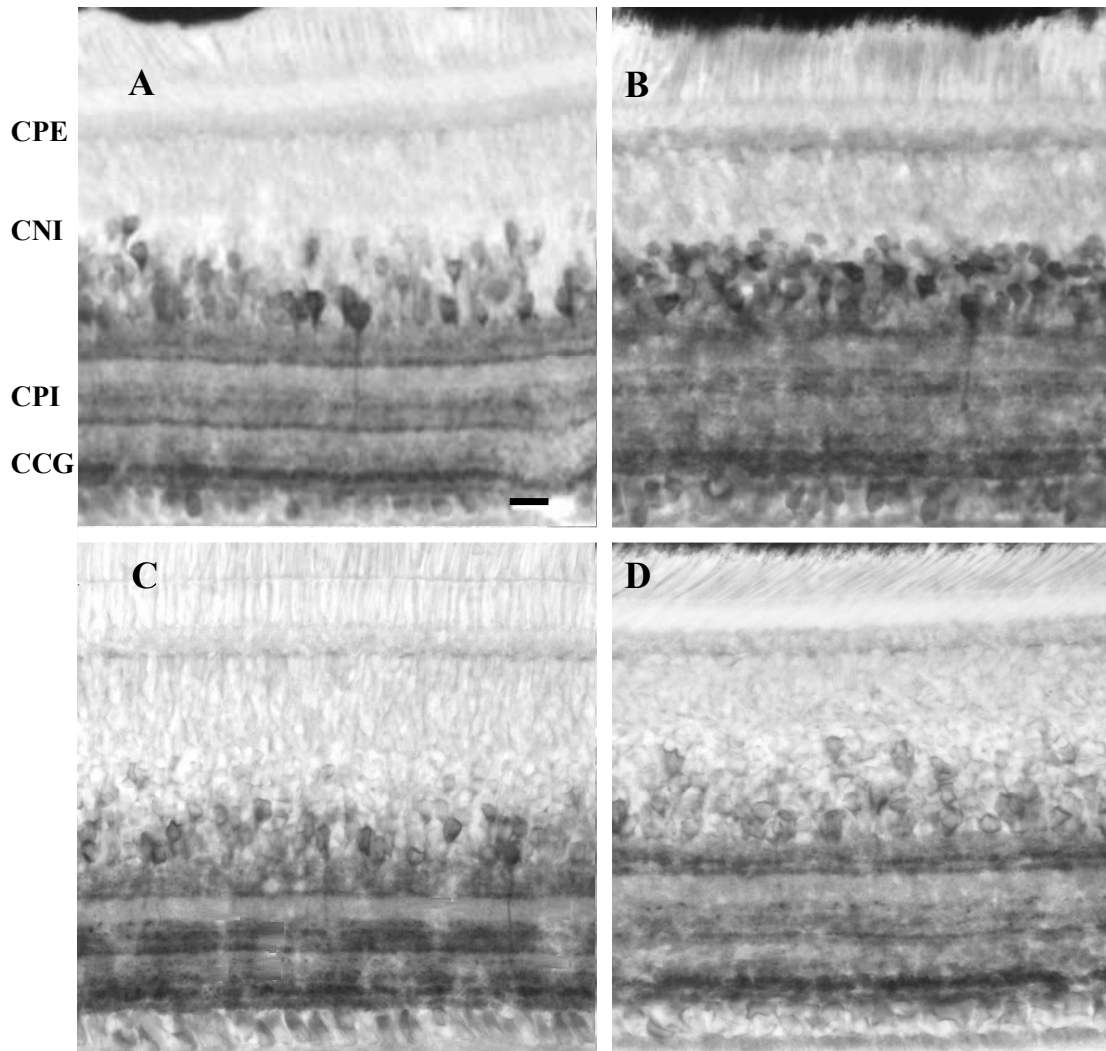


Figura 18. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina (100 μ M, 500 μ M e 1mM) durante 25 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks'. B) O tratamento com L-arginina (100 μ M) induziu aumento na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. C) O tratamento com L-arginina (500 μ M) não teve efeito em células amácrinas ou em células da CCG. D) O tratamento com L-arginina (1mM) não teve efeito em células amácrinas, mas induziu liberação de GABA na CCG. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = 20 μ m.

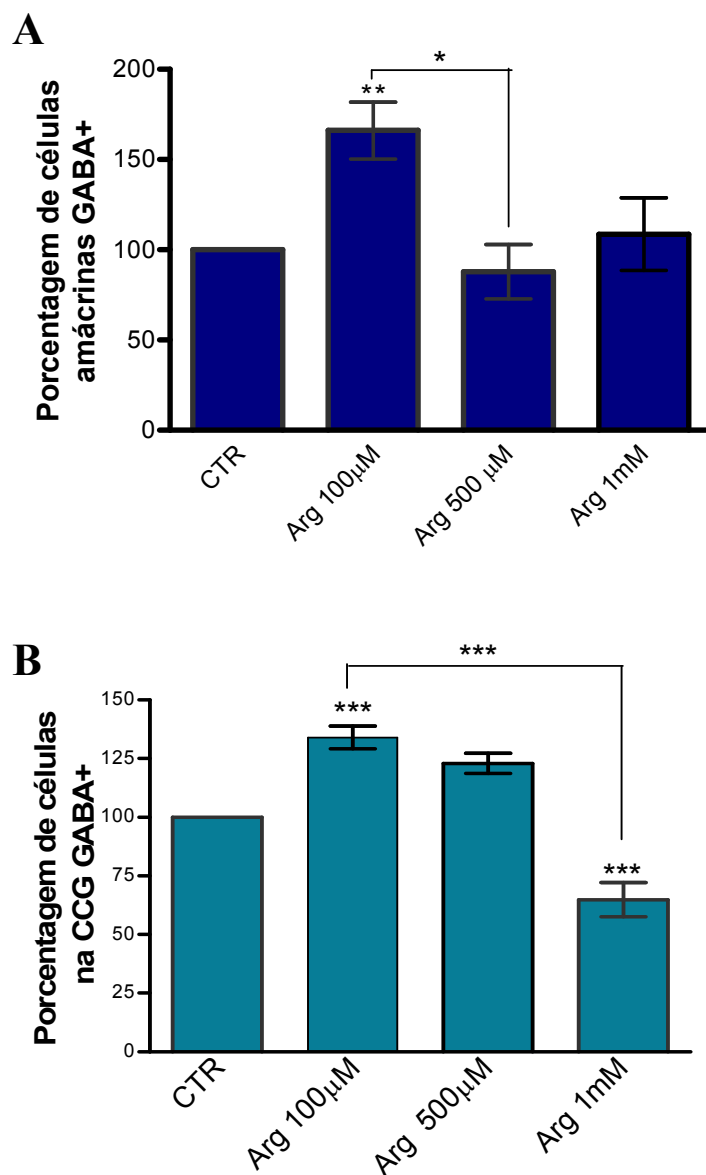


Figura 19. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (CTR e L-arginina (100μM): N=13; L-arginina (500μM e 1mM): N=3). (B) Células da CCG (CTR e L-arginina (100μM): N=12; L-arginina (500μM): N=2 e L-arginina (1mM): N=3. Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P<0,01. *** P<0,001).

Com o objetivo de estudar os efeitos do tratamento com L-arginina em relação ao tempo, realizamos uma incubação prolongada (60 minutos) com L-arginina (100μM, 500μM e 1mM) em retinas de animais PE. Durante este período de tratamento, nenhuma alteração no número de células amácrinas GABA+ (Figura 20A) ou de células na CCG GABA+ (Figura

20B) foi detectada entre retinas tratadas com L-arginina e retinas controle. É possível que após 60 minutos o efeito já tivesse ocorrido e terminado em função da depleção da L-arginina fornecida. Portanto, para realização dos demais experimentos adotamos o tratamento com L-arginina (100 μ M) durante 25 minutos.

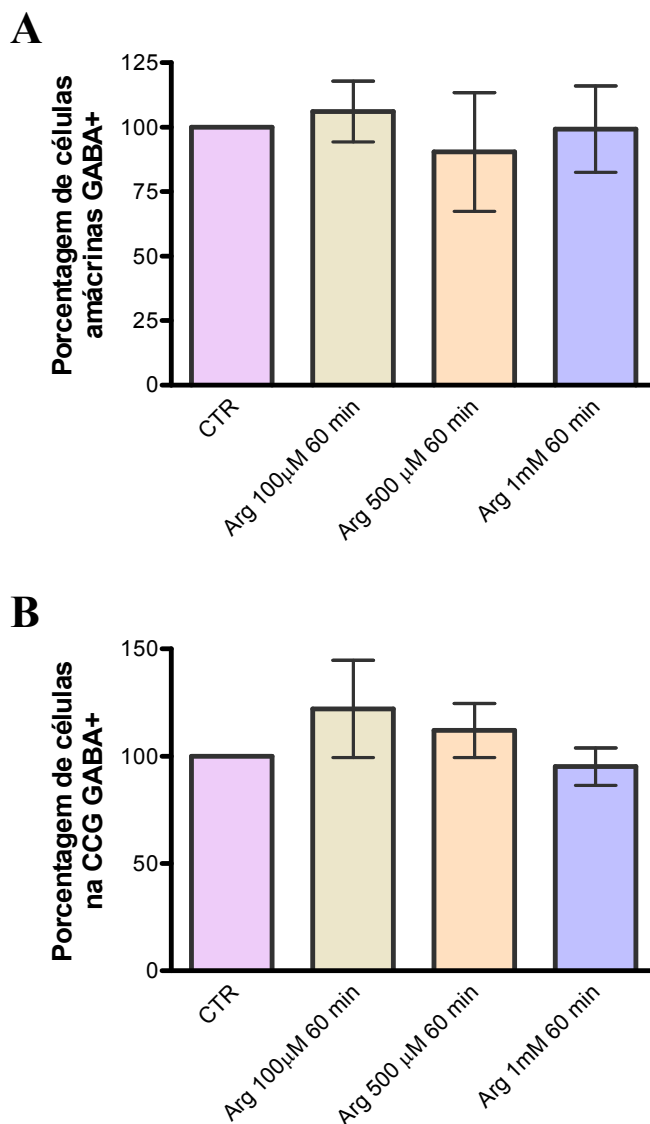


Figura 20. Histograma da quantificação de células amácrinas (A) e de células da CCG (B) marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE. As retinas foram incubadas por 60 minutos em L-arginina (100 μ M, 500 μ M e 1mM). Nenhuma das concentrações de L-arginina utilizada causou efeito na liberação de GABA nas populações celulares estudadas. (N=3. Valores são média \pm SEM).

Para verificar o perfil modulatório do NO produzido a partir de L-arginina sobre o sistema GABAérgico durante o desenvolvimento, retinas de animais E8 e E14 também foram incubadas com L-arginina durante 25 minutos e foi feita a imunohistoquímica para GABA (Figuras 21 e 23). Em retinas de E8, o tratamento com L-arginina não alterou o número de células IR-GABA, mas promoveu aumento nas células da CCG (Figura 22). Em E14, observamos um aumento no número de células IR-GABA em ambos os tipos celulares analisados, sugerindo que o sistema GABAérgico é modulado por NO durante o período embrionário (Figura 24).

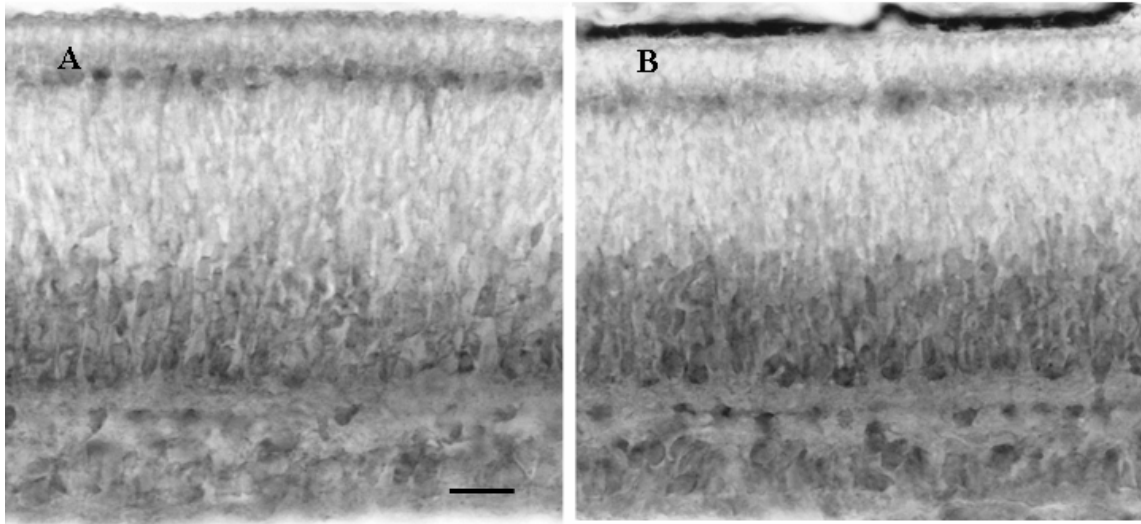


Figura 21. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha E8 IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina (100 μ M) durante 25 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks'. B) O tratamento com L-arginina (100 μ M) induziu um discreto aumento na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. Escala = 20 μ m.

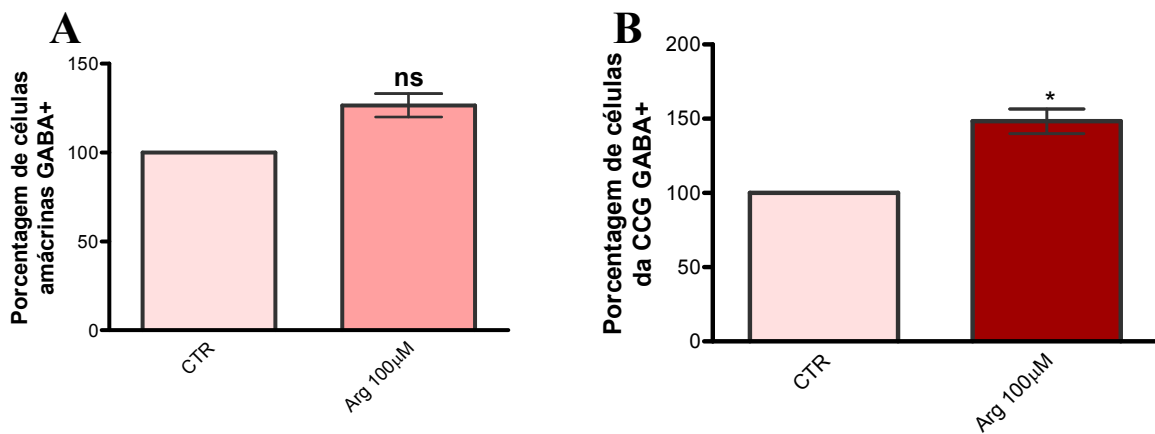


Figura 22. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em retinas E8 em relação a 100% do CTR, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas. (B) Células da CCG. (N=3. Valores são média \pm SEM)

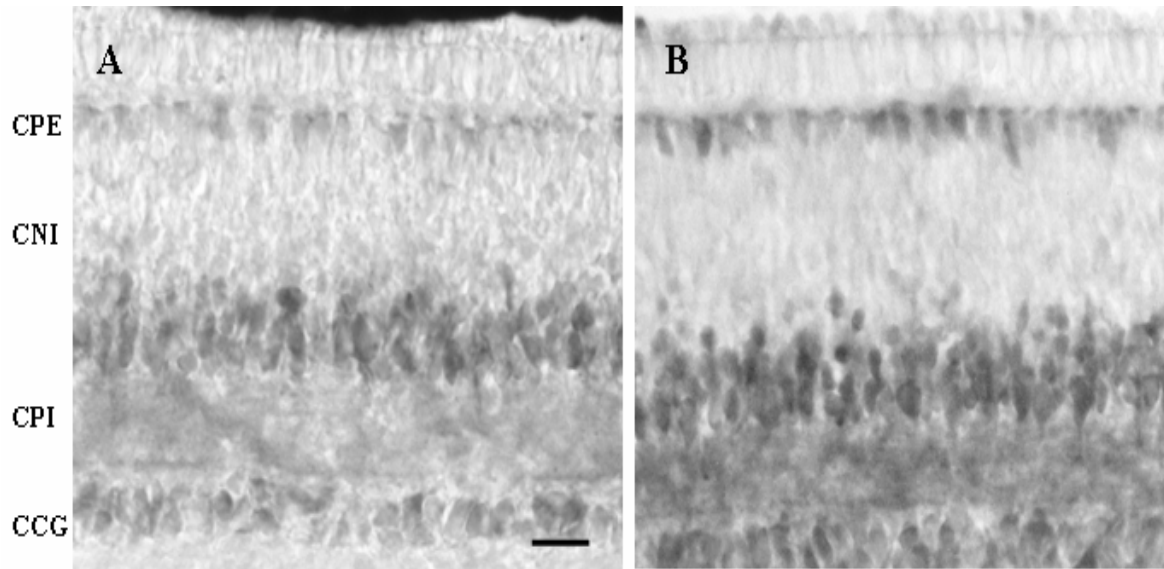


Figura 23. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha E14 IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina (100 μ M) durante 25 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks^o. B) O tratamento com L-arginina (100 μ M) induziu aumento na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. Escala = 20 μ m.

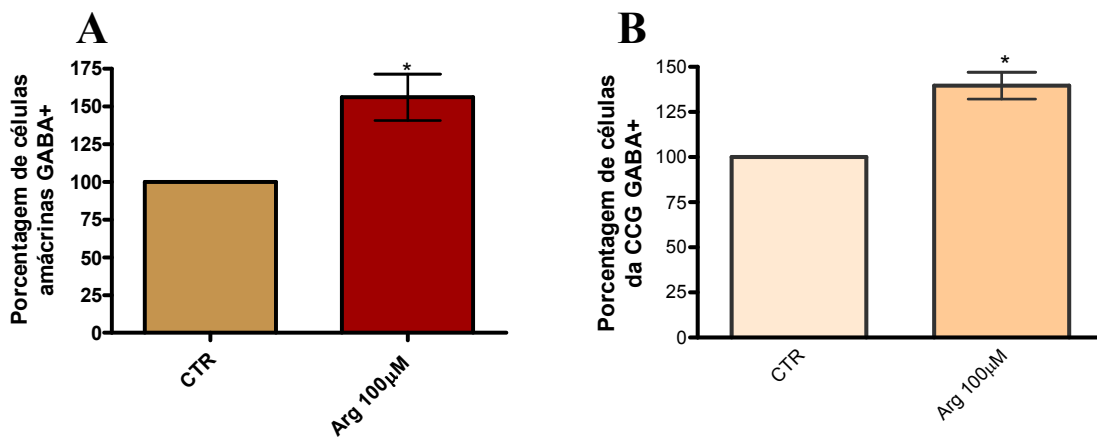


Figura 24. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em retinas E14 em relação a 100% do CTR, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (N=6). (B) Células da CCG (N=3) (Valores são média \pm SEM . * P<0,05).

Para nos certificarmos de que o efeito da L-arginina sobre o sistema GABAérgico ocorre em função da produção de NO, realizamos pré-incubação com ou sem um inibidor específico da NOSn, 7-NI (100µM), por 10 minutos, seguida de incubação com ou sem L-arginina (100µM) na presença ou não de 7-NI (100µM) por 25 minutos em retinas de animais PE. O efeito de L-arginina foi totalmente bloqueado pelo inibidor da NOSn em células amácrinas (Figura 25 e 26A) e em células da CCG (Figura 25 e 26B), indicando que os resultados obtidos pelo tratamento com L-arginina podem ser totalmente atribuídos à produção de NO.

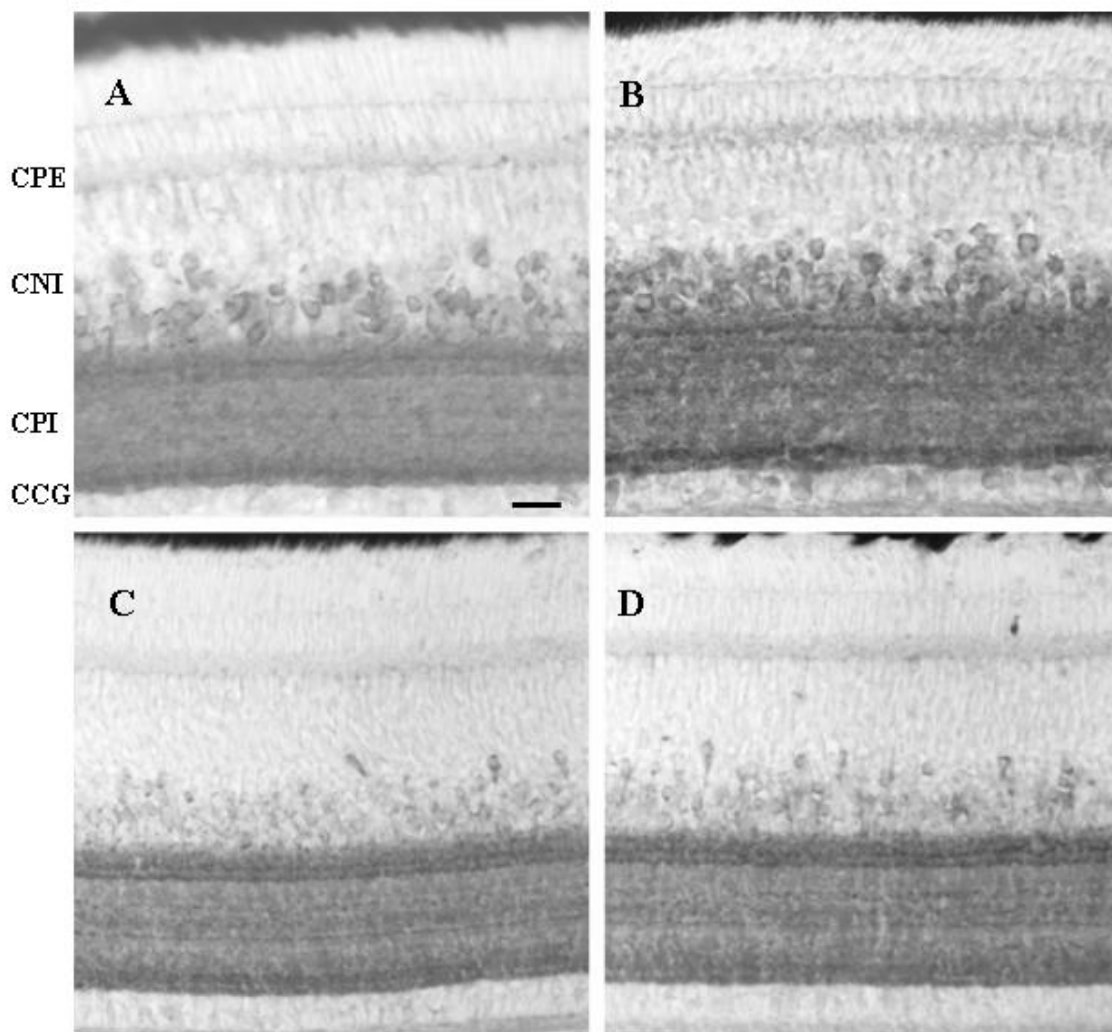


Figura 25. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem o inibidor da NOSn, 7-NI (100 μ M), durante 10 minutos, e em seguida incubadas com ou sem L-arginina na presença ou não de 7-NI, por 25 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock. ou Hanks' B) Retina incubada apenas na presença de L-arginina (100 μ M), mostrando aumento na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. C) Retina pré-incubada com 7-NI (100 μ M) e incubada com L-arginina + 7-NI. O 7-NI bloqueou o efeito da L-arginina em células amácrinas e em células da CCG. D) Retina pré-incubada e incubada apenas na presença de 7-NI (100 μ M), apresentando redução da imunorreatividade para GABA em células amácrinas e na CCG. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = 20 μ m.

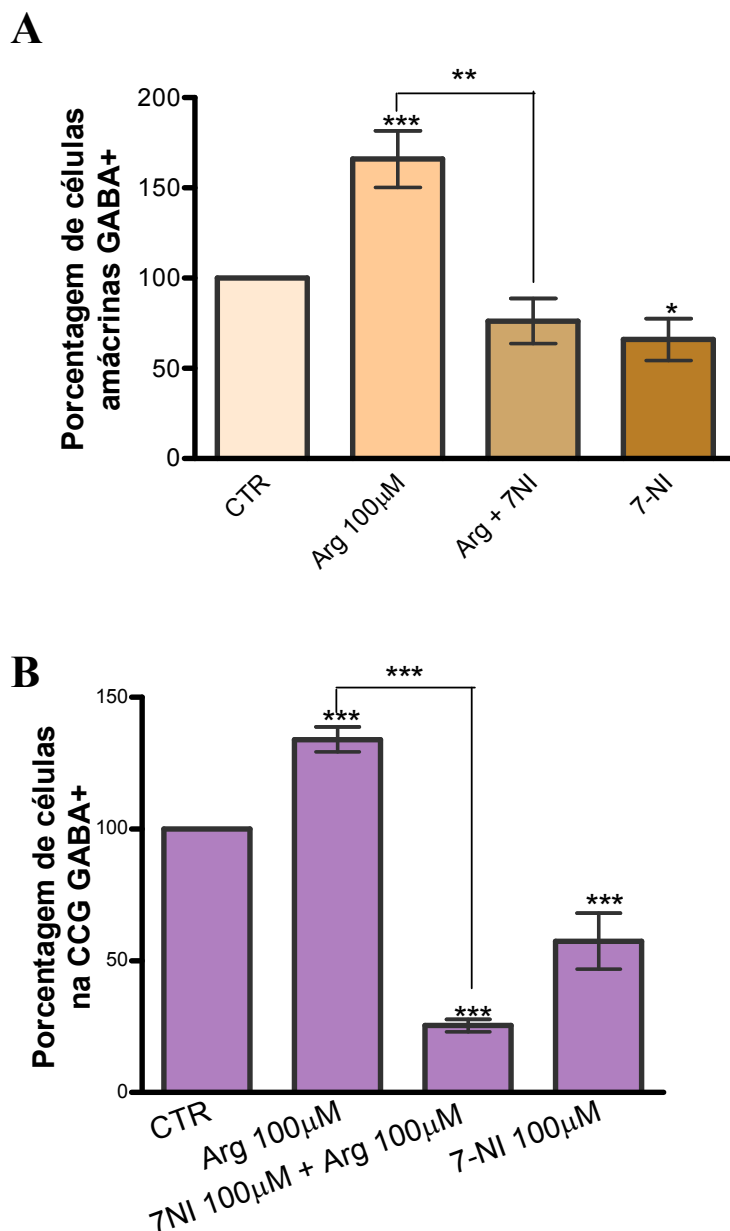


Figura 26. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em retinas de animais PE em relação a 100% do CTR, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (CTR e L-arginina: N=13; 7-NI + L-arginina: N=3; 7-NI: N=5). (B) Células da CCG (CTR e L-arginina (100µM): N=12; 7-NI + L-arginina: N=2; 7-NI (100µM): N=3). (Valores são média \pm SEM . * P<0,05; ** P<0,01. *** P<0,001).

A fim de comparar o efeito do NO biossintetizado (produzido a partir da administração de L-arginina) com o efeito do NO aplicado exogenamente, utilizamos um doador de NO, o SNAP, em diferentes concentrações (100µM, 250µM e 500µM) durante 30 minutos de

incubação em animais PE. Para todas as concentrações de SNAP utilizadas, não foi verificado efeito nas populações estudadas (Figura 27).

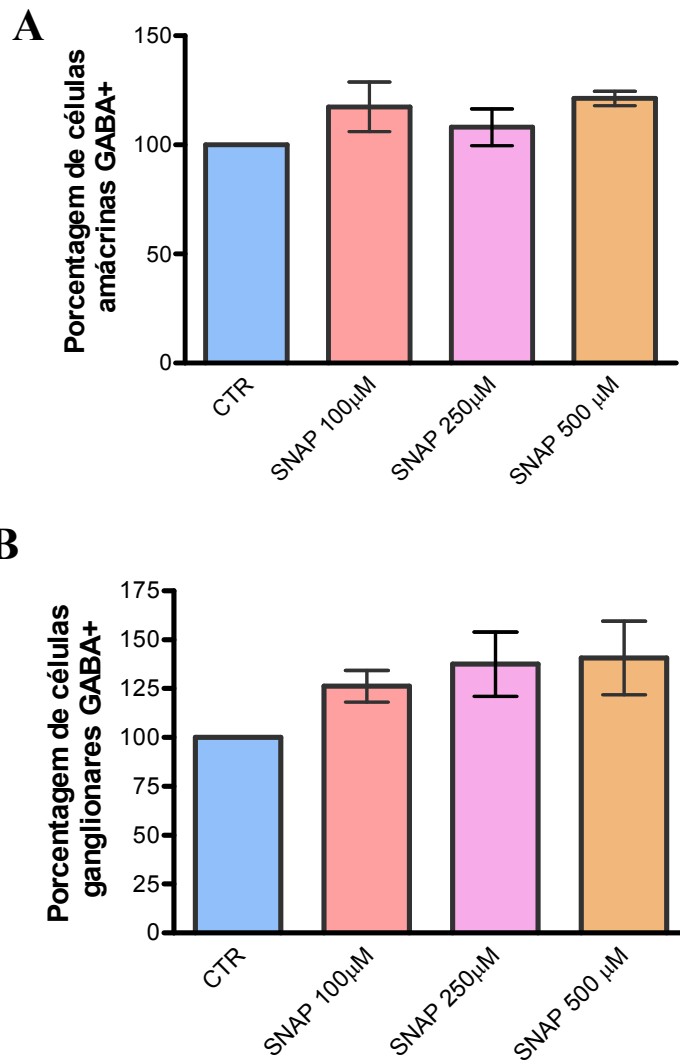


Figura 27. Histograma da quantificação de células amácrinas (A) e de células da CCG (B) marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE. As retinas foram incubadas por 30 minutos com ou sem SNAP (100µM, 250µM e 500µM). Nenhuma das concentrações de SNAP causou efeito na liberação de GABA nas populações celulares estudadas. (N=3. Valores são média \pm SEM).

Sabemos que o SNAP é um doador lento e como nenhum efeito foi verificado no tratamento durante 30 minutos, prolongamos o tratamento para 60 minutos. Nesta condição

verificamos, como esperado, o aumento na imunorreatividade para o GABA na retina de animais PE tratadas com SNAP (500 μ M) em relação a retinas CTR (Figura 28). Este tratamento induziu aumento de 99,3% no número de células amácrinas e de 111% no número de células da CCG (Figura 29B) GABA+ em relação ao controle, mas não houve efeito nas outras concentrações estudadas (100 μ M e 250 μ M) em nenhum dos tipos celulares estudados (Figura 29).

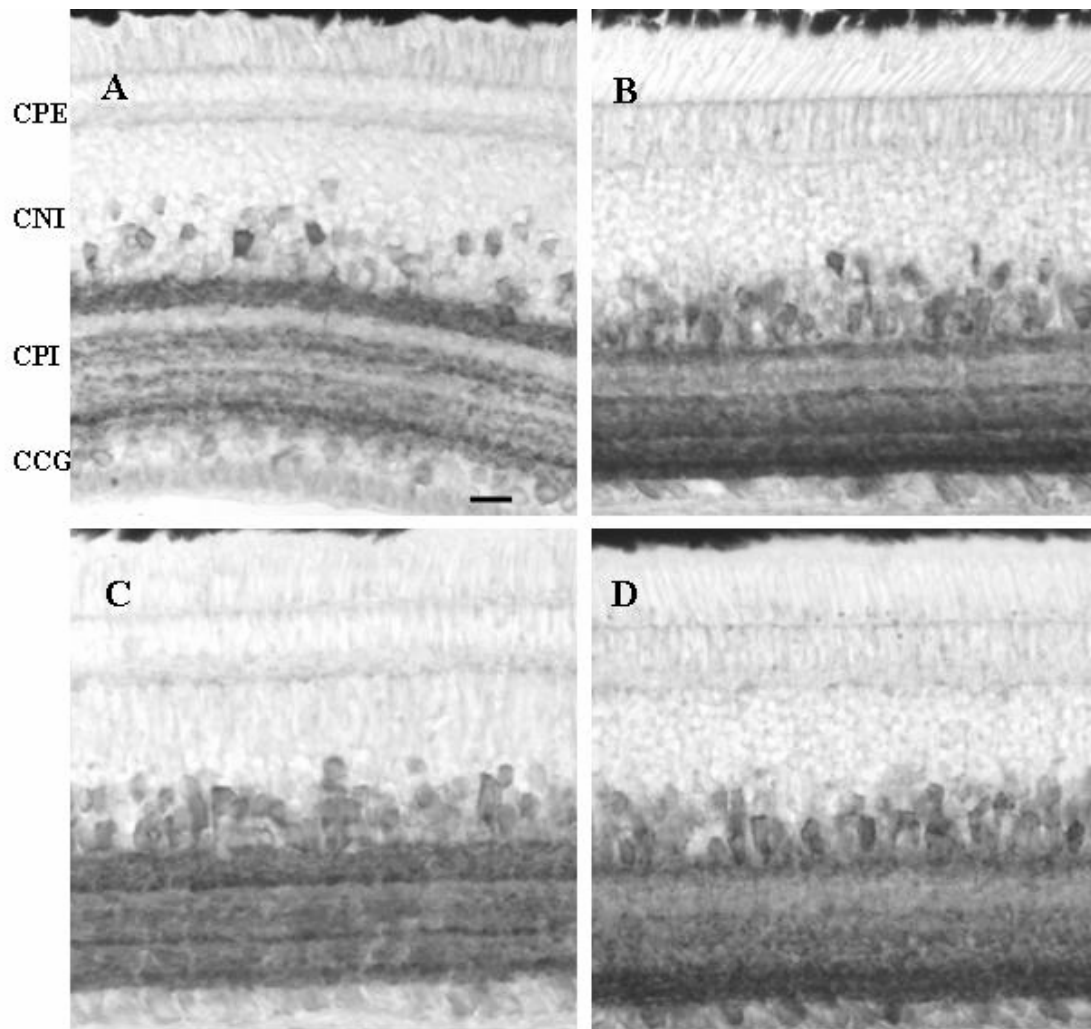


Figura 28. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE IR-GABA. As retinas foram incubadas com ou sem SNAP (100 μ M, 250 μ M e 500 μ M) durante 60 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks'. O tratamento com SNAP

(100 μ M) (B), (250 μ M) (C), e (500 μ M) (D) induziu aumento na imunorreatividade para GABA em células amácrinas e em células da CCG. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = 20 μ m.

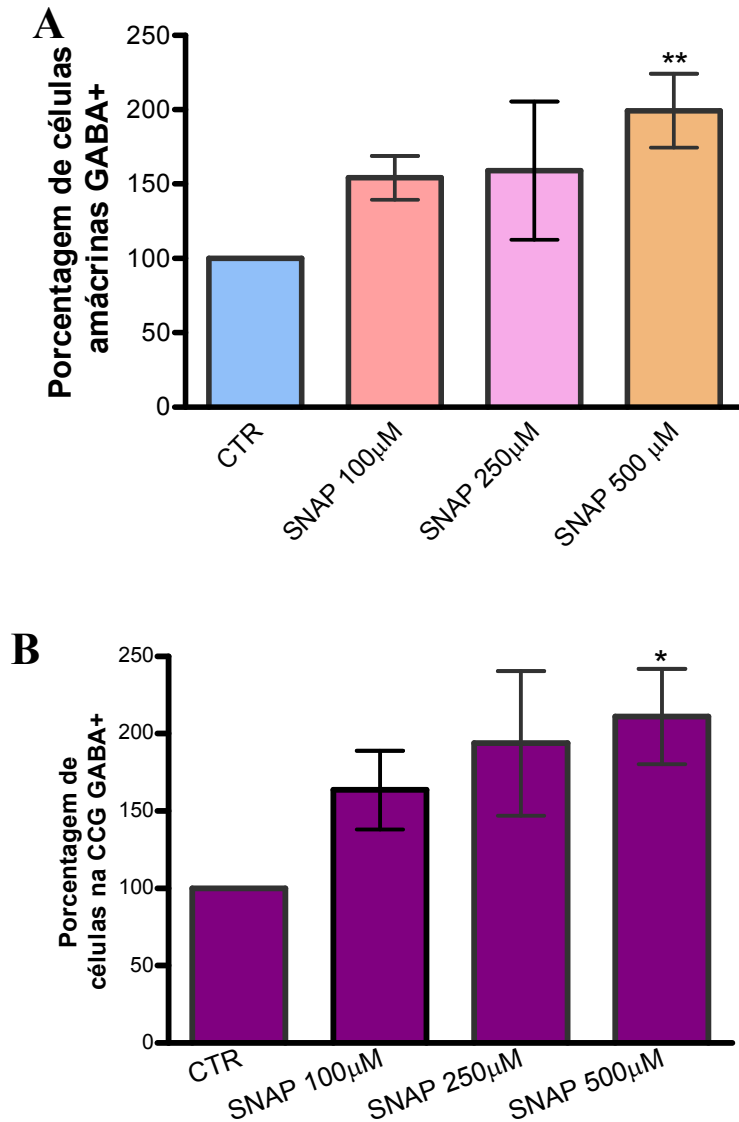


Figura 29. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (CTR e SNAP (500 μ M): N=5; SNAP (100 μ M e 250 μ M): N=3). (B) Células da CCG (N=4). (Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P< 0,01).

Embora algumas disparidades sejam notadas entre os tratamentos com SNAP e L-arginina em relação ao tempo e concentração, ambos induzem aumento no número de células

marcadas para GABA, sugerindo que o NO, tanto endógeno quanto exógeno, cause bloqueio da liberação basal deste aminoácido e/ou inibição de sua degradação, hipótese última que não pode ser descartada. A administração de SNAP (500 μ M) em homogenado de retina de galinha inibe produção de GABA por inibir a atividade da enzima GAD (Almeida *et al.*, 2002). Este efeito provavelmente está mascarado em nossos resultados uma vez que o tratamento com SNAP (500 μ M) induziu aumento na imunorreatividade para GABA, provavelmente em função da inibição da degradação e/ou da liberação de GABA induzida por NO.

Assim, para averiguar se o NO induz aumento no número de células GABA⁺ por inibição da liberação de GABA ou pela inibição de sua degradação pela enzima GABA-T, realizamos um experimento onde os íons sódio foram retirados do meio, o que causa bloqueio da liberação de GABA (que é predominantemente dependente de sódio na retina) (Tapias e Arias, 1982; Morán e Pasantes-Morales, 1983; Yazulla, 1983; Yazulla e Kleinschmidt, 1983; Do Nascimento e De Mello, 1985; Schwartz, 1987; Duarte *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 1995). Desta forma, conseguimos isolar indiretamente o efeito do NO sobre a GABA-T. De fato, na camada de células amácrinas (Figura 30A) ou na CCG (Figura 30B), o tratamento com L-arginina (100 μ M e 1mM) durante 25 minutos não induziu nenhum efeito em meio sem íons sódio quando comparado ao meio com íons sódio. Isto sugere que a produção moderada de NO por 100 μ M de L-arginina induz aumento da imunorreatividade para GABA por inibir a liberação sódio-dependente de GABA e não sua degradação pela enzima GABA-T. Este dado também sugere que a alta produção de NO por 1mM de L-arginina induz redução da imunorreatividade para o GABA por estimular a liberação sódio-dependente de GABA e não por inibir sua síntese pela enzima GAD.

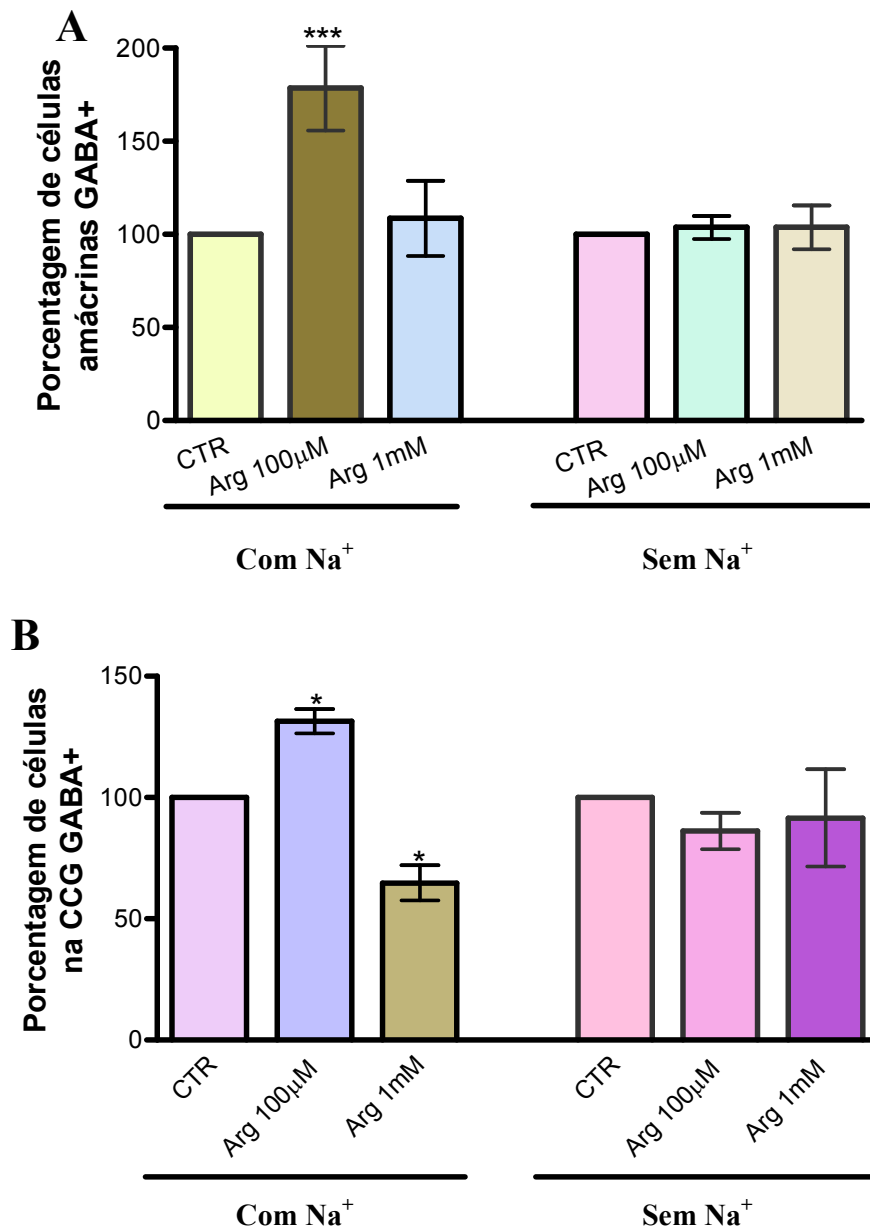


Figura 30. Histograma da quantificação de células amácrinas (A) e de células da CCG (B) marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE. As retinas foram incubadas por 25 minutos com ou sem L-arginina (100µM e 1mM) na presença ou não de sódio. A ausência de sódio no meio extracelular bloqueou o efeito da L-arginina (N=3) (Valores são média \pm SEM. *P<0,05; ***P<0,001).

1.3 Efeito do NO na liberação de GABA exógeno

Dados da literatura sugerem que o NO estimula a liberação de GABA exógeno (Ientile *et al.*, 2007) ou de análogo de GABA (Yu e Eldred, 2005) na retina. De forma oposta, em nosso modelo sugerimos que a produção moderada de NO inibe a liberação basal de GABA endógeno na retina intacta. Para investigar se estas diferenças entre os resultados de liberação de GABA endógeno e [³H]GABA ocorrem em função das diferentes metodologias utilizadas, medimos a liberação de [³H]GABA pelo estímulo de L-arginina (100μM) em explante de retina. A Figura 31 mostra que o tratamento com glutamato estimula a liberação de [³H]GABA, como sabido classicamente (Kamada *et al.*, 1981; Tapia e Arias, 1982). O tratamento com L-arginina (100μM) apresenta uma tendência de aumentar a liberação basal de GABA (Figura 31), ao contrário dos dados anteriores que indicam que o tratamento com L-arginina (100μM) inibe a liberação de GABA endógeno na retina madura.

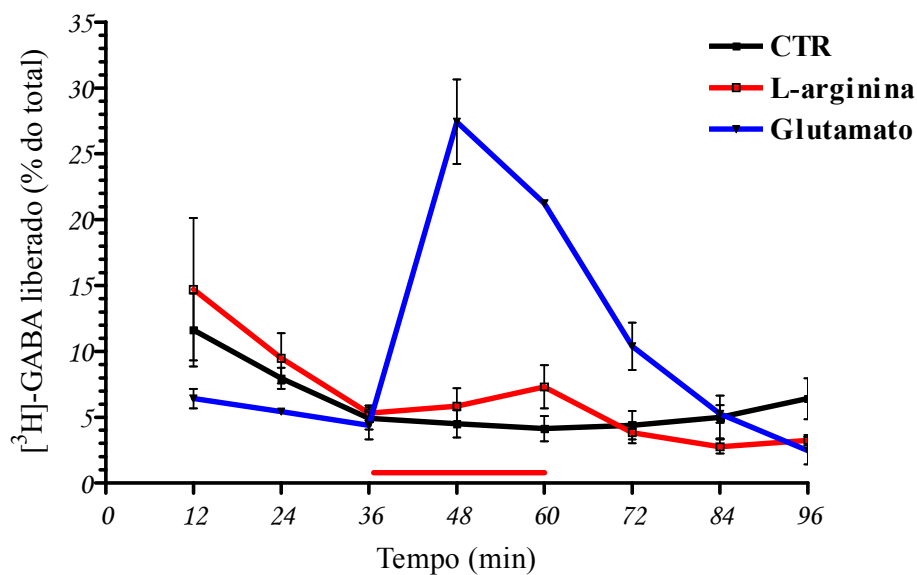


Figura 31. Efeito de L-arginina (100μM) ou de glutamato (2mM) na liberação [³H]GABA em explantes de retina de animais PE. Os explantes receberam 3 pulsos com solução Hanks', 2 pulsos com solução Hanks' acrescido ou não de L-arginina ou glutamato e finalmente 3 pulsos de solução Hanks'. Cada pulso com duração de 12 minutos. A radioatividade liberada nas frações era medida em um cintilador líquido (Valores são média ± SEM; N=2).

Diferenças no processo de liberação de GABA radiomarcado quando comparado ao endógeno em retina de galinha já foram mostrados por Campochiaro e colaboradores (1984). A vantagem da análise do GABA endógeno em retina intacta é que as células estão mais próximas de sua condição fisiológica (uma vez que são mantidas suas conexões e sua organização), descartando-se qualquer possível interferência da adição de GABA exógeno radiomarcado. Acreditamos que este modelo permita um estudo do metabolismo celular mais fidedigno ao metabolismo *in vivo*.

*1.4 Mecanismos da modulação da liberação basal de GABA endógeno por NO:
envolvimento da via NO-GCs-GMPc-PKG*

Para investigar a via envolvida no efeito inibitório do NO sobre a liberação basal de GABA endógeno, utilizamos um inibidor da enzima PKG, KT (1 μ M) e analisamos a imunorreatividade para o GABA em retina intacta de PE. Realizamos uma pré-incubação com ou sem KT (1 μ M) durante 10 minutos, seguida de incubação com ou sem L-arginina (100 μ M) na presença ou não de KT (1 μ M) por 25 minutos. O tratamento com KT bloqueou totalmente o aumento no número de células amácrinas GABA⁺ induzido pela L-arginina (Figura 32 e 33A). Isto indica que o efeito inibitório do NO sobre a liberação de GABA de células amácrinas seria dependente de PKG. Provavelmente a via que leva à ativação de PKG é a clássica, onde NO ativa a enzima GCs estimulando a produção de GMPc, que ativa por sua vez a enzima PKG. Retinas pré-incubadas e incubadas apenas com KT não apresentaram alteração no número de células amácrinas GABA⁺ em relação ao controle (Figura 32 e 33A), indicando que em condições não estimuladas da produção de NO, a enzima PKG não atua na liberação de GABA.

Na CCG, o tratamento com KT bloqueou o efeito inibitório da L-arginina sobre a liberação de GABA, mas de forma menos eficiente do que verificado em células amácrinas (Figura 33A e B). Isto sugere que o efeito inibitório do NO sobre a liberação de GABA de células da CCG talvez envolva outras vias além da clássica. Assim como na camada de células amácrinas, na CCG a pré-incubação e incubação realizada apenas com KT não induziram alteração no número de células GABA+ em relação ao controle (Figura 33B).

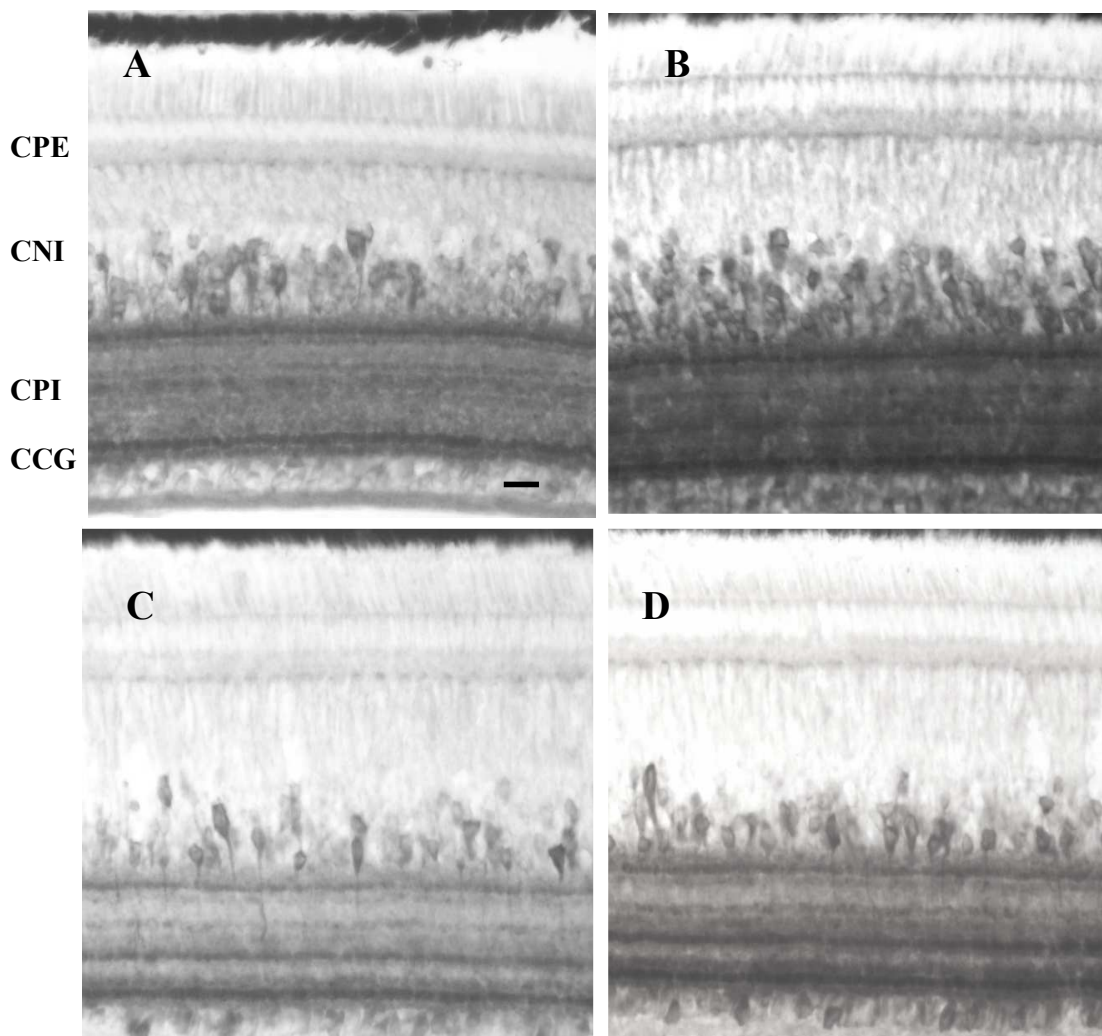


Figura 32. Fotomicrografias de cortes transversais da retina de galinha PE IR-GABA. As retinas foram pré-incubadas com ou sem o inibidor da PKG, KT (1 μ M) durante 10 minutos, e em seguida incubadas com ou sem L-arginina na presença ou não de KT, por 25 minutos. A) Retina controle mantida em Ringer Lock ou Hanks'. B) Retina incubada apenas na presença de L-arginina 100 μ M, mostrando aumento na imunoreatividade para GABA em células amácrinas e em células da

CCG. C) Retina pré-incubada com KT e incubada com L-arginina + KT. O KT bloqueou o efeito da L-arginina em células amácrinas, mas não em células da CCG. D) Retina pré-incubada e incubada apenas na presença de KT não apresenta alteração na imunorreatividade ao GABA em relação à retina controle. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Escala = 20 μ m.

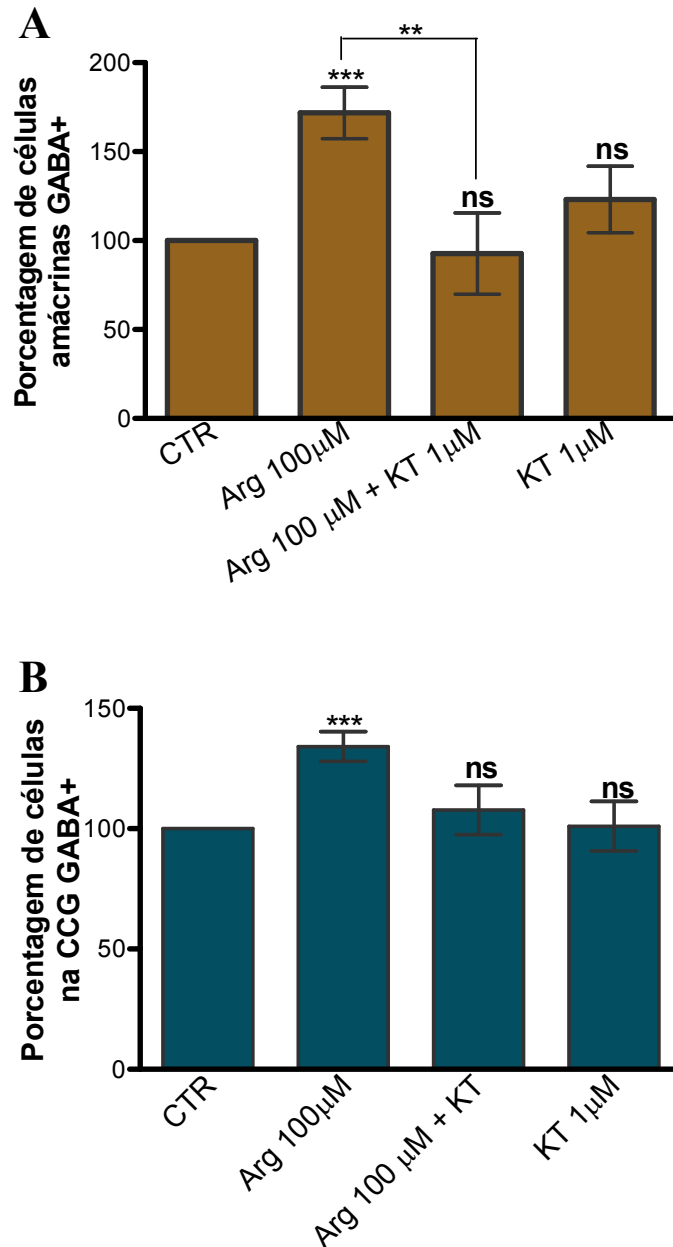


Figura 33. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animal PE, sob diferentes condições de incubação. (A) Células amácrinas (CTR e L-arginina (100 μ M): N=10; KT + L-arginina e KT (1 μ M): N=3). (B) Células da CCG (CTR e L-arginina (100 μ M): N=9; KT + L-arginina e KT (1 μ M): N=3). (Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P< 0,01).

1.5 Efeito do NO na atividade do receptor NMDA

O receptor NMDA pode ser nitrosilado e inibido pelo NO, sendo este mecanismo mais sensível ao NO em condições de hipóxia, mas uma inibição fisiológica também poderia ocorrer (Takahashi *et al.*, 2007). Em nosso modelo, seria possível que NO inibisse a liberação basal de GABA pela redução da atividade de receptores NMDA ativados pelo glutamato endógeno. Entretanto, sabemos que o tratamento com NMDA (100 μ M) na presença de L-arginina induz liberação de GABA (Figura 17), sugerindo que o receptor NMDA não teria sua atividade inibida pela produção de NO em nosso modelo. Entretanto, NMDA (100 μ M) poderia ser uma dose alta favorecendo a atividade do receptor ainda que algum efeito inibitório sobre essa atividade fosse mediado pelo NO. Decidimos então testar uma concentração mais baixa de NMDA. Retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina (100 μ M) por 5 minutos seguida por estimulação com NMDA (10 μ M) por 25 minutos. Embora o tratamento com NMDA (10 μ M) não tenha sido suficiente para induzir liberação de GABA em relação ao controle, ele foi suficiente para bloquear a ação inibitória da L-arginina sobre a liberação de GABA nas duas camadas celulares estudadas (Figura 34). Assim, parece improvável que o NO esteja reduzindo a atividade do receptor NMDA já que NMDA (10 μ M) previne a inibição da liberação de GABA por NO.

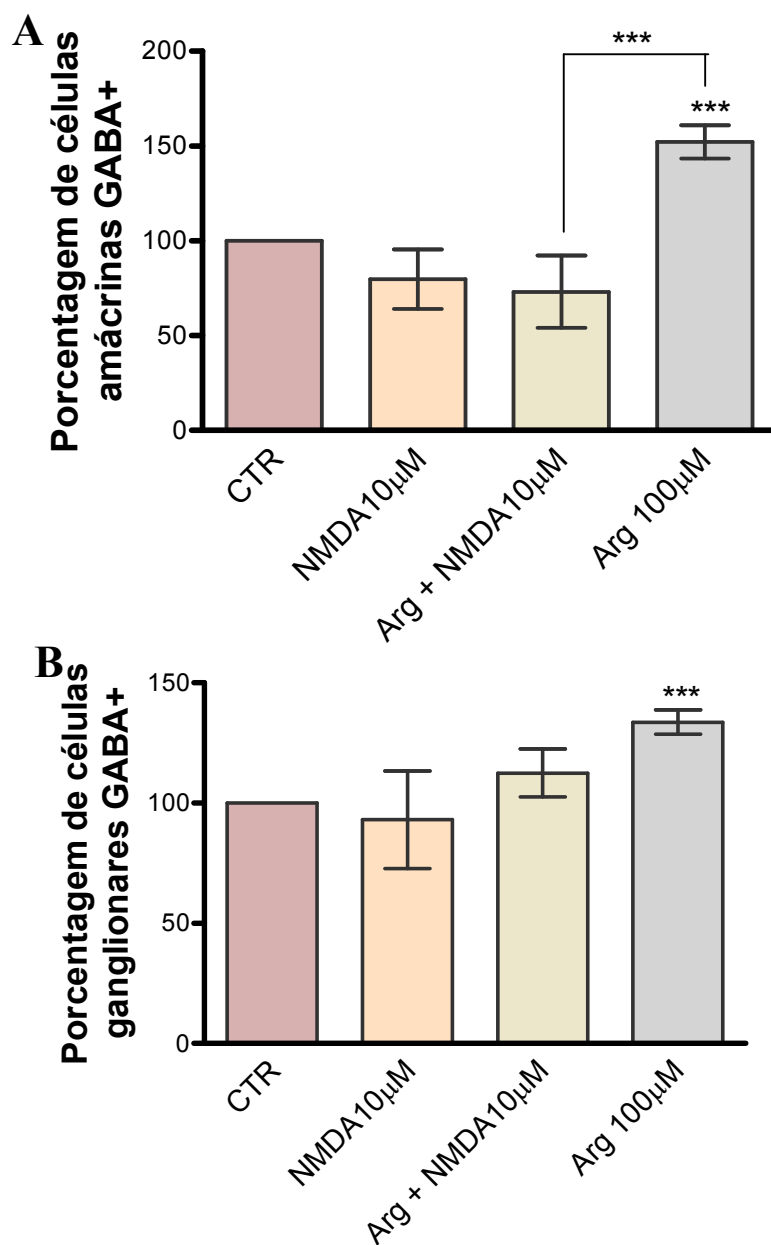


Figura 34. Histograma da quantificação de células marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animal PE. As retinas foram pré-incubadas com ou sem L-arginina (100µM) durante 5 minutos, e em seguida estimuladas ou não com NMDA (10µM) por 20 minutos na presença ou não de L-arginina. (A) Células amácrinas (CTR e L-arginina (100µM): N=7; NMDA (100µM): N=5; L-arginina + NMDA: N=3). (B) Células da CCG (CTR e L-arginina (100µM): N=12; NMDA (100µM): N=5; L-arginina + NMDA: N=3). (Valores são média \pm SEM. * P<0,05; ** P< 0,01).

1.6 Participação do cálcio no efeito do NO sobre a liberação basal de GABA

O NO pode estimular a liberação de neurotransmissores convencionais de forma dependente de cálcio em determinadas áreas do SNC (Sequeira *et al.*, 1997; Sequeira *et al.*, 1998). Em nosso modelo, seria possível que a inibição da liberação basal de GABA induzida por NO fosse mediada por algum neurotransmissor que tivesse sua liberação estimulada por NO, provavelmente via PKG. Sendo assim, o cálcio seria necessário para possibilitar a liberação de neurotransmissores induzida por NO.

A proteína cinase dependente de cálcio (PKC) pode inibir o transportador de GABA em cultura de células hipocámpais de ratos (Beckman *et al.*, 1998) e em células de glia (Gomez *et al.*, 1991). Um doador de NO pode proporcionar a entrada de cálcio na célula por facilitar a ativação de canais de cálcio pela fosforilação por PKG (Hirooka *et al.*, 2000). Desta forma, seria possível que em nosso modelo a entrada de cálcio induzida por NO ativasse PKC que poderia inibir a liberação de GABA.

Para testar se o cálcio está envolvido no efeito do NO em nosso modelo, realizamos um experimento onde o cálcio foi retirado do meio para impedir a liberação de neurotransmissores por exocitose e a ativação de PKC. Neste experimento, a L-arginina não poderia ser utilizada como substrato para a produção de NO em função da dependência de cálcio para a ativação da NOSn. Assim, foi feita uma incubação com ou sem SNAP (500 μ M) por 60 minutos na presença ou não de cálcio. O tratamento com SNAP não bloqueou a liberação de GABA em meio sem cálcio na camada de células amácrinas (Figura 35A) ou na CCG (Figura 35B).

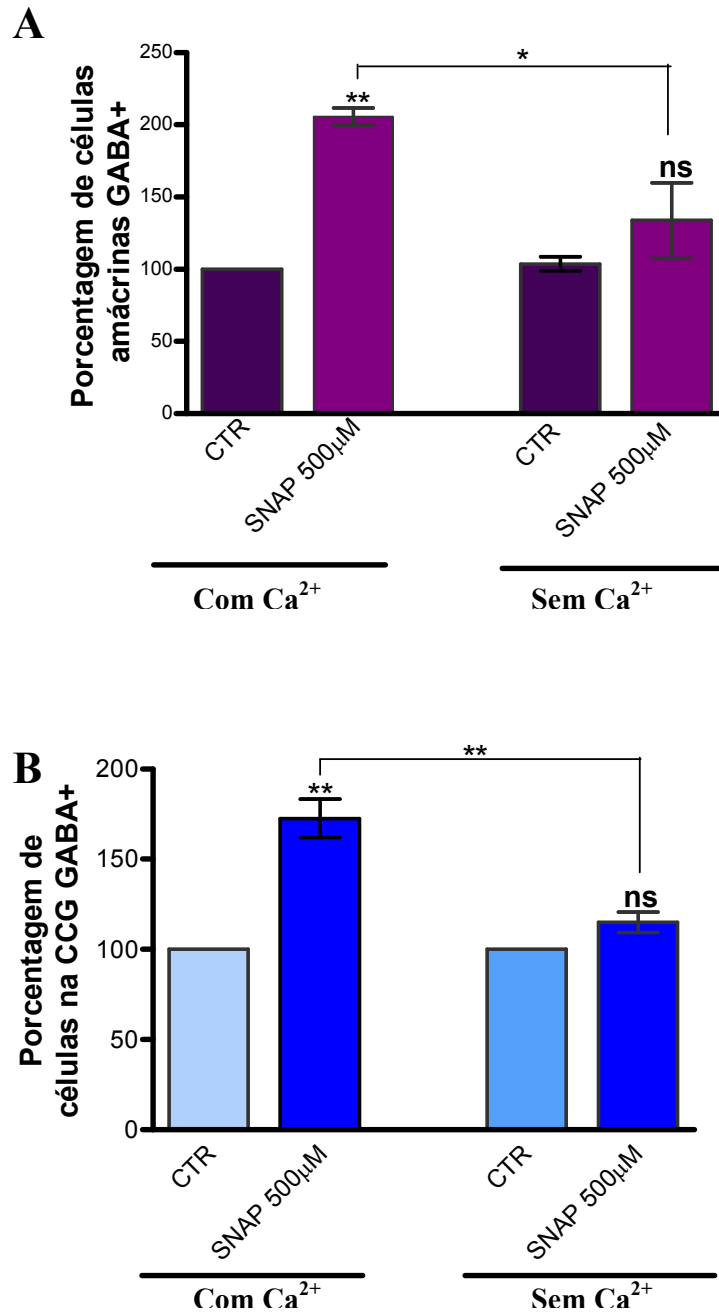


Figura 35. Histograma da quantificação de células amácrinas (A) e de células da CCG (B) marcadas para GABA em relação a 100% do CTR em retinas de animais PE. As retinas foram incubadas por 60 minutos com ou sem SNAP (500µM) na presença ou não de cálcio. A ausência de cálcio no meio extracelular bloqueou o efeito do SNAP (N=3. Valores são média \pm SEM. *P<0,05; **P<0,01).

Estes dados sugerem que o NO poderia estimular a liberação de um (ou mais) neurotransmissor(es) que seria o responsável pela inibição da liberação de GABA induzida por NO. Entretanto, a dependência de cálcio poderia indicar a dependência de PKC no efeito de NO. São necessários mais experimentos para compreender qual o mecanismo pelo qual a produção basal e moderada de NO inibe a liberação basal de GABA na retina.

V. DISCUSSÃO

Verificamos neste trabalho em retina madura de galinha, pelo método de imunohistoquímica, que o NO pode ser responsável pela liberação de GABA endógeno na camada de células ganglionares, como sugerido por Ientile e colaboradores (1997), mas não na camada de células amácrinas.

Na CCG, a inibição da NOSn bloqueou a liberação de GABA estimulada por NMDA (Figura 15B). Entretanto, o inibidor da NOSn quando administrado sozinho também induziu liberação de GABA nesta população celular (Figura 15B) sugerindo que em condições basais da produção de NO ocorre inibição da liberação de GABA endógeno. Como possível explicação para este efeito bifásico do NO, poderíamos supor que a ativação de receptores NMDA estimule a produção de grande quantidade de NO, que tem função diferenciada daquele produzido em menores quantidades e em resposta a outros estímulos em células da CCG. Assim, o alto *pool* de NO produzido via ativação de receptores NMDA poderia ser capaz de promover liberação de GABA, enquanto outro *pool* em quantidade moderada gerado por estímulo diferente poderia desempenhar função oposta em células da CCG. Esta hipótese foi reforçada pelos nossos dados, onde o tratamento por 25 minutos com 1mM de L-arginina (que provavelmente estimula grande produção de NO) estimulou a liberação de GABA, enquanto 100µM de L-arginina (que provavelmente estimula produção de NO em baixa concentração) inibiu a liberação em células da CCG de retina de animal PE (Figura 19B).

Entretanto, o tratamento com L-arginina (100µM) não potencializou a liberação de GABA induzida por NMDA na CCG (Figura 17B), sugerindo que a atividade da NOSn é máxima mediante a ativação de receptores NMDA e não pode ser aumentada pelo fornecimento de substrato.

O possível papel bifásico do NO na liberação de GABA que verificamos na CCG já foi descrito anteriormente em diferentes regiões do SNC. No hipocampo de camundongos, a administração de agonistas de receptores NMDA, AMPA e cainato estimulam a liberação de GABA, um efeito que é mimetizado pela administração de doadores de NO. Entretanto, a inibição da enzima NOS também é capaz de induzir aumento da liberação deste aminoácido, embora não tão acentuadamente quanto os doadores de NO. Além disso, tanto a inibição da enzima GCs (enzima que produz GMPc) quanto a inibição da fosfodiesterase de GMPc (enzima que degrada GMPc) estimulam a liberação de GABA (Saransaari e Oja, 2006).

Getting e colaboradores (1996) verificaram que a liberação de GABA, estimulada por NMDA, é reduzida pela adição de 100 μ M do inibidor da NOS (L-NAME), mas é aumentada pela adição de 1mM do mesmo inibidor. O grupo verificou ainda que 500 μ M de doador de NO (SNAP) diminui a liberação de GABA, enquanto 1 ou 2mM da mesma droga aumentam a liberação. Esta modulação bifásica da liberação de GABA por doadores de NO e inibidores da enzima NOS foi observada no hipocampo de camundongo *in vitro* e *in vivo* (Getting *et al.*, 1996; Saransaari e Oja, 2006; Segieth *et al.*, 1995) e estão de acordo com a modulação bifásica que verificamos na CCG da retina.

Os dados mostram que as ações do NO na liberação de GABA no hipocampo, bem como na retina, são extremamente complexas e sugerem que o nível de excitabilidade neuronal pode depender da concentração de NO e de subseqüentes aumentos ou reduções na liberação de GABA.

Efeitos bifásicos também foram relatados no córtex cerebral de ratos, onde concentrações moderadas de um doador de NO desempenha efeito anticonvulsivo por aumentar a concentração de GABA através da inibição da enzima GABA-T (Jayakumar *et al.*, 1999; Paul e Ekambaram, 2005). Entretanto, doses maiores do doador de NO falham em reduzir a atividade da GABA-T e, além disso, apresentam forte efeito pró-convulsivo (Paul e

Ekambaram, 2005). De forma semelhante, no córtex cerebelar de ratos, doses de L-arginina induzem aumento na concentração de GABA acompanhada por inibição da GABA-T (Jayakumar *et al.*, 1999; Paul e Jayakumar, 2000); enquanto doses maiores do que a necessária para inibir convulsões produzem ações convulsivas, sendo que este efeito talvez dependa da produção de L-citrulina (Paul, 2002).

Na camada de células amácrinas não verificamos nenhum efeito bifásico do NO na liberação de GABA endógeno. Os dados levam a crer que o NO seria inibidor da liberação de GABA basal nesta população celular, já que: (1) O NO não é mediador da liberação de GABA induzida por NMDA, uma vez que nestas células o inibidor da NOSn não bloqueou a liberação de GABA estimulada por NMDA (Figura 15A); (2) o inibidor da NOSn quando administrado sozinho induziu liberação de GABA (Figura 15A); (3) O tratamento com 100 μ M de L-arginina por 25 minutos bloqueia a liberação basal de GABA, enquanto doses maiores como 500 μ M ou 1mM de L-arginina não apresentam o mesmo efeito, mas também não estimulam a liberação (Figura 19A), o que caracterizaria efeito bifásico; e (4) O NO inibe a liberação de GABA basal, mas não a estimulada, já que o tratamento com NMDA na presença de L-arginina induz liberação de GABA (Figura 17A)

Em conjunto, nossos dados sugerem que níveis moderados de NO (aquele produzido basalmente ou pela aplicação de 100 μ M de L-arginina por 25 minutos) inibiriam a liberação de GABA em ambos os tipos celulares, enquanto altos níveis de NO (produzido por aplicação de 1mM de L-arginina por 25 minutos ou pela ativação de receptores NMDA) estimulariam liberação de GABA na CCG, mas não na camada de células amácrinas, indicando que os mecanismos envolvidos na regulação da liberação de GABA endógeno por NO são divergentes entre estes dois tipos celulares. De forma semelhante, Yu e Eldred (2005) relataram mecanismos distintos de modulação da liberação de um análogo de GABA por NO entre populações distintas da retina de tartaruga utilizando método de imunohistoquímica.

Enquanto em células amácrinas a liberação do análogo de GABA ocorre principalmente via peroxinitrito, em células horizontais esta liberação é mediada principalmente em função de GMP_c. Segundo os autores, este segundo mensageiro poderia modular a reversão do transportador de GABA, sódio-dependente, ligando-se a canais de sódio e gerando aumento de influxo deste íon habilitando assim o transportador a liberar GABA. Em conjunto com os nossos resultados, estes dados indicam que mecanismos distintos de regulação da liberação de GABA por NO são encontrados em diferentes populações celulares da retina de diferentes espécies.

Enquanto L-arginina (100µM) durante 25 minutos inibe a liberação basal de GABA, L-arginina (500µM) (na CNI e na CCG) ou L-arginina (1mM) (na CNI) não tiveram efeito na liberação de GABA. Uma vez que esta modulação é dependente de PKG (Figura 33), é possível que ele não seja observado mediante tratamento com altas doses de L-arginina em função da dessensibilização dose dependente da enzima GCs por nitrosilação (Sayed *et al.*, 2007). Sendo assim, o aumento da produção de NO induziria a redução da produção de GMP_c e diminuiria a atividade da PKG, impedindo a ocorrência do efeito.

O tratamento com L-arginina nas diferentes concentrações utilizadas (100µM, 500µM e 1mM) durante 60 minutos, não induziu nenhuma alteração na liberação de GABA em nenhuma das populações celulares estudadas (Figura 20A e B), indicando que o substrato pode ter sido esgotado após este período. Entretanto, como a dessensibilização da enzima GCs por nitrosilação é, além de dose-dependente, tempo-dependente (Sayed *et al.*, 2007), seria possível que após 60 minutos a GCs estivesse dessensibilizada impedindo que a produção de NO inibisse a liberação basal de GABA. Este dado indica também que a ausência de efeito bifásico em células amácrinas (no tratamento por 25 minutos) não é artifício de um curto período de incubação, o que também se aplica aos demais efeitos verificados nos tratamentos com diferentes concentrações de L-arginina durante 25 minutos.

Decidimos, por enquanto, não nos aprofundarmos na função bifásica do NO na CCG para primeiramente estudar o mecanismo envolvido na inibição da liberação de GABA provocada pelo tratamento com 100 μ M de L-arginina durante 25 minutos, que é comum a ambos os tipos celulares estudados. Assim, fomos investigar se esta modulação identificada na retina madura ocorre também durante o período embrionário. Realizamos incubação com L-arginina (100 μ M) por 25 minutos nas idades de E8, período em que a atividade da NOSn é máxima na retina (Ientile *et al.*, 1996; Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996) e em que o GABA é excitatório (Catsicas e Mobbs, 2001) e E14, idade em que a atividade da NOS já está reduzida (Ientile *et al.*, 1996; Paes-de-Carvalho e Mattos, 1996) e o GABA já é inibitório (Catsicas e Mobbs, 2001). Além disso, E14 é a idade utilizada por Ientile e colaboradores (1997) para preparo de culturas onde foi verificado que NO estimula a liberação de [³H]GABA. Em nossos resultados, foi detectada inibição significativa da liberação basal de GABA por 100 μ M de L-arginina na camada de CCG da retina de E8 (Figura 22), e em células amácrinas e da CCG em E14 (Figura 24A e B). Embora os resultados sejam diferentes dos encontrados por Ientile e colaboradores (1997), em conjunto confirmam a modulação do sistema GABAérgico pelo NO como um processo mantido durante as fases do desenvolvimento (onde GABA possui ação excitatória inicial e posteriormente inibitória) até a maturidade.

Em nossos experimentos utilizamos a L-arginina para estimular a biossíntese de NO com o intuito de respeitar a capacidade de produção da maquinaria intracelular e observar os efeitos do NO produzido fisiologicamente. Os efeitos causados pela administração de L-arginina no sistema nervoso frequentemente são atribuídos à produção de NO (Li *et al.*, 2002; Jayakumar *et al.*, 1999; Paul e Jayakumar, 2000). Já foi relatada a promoção da atividade da NOS e a elevação da concentração de NO em regiões do cérebro de ratos tratados com L-arginina (Yamada e Nabeshima, 1997). Além disso, injeção intraperitoneal de L-arginina (1000mg/Kg) induz um aumento significativo de NO no cérebro de ratos em 30 minutos (Paul

e Jayakumar, 2000). Este resultado foi atribuído à saturação da atividade da NOS como resultado do aumento da disponibilidade do substrato no cérebro por longo período (Strolin Benedetti *et al.*, 1993). Entretanto, Shen e colaboradores (1997) relataram que a L-arginina teria efeito inibitório sobre o transportador de GABA (GAT1) por mecanismo independente de NO. Em nosso modelo, a inibição da liberação de GABA induzida pela L-arginina foi totalmente bloqueada pelo antagonista da NOSn, em ambos os tipos celulares estudados (Figura 26A e B). Este dado indica que na retina intacta de galinha PE, o efeito do tratamento com L-arginina sobre a liberação basal de GABA endógeno é inteiramente atribuído à produção de NO. Além disso, o efeito da L-arginina sobre o sistema GABAérgico na retina coincide com o período no qual L-arginina induz aumento na produção de NO no cérebro de ratos (Paul e Jayakumar, 2000).

Para comparar o efeito do NO biossintetizado (produzido a partir da administração de L-arginina) com o efeito do NO exógeno na modulação da liberação de GABA, utilizamos um doador de NO, SNAP, em diferentes concentrações (100µM, 250µM e 500µM) em retina de animal PE. A incubação com estas diferentes concentrações de SNAP, por 30 minutos, não apresentou efeito na liberação de GABA na camada de células amácrinas ou de células ganglionares (Figura 27A e B). Por isso, testamos este tratamento no período de 60 minutos, já que o SNAP é um doador lento. Em 60 minutos o tratamento com SNAP (500µM) induziu bloqueio da liberação basal de GABA em células amácrinas (Figura 29A) e na CCG (Figura 29B). Não houve efeito nas outras concentrações estudadas (100µM e 250µM). Estes dados confirmam o papel do NO como inibidor da liberação basal de GABA.

Os resultados obtidos pelo tratamento com L-arginina ou SNAP apresentam disparidades em relação ao tempo de atuação (25 e 60 minutos, respectivamente) e em relação às concentrações que induzem bloqueio da liberação de GABA (100µM e 500µM, respectivamente). Estas variações poderiam ser atribuídas à propriedade do SNAP de ser um

doador lento. Assim, seria esperado que esses diferentes tratamentos disponibilizassem o NO em quantidades e tempos diferentes, podendo causar disparidades como as observadas. De qualquer forma, verificamos que ambos os tratamentos apontam para uma função inibitória do NO na liberação de GABA basal nos dois tipos celulares estudados.

Em algumas regiões do SNC foi relatado que o NO pode inibir a degradação de GABA por inibir a enzima GABA-T (Jayakumar et al., 1999; Paul e Ekambaram, 2005; Paul e Jayakumar, 2000). É conhecido que a inibição da GABA-T resulta em um aumento da concentração de GABA no pool citoplasmático no cérebro (Löscher e Hörstermann, 1994; Wood et al., 1988). Assim, se o NO estivesse inibindo a GABA-T no nosso modelo, poderíamos estar observando aumento na marcação de células GABA+ não pela inibição da liberação de GABA, mas pela inibição de sua degradação. Para verificar se o NO poderia estar inibindo a GABA-T ou a liberação de GABA, realizamos um experimento no qual isolamos indiretamente o efeito do NO sobre a GABA-T por retirar o sódio do meio, bloqueando a liberação de GABA. Nossos dados indicam que na retina de galinha PE, o NO atua na inibição da liberação basal de GABA sem interferir na atividade da enzima GABA-T, uma vez que o tratamento com L-arginina (100 μ M) durante 25 minutos não apresentou efeito em meio sem sódio (Figura 30A e B). A dependência de sódio no meio extracelular para induzir aumento da imunorreatividade ao GABA caracteriza um efeito mediado pela inibição do transportador, e portanto da liberação. A ausência do sódio no meio preveniu a redução da imunorreatividade ao GABA induzido pela L-arginina (1mM) na CCG, sugerindo que a redução da imunorreatividade deve-se ao aumento da liberação de GABA e não à inibição de sua síntese. Entretanto, mais experimentos precisam ser realizados para caracterizar de forma mais clara o envolvimento da liberação, degradação e síntese de GABA nas alterações da imunorreatividade para GABA induzida por NO.

Embora nós tenhamos verificado o efeito de doses moderadas de NO como inibidora da liberação basal de GABA endógeno na retina intacta, vários trabalhos relataram que o NO (em variadas concentrações) estimula a liberação de [3H]GABA na retina e em outras regiões do SNC (Moller et al., 1995; Ohkuma et al., 1995; Ohkuma et al., 1996; Ohkuma et al., 1998; Ientile et al., 1997; Sequeira et al., 1998). Em função dos resultados contrastantes entre os trabalhos mencionados e o nosso trabalho, achamos válido realizar alguns ensaios para avaliar o efeito da produção de NO estimulada pela concentração de 100 μ M de L-arginina na liberação de [3H]GABA, uma vez que esta mesma concentração inibe a liberação de GABA endógeno na retina intacta. Entretanto, ao contrário do que indicam nossos dados com análise de GABA endógeno em retina intacta, não parece haver inibição da liberação de [3H]GABA mediada pela L-arginina (100 μ M) (Figura 31). Portanto, a metodologia utilizada pode ser a explicação para a contradição entre os nossos dados e os da literatura. Entretanto não podemos descartar que talvez a concentração de L-arginina necessária para produzir a quantidade de NO apropriada para inibir a liberação de GABA endógeno na retina intacta possa ser diferente da concentração de L-arginina necessária para o mesmo efeito em explante de retina contendo [3H]GABA. Campochiaro e colaboradores (1984) relataram diferenças no processo de liberação de GABA radiomarcado quando comparado ao endógeno na própria retina de galinha. Uma vez que metodologias diferentes podem gerar variação e até oposição entre os resultados, acreditamos que o estudo em retina intacta utilizando GABA endógeno seja mais útil na busca de respostas sobre o funcionamento fisiológico e patológico da retina.

Com o intuito de estudar o efeito inibitório do NO sobre a liberação basal de GABA endógeno, fomos verificar se a via clássica NO-GMPc-PKG estaria envolvida nesta modulação na retina intacta madura. Na camada de células amácrinas da retina de animal PE, o efeito do NO (produzido pelo fornecimento de 100 μ M de L-arginina) parece ser dependente de PKG, pois o tratamento com um inibidor da PKG, KT, bloqueou totalmente a inibição da

liberação basal de GABA induzido pela L-arginina (Figura 33A). Entretanto, na CCG o tratamento com KT bloqueou parcialmente o efeito inibitório da L-arginina sobre a liberação de GABA (Figura 32B). Isto implica na participação da via clássica no efeito do NO, mas torna provável o envolvimento de outras vias além da clássica na CCG. De qualquer forma, fica claro que a via clássica estaria envolvida no mecanismo em ambos os tipos celulares.

O tratamento com KT sozinho não induziu alteração na liberação de GABA em nenhuma das populações celulares estudadas (Figura 33A e B), indicando que a PKG não apresenta função regulatória sobre a liberação basal de GABA quando a produção de NO não é estimulada. Entretanto, temos evidências de que a produção basal de NO (sem administração de L-arginina) possui papel inibitório sobre a liberação basal de GABA, uma vez que o tratamento com inibidor da NOSn (7-NI) sozinho induz liberação de GABA. Estes dados em conjunto sugerem as seguintes conclusões: (1) A inibição da liberação de GABA pelo aumento da produção de NO induzido por L-arginina é dependente de PKG; (2) A inibição da liberação de GABA pela produção basal de NO não é dependente de PKG (compare as Figuras 25D e 31D).

Takahashi e colaboradores (2007) relataram que o receptor NMDA pode ser nitrosilado e inibido pelo NO, sendo esta inibição mais sensível em condições de hipóxia. Em nosso modelo, a atividade do receptor NMDA provavelmente não é inibida pelo NO, já que o tratamento com NMDA (10 μ M), embora não induza liberação de GABA em relação ao controle, previne a ação inibitória da L-arginina sobre a liberação de GABA nas duas camadas celulares estudadas (Figura 34).

A inibição da liberação basal de GABA por NO é dependente de cálcio (Figura 35), sugerindo que talvez o efeito do NO fosse mediado pela liberação de neurotransmissor(es) dependente de cálcio. Na retina de galinha, a dopamina inibe parcialmente a liberação de GABA induzida por NMDA (Calaza et al., 2001, 2003). Foi demonstrado que este efeito é

devido à ligação e inibição direta deste receptor pela dopamina (Castro et al., 1999). Assim, seria possível que NO estimulasse a liberação de dopamina e esta inibisse a liberação basal de GABA. Entretanto, em nossos resultados o tratamento com NMDA (100 μ M) induz liberação de GABA mesmo na presença de L-arginina (100 μ M) (Figura 17), sugerindo que os receptores NMDA não estariam inibidos pela dopamina. Assim, consideramos improvável o envolvimento da dopamina no efeito do NO sobre o sistema GABAérgico, embora o envolvimento de outro neurotransmissor não possa ser excluído. A dependência de cálcio também poderia representar a dependência da ativação da enzima PKC no efeito do NO.

Foi relatado que a PKC pode regular a função do transportador GAT1 em cultura de células hipocámpais de ratos (Beckman et al., 1998) e em células de glia (Gomez et al., 1991). Estudos indicam que a PKC regula a interação entre GAT1 e syntaxina 1A (Beckman et al., 1998), uma proteína da membrana plasmática envolvida tanto no tráfico quanto no ancoramento e/ou fusão de vesículas (Bennett et al., 1992), na regulação direta de canais de cálcio (Bezprozvanny et al., 1995) e de canais de cloreto reguladores da fibrose cística (Naren et al., 1997). Beckman e colaboradores (1998) relataram que a syntaxina 1A se associa com o transportador GAT1, inibindo o transporte de GABA. A syntaxina 1A apresenta grande afinidade pela Munc 18, que é substrato para a fosforilação por PKC. Assim, a fosforilação da Munc 18 por PKC aumenta a associação entre syntaxina 1A e GAT1, tornando o transportador inibido (Beckman et al., 1998). Portanto, a regulação da PKC sobre GAT1 não ocorreria pela fosforilação direta do transportador, o que é reforçado pelo fato de que a remoção dos sítios consensuais para a fosforilação por PKC no transportador GAT1 falham em eliminar a inibição induzida pela PKC em oócitos (Corey et al., 1994). O sinal que ativa a regulação de GAT1 por PKC não é bem conhecido. Entretanto, sabe-se que o mecanismo pode envolver a redistribuição do transportador da membrana plasmática para domínios intracelulares

(Beckman et al., 1999), ou ligação direta da syntaxina na região N-terminal de GAT-1, como visto em cultura de células hipocâmpais (Deken et al., 2000).

Hirooka e colaboradores (2000) relataram que a perfusão com 1mM de SNAP em células ganglionares da retina de salamandra induz aumento de corrente de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N, pela facilitação de sua ativação. Outros trabalhos também relatam a ativação de corrente de cálcio por NO em neurônios da retina (Kurenyy et al., 1994), em neurônios de outras regiões (Chen e Schofield, 1993) e em células cardíacas (Mery et al., 1993). Na retina de salamandra, o aumento da corrente de cálcio produzido por SNAP foi bloqueado por KT, enquanto KT sozinho não induziu efeito. Estes resultados indicam que na presença de NO, a PKG é ativada e fosforila o canal de cálcio (ou fosforila alguma proteína regulatória) resultando na facilitação da ativação do canal de cálcio dependente de voltagem. Além disso, o tratamento com inibidor de fosfatases potencializou o efeito do SNAP, enfatizando o papel da PKG no aumento da corrente de cálcio (Hirooka et al., 2000).

No presente trabalho, encontramos evidências de que o tratamento com 100µM L-arginina estimula a produção de NO que inibe a liberação basal de GABA de forma dependente de PKG e da presença de cálcio no meio extracelular. A produção de NO estaria ativando a enzima sGC, aumentando o nível de GMPc, que por sua vez ativaria a PKG. Uma hipótese seria a de que a PKG poderia estar aumentando a corrente de cálcio na célula por fosforilação (direta ou indireta) de canais de cálcio, uma vez que este mecanismo já foi demonstrado anteriormente em retina de diferentes espécies (Hirooka et al., 2000; Kurenyy et al., 1994). Uma proposta seria a de que a entrada de cálcio na célula ative a enzima PKC, que poderia inibir a liberação de GABA por aumentar a associação entre o transportador GAT1 e a syntaxina 1A. O esquema da Figura 36 resume os mecanismos que poderiam ser propostos como mediadores do efeito da produção estimulada de NO sobre a liberação basal de GABA.

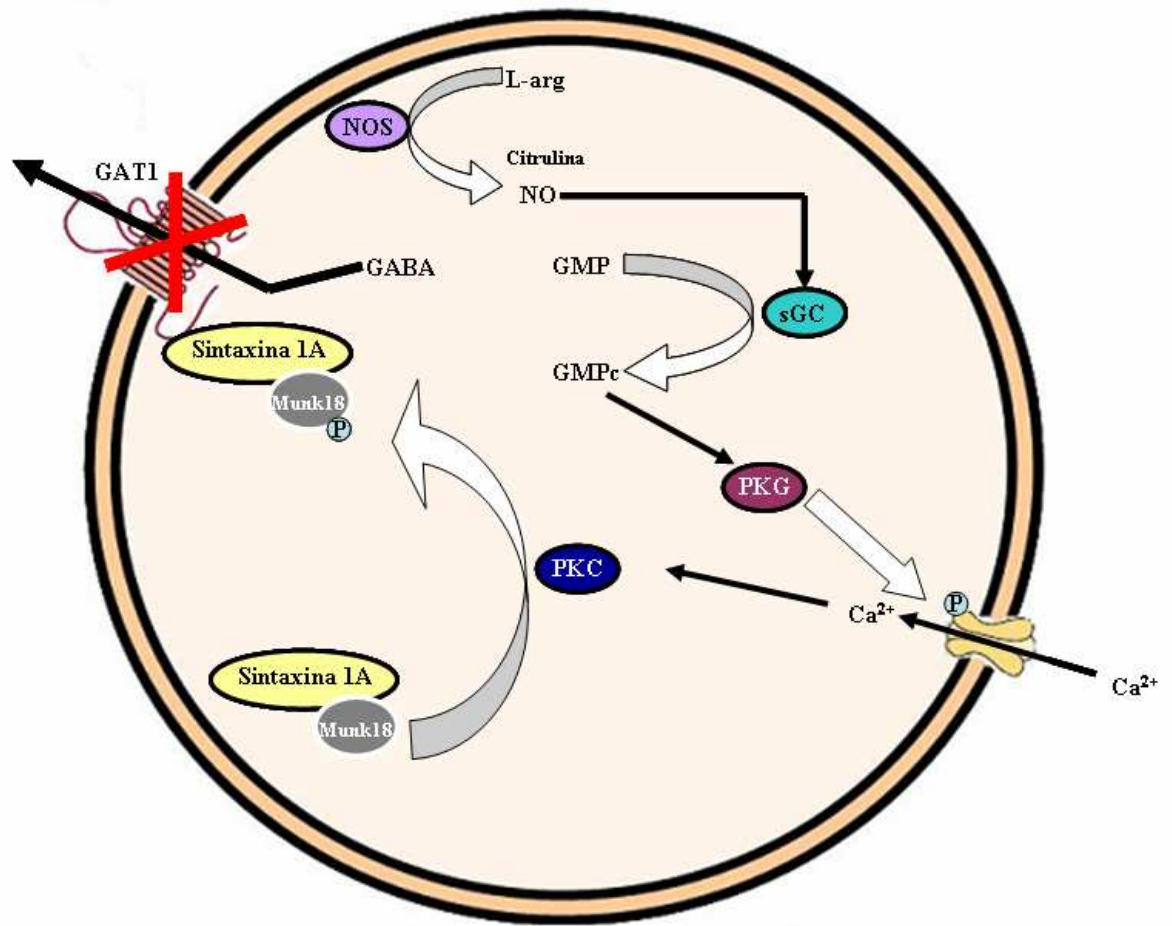


Figura 36. Modelo proposto para a inibição da liberação de GABA por NO. A produção de NO estimula a enzima sGC a produzir GMPc que ativa PKG. A PKG fosforila canais de cálcio aumentando a entrada deste íon na célula e propiciando a ativação de PKC. A PKC fosforila a proteína Munk18 de alta afinidade com a sintaxina 1A. O complexo Sintaxina 1A-Munk18 fosforilado aumenta ligações com GAT1, inibindo o transporte de GABA.

Já a inibição da liberação de GABA por NO basal parece ocorrer por mecanismo diferente do envolvido na inibição pelo NO produzido pelo fornecimento de L-arginina. O efeito do NO basal poderia envolver nitrosilação ou nitração ativando canais de cálcio, uma vez que verificamos que esta modulação é independente de PKG.

Como comentado anteriormente, Bloomfield e Dacheux (2001) sugeriram que a célula A17 ativada por um estímulo luminoso periférico poderia inibir uma célula bipolar de

bastonete central, hiperpolarizando a célula AII pós-sináptica central. Isto poderia favorecer a sinalização dos bastonetes periféricos iluminados em detrimento da sinalização de bastonetes no centro do campo receptor. Os autores sugerem que neste modelo, células bipolares de bastonete deveriam liberar glutamato de forma tônica para que sua atividade pudesse ser regulada após receber input GABAérgico da via lateral inibitória. Entretanto, os próprios autores mencionam que uma liberação tônica glutamatérgica de células bipolares de bastonetes para suas células pós-sinápticas AII e A17, implicaria em liberação basal de GABA de células A17 para células bipolares de bastonete em sinapse recíproca ou de feedback. Talvez essa liberação basal GABAérgica não seja desejada, uma vez que tal inibição de células bipolares de bastonete resultaria em redução da transmissão glutamatérgica destas para células AII. A hiperpolarização de células AII dificultaria que o sinal transduzido por bastonetes fosse transmitido às células ganglionares, o que dificultaria a percepção da luz escotópica.

No presente estudo verificamos que a produção basal de NO ou seu aumento moderado induz bloqueio da liberação de GABA em células amácrinas. Considerando o modelo proposto por Bloomfield e Dacheux (2001), é possível pensar que esta suposta liberação basal de GABA em função da liberação tônica de glutamato seja fisiologicamente bloqueada pela produção de NO basal, ou ainda, pelo aumento moderado da produção de NO possivelmente causada pela sinalização tônica de glutamato. Desta forma, a inibição da liberação basal de GABA por NO seria importante na facilitação da ativação de células AII, responsáveis pela transmissão do sinal de bastonetes para células ganglionares, e portanto da visão noturna.

De forma geral, nossos dados indicam que o NO produzido fisiologicamente estaria envolvido no equilíbrio entre excitação e inibição neuronal. O aumento na inibição ou na excitação neuronal dependeria da faixa de concentração na qual o NO fosse produzido. A

produção basal à moderada de NO aumentaria a excitabilidade neuronal na vizinhança por inibir a liberação basal de GABA, enquanto a produção de NO em alta concentração aumentaria a inibição neuronal na vizinhança por induzir liberação de GABA.

A dependência de NO na liberação de GABA induzida pela ativação de receptores NMDA seria um exemplo de função fisiológica da alta produção de NO, mas também pode estar envolvida no efeito neuroprotetor do NO durante excitotoxicidades. Diversas patologias são caracterizadas pela hiperativação da transmissão glutamatérgica, como isquemia e diversas doenças neurodegenerativas. Louzada e colaboradores (2004) utilizando cultura de células da retina de galinha, relataram que a ativação de receptores GABAérgicos reduzem a vulnerabilidade neuronal a danos excitotóxicos causados pelo glutamato. Segundo o grupo, a transmissão GABAérgica representa um alvo promissor para o tratamento de mal de Alzheimer e outras desordens neurológicas nas quais a excitotoxicidade apresenta papel relevante.

Alterações degenerativas relacionadas à redução da espessura da retina foram relatadas após 24 semanas de diabetes (Park *et al.*, 2003). Nestes casos, foi verificado um aumento do número de células bipolares, amácrinas e da CCG que expressam a nNOS (Park *et al.*, 2006). Na diabetes, os fotorreceptores sofrem apoptose por uma razão que não é totalmente compreendida (Park *et al.*, 2003) e liberam grande quantidade de glutamato que induz necrose em células vizinhas que não haviam sido afetadas pela injúria inicial (Choi, 1988). Assim, a morte de fotorreceptores na retina diabética pode induzir uma cascata de neurodegeneração via excitotoxicidade mediada por glutamato. Park e colaboradores (2006) concluíram que o NO teria papel citotóxico durante a diabetes uma vez que alta produção de NO em células da retina em resposta à diabetes poderia estimular os fotorreceptores a aumentarem ainda mais a liberação de glutamato pela ativação de canais dependentes de GMPc, agravando a degeneração. Por outro lado, partindo de dados da literatura que relatam que NO pode

estimular a liberação de GABA (Yu e Eldred, 2005) o grupo se questionou quando o aumento da produção de NO apresentaria papel neurotóxico ou neuroprotetor em resposta à diabetes.

O presente estudo contribui como mais uma evidência do efeito neuroprotetor do NO durante diabetes. O aumento da ativação de receptores NMDA por glutamato em condições de excitotoxicidade estimularia a produção de NO em alta quantidade que seria estimulador da liberação de GABA na CCG, combatendo assim o efeito excitotóxico da sinalização glutamatérgica. Este mecanismo de feedback negativo poderia amenizar os danos causados pela excitotoxicidade.

Em suma, nossos dados sugerem que o NO produzido basalmente ou moderadamente seja inibidor da liberação basal de GABA na retina e pode estar envolvido em aspectos fisiológicos, uma vez que a produção de NO contribuiria para o equilíbrio entre o nível de estimulação e inibição neuronal necessário ao funcionamento normal da retina. Sugerimos que esta modulação possa estar envolvida também em patologias, onde o NO seria neuroprotetor por aumentar a liberação de GABA em condições de excitotoxicidade. Desta forma, o nível de excitabilidade neuronal pode depender da concentração de NO e de subsequentes aumentos ou reduções da liberação de GABA. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para averiguar o papel do NO na fisiologia e patologia da retina, bem como as vias envolvidas nestes processos.

VI. CONCLUSÃO

1. Na população celular da CCG da retina madura (animal PE), a liberação de GABA estimulada pela ativação de receptores NMDA é mediada pela produção de NO. De forma semelhante, a produção de NO em alta concentração (estimulada por 1mM de L-arginina) estimula liberação basal de GABA. Por outro lado, a produção basal ou moderada de NO (estimulada por L-arginina 100 μ M) inibe a liberação basal de GABA. Sugerimos que um alto *pool* de NO sinalize aumento da liberação de GABA, enquanto baixos *pools* de NO sinalizem inibição da liberação basal de GABA, caracterizando efeito bifásico do NO nesta população celular.

2. Na camada de células amácrinas da retina madura, ao contrário da CCG, a liberação de GABA estimulada pela ativação de receptores NMDA não é modulada por NO e a produção de NO em alta concentração não afetou a liberação basal de GABA, indicando que altos *pools* de NO não modulam a liberação de GABA nesta população celular. Entretanto, assim como na CCG, a produção basal ou moderada de NO inibe a liberação basal de GABA.

3. A inibição da liberação basal de GABA pela produção moderada de NO durante o desenvolvimento da retina foi verificada na CCG em E8 e em E14, enquanto em células amácrinas esta modulação foi vista apenas em E14, sugerindo que diferentes tipos celulares iniciam sua resposta ao NO em períodos distintos. Entretanto, em ambos os tipos celulares o efeito da produção moderada de NO durante o desenvolvimento coincide com seu efeito na retina madura como inibidor da liberação basal de GABA.

4. O efeito do NO endógeno sobre o metabolismo do GABA endógeno da retina madura parece envolver a inibição da liberação de GABA, sem efeito aparente sobre a síntese ou degradação de GABA.

5. A produção moderada de NO inibe a liberação basal de GABA na retina madura é mediada pela via NO/GMPc/PKG em ambos os tipos celulares estudados, enquanto o efeito do NO produzido basalmente não seria dependente desta via.

6. O efeito inibitório do NO sobre a liberação basal de GABA na retina madura é dependente de cálcio. Com base em nossos dados e dados da literatura (Gomez *et al.*, 1991; Kureny *et al.*, 1994; Beckman *et al.*, 1998; Hirooka *et al.*, 2000) propomos que a ativação da enzima PKG por NO facilite a ativação de canais de cálcio e assim ative a enzima PKC que induz inibição do transportador de GABA.

7. Os dados mostram que as ações do NO na liberação de GABA são extremamente complexas e sugerem que o nível de excitabilidade neuronal pode depender da concentração de NO e de subseqüentes aumentos ou reduções na liberação de GABA.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Kato, T., Itoyama, Y. (1995). Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters** 199(2): 152-154.
- Almeida, O. M. M. S., Gardino, P. F., Santos, N. E. L. Yamasaki, E. N., De Mello, M. C. F., Hokoç, J. N., De Mello, F. G. (2002). Opposite roles of GABA and excitatory amino acids on the control of GAD expression in cultured retina cells. **Brain Research** 925: 89-99
- Andrade Da Costa, B., Hokoç, J. (2003). Coexistence of GAD-65 and GAD-67 with tyrosine hydroxylase and nitric oxide synthase in amacrine and interplexiform cells of the primate, *Cebus apella*. **Visual Neuroscience** 20(02): 153-163.
- Andrade da Costa, B. L. S., De Mello, F. G., Hokoç, J. N. (2000). Transporter-mediated GABA release induced by excitatory amino acid agonist is associated with GAD-67 but not GAD-65 immunoreactive cells of the primate retina. **Brain Research** 863(1-2): 132-142.
- Anthony, T. L., Brooks, H. L., Boassa, D., Leonov, S., Yanochko, G. M., Regan, J. W., Yool, A. J. (2000). Cloned Human Aquaporin-1 Is a Cyclic GMP-Gated Ion Channel. **Molecular Pharmacology** 57(3): 576.
- Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M., Price, T. D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. **Biochem Biophys Res Commun** 11: 330-334.
- Bains, J. S., Ferguson, A. V. (1997). Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. **The Journal of Physiology** 499(3): 733-746.
- Barnstable, C. J. (1993). Glutamate and GABA in retinal circuitry. **Curr Opin Neurobiol** 3(4): 520-525.
- Baylor, D.A., Fuortes, M.G.F., O'Bryan, P.M. (1971). Receptive field of cones in the retina of the turtle. **J. Physiol.** 214: 265-294.
- Beckman, J. S., Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology- Cell Physiology** 271(5): 1424-1437.

- Beckman, M. L., Bernstein, E. M., Quick, M. W. (1998). Protein Kinase C Regulates the Interaction between a GABA Transporter and Syntaxin 1A. **Journal of Neuroscience** 18(16): 6103.
- Beckman, M. L., Bernstein, E. M., Quick, M. W. (1999). Multiple G Protein-Coupled Receptors Initiate Protein Kinase C Redistribution of GABA Transporters in Hippocampal Neurons. **Journal of Neuroscience** 19(11): 9.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. **Nature Reviews Neuroscience** 3(9): 728-739.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., Gaiarsa, J. L. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ménage à trois'. **Trends in Neurosciences** 20(11): 523-529.
- Ben-Ari, Y., Tseeb, V., Ragozzino, D., Khazipov, R., Gaiarsa, J. L. (1994). gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. **Prog Brain Res** 102: 261-273.
- Bennett, M. K., Calakos, N., Scheller, R. H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. **Science** 257(5067): 255-259.
- Bernath, S. (1992). Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact. **Prog. Neurobiol** 38: 57-91.
- Bezprozvanny, I., Scheller, R. H., Tsien, R. W. (1995). Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. **Nature** 378(6557): 623-626.
- Bie, B. H., Zhao, Z. Q. (2001). Nitric oxide inhibits GABA-evoked current in dorsal root ganglion neuron via PKG-dependent pathway. **Brain Research Bulletin** 55(3): 335-339.
- Bishop, P. O. (1984) Processing of visual information within the retinostriate system. **In: Handbook of Physiology** (I. Darien-Smith, ed.) 341-424.
- Bloom, F. E., Iversen, L. L. (1971). Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. **Nature** 229(5287): 628-630.
- Bloomfield, S. A., Dacheux, R. F. (2001). Rod Vision: Pathways and Processing in the Mammalian Retina. **Progress in Retinal and Eye Research**. 20 (3): 351-384
- Bloomfield S.A., Xin, D. (2000). Surround inhibition of mammalian AII amacrine cells is generated in the proximal retina. **J. Physiol.** 523: 771–783

- Bolanos, J. P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J. M., Clark, J. B., Heales, S. J. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. **J Neurochem** 68(6): 2227-2240.
- Borden, L. A., Smith, K. E., Hartig, P. R., Branchek, T. A., Weinshank, R. L. (1992). Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. **Journal of Biological Chemistry** 267(29): 21098-21104.
- Boulos, C., Jiang, H., Balazy, M. (2000). Diffusion of Peroxynitrite into the Human Platelet Inhibits Cyclooxygenase via Nitration of Tyrosine Residues. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 293(1): 222.
- Bowery, N. (1989). GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. **Trends Pharmacol Sci** 10(10): 401-407.
- Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M., Bachmann, C. (1999). l-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. **Molecular Brain Research** 70(2): 231-241.
- Bredt, D. S. (2003). Nitric oxide signaling specificity-the heart of the problem. **Journal of cell science** 116: 9-15.
- Bredt, D. S., Ferris, C. D., Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **Journal of Biological Chemistry** 267(16): 10976-10981.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron** 8(1): 3-11.
- Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W., Bredt, D. S. (1996). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. **J Neurosci** 16(23): 7407-15.
- Brune, B., Lapetina, E. G. (1991). Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. **Biochem Biophys Res Commun** 181(2): 921-926.
- Butz, S., Okamoto, M., Sudhof, T. C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. **Cell** 94(6): 773-82.
- Calaza, K. C., De Mello, F. G., Gardino, P. F. (2001). GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells. **Journal of Neurocytology** 30(3): 181-193.

- Calaza, K. C., Gardino, P. F., De Mello, F. G. (2006). Transporter mediated GABA release in the retina: Role of excitatory amino acids and dopamine. **Neurochem Int.** 49: 769-777
- Calaza, K., Fialho De Mello, M. C., Garcia De Mello, F., Gardino, P. F. (2003). Local Differences in GABA Release Induced by Excitatory Amino Acids During Retina Development: Selective Activation of NMDA Receptors by Aspartate in the Inner Retina. **Neurochemical Research** 28(10): 1475-1485.
- Cammack, J. N., Rakhilin, S. V., Schwartz, E. A. (1994). A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. **Neuron** 13(4): 949-960.
- Campochiaro, P., Ferkany, J. W., Coyle, J. T. (1984). The dissociation of evoked release of [³H]-GABA and of endogenous GABA from chick retina in vitro. **Exp Eye Res** 39(3): 299-305.
- Carvalho, A. P., Ferreira, I. L., Carvalho, A. L., Duarte, C. B. (1995). Glutamate receptor modulation of [³H] GABA release and intracellular calcium in chick retina cells. **Ann. NY Acad. Sci** 757: 436-456.
- Castro, N. G., De Mello, M. C. F., De Mello, F. G., Aracava, Y. (1999). Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. **British Journal of Pharmacology** 126: 1847-1855.
- Catsicas, M., Mobbs, P. (2001). GABA_B Receptors Regulate Chick Retinal Calcium Waves. **Journal of Neuroscience** 21(3): 897.
- Chan, N. N., Vallance, P., Colhoun, H. M. (2000). Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. **Diabetologia** 43(2): 137-147.
- Chen, C., Schofield, G. G. (1993). Nitric oxide modulates Ca²⁺ channel currents in rat sympathetic neurons. **Eur J Pharmacol** 243(1): 83-86.
- Cherubini, E., Strata, F. (1997). GABA_C Receptors: A Novel Receptor Family with Unusual Pharmacology. **News in Physiological Sciences** 12: 136-141.
- Cho, H. J. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **Journal of Experimental Medicine** 176(2): 599-604.
- Choi, B. M., Pae, H. O., Jang, S. I., Kim, Y. M., Chung, H. T. (2002). Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **J Biochem Mol Biol** 35(1): 116-126.
- Choi, D. W. (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci** 11(10): 465-469.

- Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A., Bredt, D. S. (1999). PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain. **Journal of Biological Chemistry** 274(39): 27467-27473.
- Cohen, G. A., Hobbs, A. J., Fitch, R. M., Zinner, M. J., Chaudhuri, G., Ignarro, L. J. (1996). Nitric oxide regulates endothelium-dependent vasodilator responses in rabbit hindquarters vascular bed in vivo. **American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology** 271(1): 133-139.
- Corey, J. L., Davidson, N., Lester, H. A., Brecha, N., Quick, M. W. (1994). Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. **Journal of Biological Chemistry** 269(20): 14759-14767.
- Cossenza, M., Paes de Carvalho, R. (2000). L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells. **J. Neurochem** 74: 1885-1894.
- Coulombre, A. J. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. **Am J Anat** 96(1): 153-189.
- Crow, J. P., Beckman, J. S. (1995). The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. **Curr Top Microbiol Immunol** 196: 57-73.
- Dacheux, R.F., Raviola, E. (1986). The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. **J. Neurosci.** 6: 331-345.
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** 65: 1-105.
- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V., Murad, F. (2001). Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 41(1): 203-236.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R., Snyder, S. H. (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90(21): 9808.
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci US A** 88(14): 6368-6371.
- De-Faria, M. H., do-Nascimento, J. L., Paes-de-Carvalho, R. (1995). Biochemical characterization of NADPH-diaphorase in the chick embryo retina: stimulation by calcium ions and inhibition by arginine analogs. **Braz J Med Biol Res** 28(2): 252-255.

- De Mello, F. G., Bachrach, U., Nirenberg, M. (1976). Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. **J Neurochem** 27(4): 847-851.
- De Mello, M. C., Guerra-Peixe, R., De Mello, F. G. (1993). Excitatory amino acid receptors mediate the glutamate-induced release of GABA synthesized from putrescine in cultured cells of embryonic avian retina. **Neurochem Int** 22(3): 249-253.
- Deken, S. L., Beckman, M. L., Boos, L., Quick, M. W. (2000). Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. **Nature Neuroscience** 3: 998-1003.
- DeVries, S. H., Baylor, D. A. (1995). An alternative pathway for signal flow from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 92:10658–10662.
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., Snyder, S. H. (1994a). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proc Natl Acad Sci US A** 91(10): 4214-4218.
- Dinerman, J. L., Steiner, J. P., Dawson, T. M., Dawson, V., Snyder, S. H. (1994b). Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. **Neuropharmacology** 33(11): 1245-51.
- Djamgoz, M. B. A. (2000). Light-adaptive role of nitric oxide in the outer retina of lower vertebrates: a brief review. **Philosophical Transactions: Biological Sciences** 355(1401): 1199-1203.
- Djamgoz, M. B. A., Wagner, H. J. (1992). Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. **Neurochemistry International** 20(2): 139-191.
- Do Nascimento, J. L. M., De Mello, F. G. (1985). Induced release of gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated, high-affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells. **J Neurochem** 45(6): 1820-1827.
- Do Nascimento, J. L. M., Hokoç, J. N., De Mello, M. C., De Mello, F. G. (1991). Neurotransmitter release in aggregate cultures of chick embryo retina cells. **Rev. Brasil. Biol** 56 (1): 135-143.
- Do Nascimento, J. L. M., Ventura, A. L., Paes de Carvalho, R. (1998). Veratridine-and glutamate-induced release of [³H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. **Brain Res** 798(1-2): 217-222.

- Duarte, C. B., Ferreira, I. L., Santos, P. F., Oliveira, C. R., Carvalho, A. P. (1993). Glutamate increases the $[Ca^{2+}]_i$ but stimulates Ca^{2+} independent release of $[^3H]$ GABA in cultured chick retina cells. **Brain Res** 611(1): 130-138.
- DuVall, M. D., Zhu, S., Fuller, C. M., Matalon, S. (1998). Peroxynitrite inhibits amiloride-sensitive Na^+ currents in *Xenopus* oocytes expressing $\alpha\beta\gamma$ -rENaC. **American Journal of Physiology- Cell Physiology** 274(5): 1417-1423.
- Ehrlich, D. Morgan, I.G. (1980) Kainic acid destroys displaced amacrine cells in post-hatch chicken retina. **Neurosci Lett.** 17(1-2):43-48
- Famiglietti, E. V., Kolb, H. (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. **Brain Res.** 84: 293–300
- Ferreira, I. L., Duarte, C. B., Santos, P. F., Carvalho, A. P. (1994). Release of $[^3H]$ GABA evoked by glutamate receptor agonists in cultured chick retina cells: effect of Ca^{2+} . **Brain Res.** 664: 252-256.
- Ferro, A. B. (2007). Técnicas imunocitoquímicas. Escola superior de tecnologia da saúde de Lisboa.
- Fischer, A. J., Stell, W. K. (1999). Nitric oxide synthase-containing cells in the retina, pigmented epithelium, choroid, and sclera of the chick eye. **The Journal of Comparative Neurology** 405(1): 1-14.
- Fletcher, E. L., Hack, I. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. **The Journal of Comparative Neurology** 420(1): 98-112.
- Fon, E. A., Edwards, R. H. (2001). Molecular mechanisms of neurotransmitter release. **Muscle & Nerve** 24(5): 581-601.
- Friebe, A., Wedel, B., Harteneck, C., Foerster, J., Schultz, G., Koesling, D. (1997). Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. **Biochemistry** 36(6): 1194-1198.
- Furchgott, R. F. (1999). Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide. **Bioscience Reports** 19(4): 235-251.
- Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288(5789): 373-376.
- Gale, E. F. (1966). The bacterial amino acid decarboxylases. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry** 2(3): 4.
- Garcia, X., Stein, F. (2006). Nitric Oxide. Seminars in **Pediatric Infectious Diseases** 17(2): 55-57.

- Garthwaite, J., Boulton, C. L. (1995). Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System. **Annual Review of Physiology** 57(1): 683-706.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R. M., Moncada, S. (1989). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol** 172(4-5): 413-416.
- Getting, S. J., Segieth, J., Ahmad, S., Biggs, C. S., Whitton, P. S. (1996). Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. **Brain Research** 717(1-2): 196-199.
- Ginap, T., Kilbinger, H. (1998). Inhibition by nitric oxide and cyclic GMP of 5-hydroxytryptamine release from the vascularly perfused guinea-pig small intestine. **Neurochem Int** 32(5-6): 487-492.
- Gole, M. D., Souza, J. M., Choi, I., Hertkorn, C., Malcolm, S., Foust, R. F., Finkel, B., Lanken, P. N., Ischiropoulos, H. (2000). Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology** 278(5): 961-967.
- Gomez, J., Casado, M., Gimenez, C., Aragon, C. (1991). Inhibition of high-affinity gamma-aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. **Biochem J** 275(Pt 2): 435-439.
- Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzyk, L., Keynan, S., Miedel, M. C., Davidson, N., Lester, H. A., Kanner, B. I. (1990). Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. **Science** 249(4974): 1303.
- Guevara-Guzman, R., Emson, P. C., Kendrick, K. M. (1994). Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. **J Neurochem** 62(2): 807-810.
- Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D. K., Koopman, L. J., Raviola, E. (1997). Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. **Neuron** 18(5): 723-736.
- Haamedi, S. N., Djamgoz, M. B. (2002). Dopamine and nitric oxide control both flickering and steady-light-induced cone contraction and horizontal cell spinule formation in the teleost (carp) retina: serial interaction of dopamine and nitric oxide. **J Comp Neurol** 449(2): 120-128.
- Haber, B., Kuriyama, K., Roberts, E. (1970). L-Glutamic Acid Decarboxylase: A New Type in Glial Cells and Human Brain Gliomas. 168: 598-599.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol.** 88, 49-92.

- Hanafy, K. A., Krumenacker, J. S., Murad, F. (2001). NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med Sci Monit** 7(4): 801-819.
- Hanawa, I., Takahashi, K., Kawamoto, N. (1976). A correlation of embryogenesis of visual cells and early receptor potential in the developing retina. **Exp Eye Res** 23(6): 587-594.
- Hangai, M., Yoshimura, N., Hiroi, K., Mandai, M., Honda, Y. (1996). Inducible Nitric Oxide Synthase in Retinal Ischemia-reperfusion Injury. **Experimental Eye Research** 63(5): 501-509.
- Hardman, J. G., Sutherland, E. W. (1969). Guanyl Cyclase, an Enzyme Catalyzing the Formation of Guanosine 3', 5'-Monophosphate from Guanosine Triphosphate. **Journal of Biological Chemistry** 244(23): 6363-6370.
- Hartline, H. K. (1938) The responses of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. **Am. J. Physiol.** 121: 400-415.
- Hartveit, E. (1999). Reciprocal synaptic interactions between rod bipolar cells and amacrine cells in the rat retina. **Journal of Neurophysiology**. 99: 2923-2936.
- Heales, S. J. R., Bolaños, J. P., Stewart, V. C., Brookes, P. S., Land, J. M., Clark, J. B. (1999). Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **BBA-Bioenergetics** 1410(2): 215-228.
- Heneka, M. T., Feinstein, D. L. (2001). Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. **J Neuroimmunol** 114(1-2): 8-18.
- Hering, H., Kroger, S. (1996). Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina. **J Comp Neurol** 375(3): 393-405.
- Hevel, J. M., White, K. A., Marletta, M. A. (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **Journal of Biological Chemistry** 266(34): 22789-22791.
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science** 235(4787): 473-476.
- Hirooka, K., Kourennyi, D. E., Barnes, S. (2000). Calcium channel activation facilitated by nitric oxide in retinal ganglion cells. **Journal of Neurophysiology** 83(1): 198-206.
- Hirsch, D. B., Steiner, J. P., Dawson, T. M., Mammen, A., Hayek, E., Snyder, S. H. (1993). Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. **Curr Biol** 3(11): 749-754.

- Hofmann, H. D., Möckel, V. (1991). Release of γ -amino [^3H]-butyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory amino acid receptors. **J Neurochem** 56: 923-932.
- Hokoç, J. N., Ventura, A. L., Gardino, P. F., De Mello, F. G. (1990). Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. **Brain Res** 532(1-2): 197-202.
- Hughes, W. F., LaVelle, A. (1974). On the synaptogenic sequence in the chick retina. **The Anatomical Record** 179(3): 297-301.
- Hyde, J. C., Robinson, N. (1976). Improved histological localization of GABA-transaminase activity in rat cerebellar cortex after aldehyde fixation. **Histochemistry and Cell Biology** 46(3): 261-268.
- Ientile, R., Malecka, B., Picciurro, V., Naso, A., Pedale, S., Macaione, S. (1996). Nitric oxide synthase in chick embryo retina during development. **FEBS Letters** 379(1): 82-84.
- Ientile, R., Pedale, S., Picciurro, V., Macaione, V., Fabiano, C., Macaione, S. (1997). Nitric oxide mediates NMDA-evoked [^3H] GABA release from chick retina cells. **FEBS Lett** 417(3): 345-348.
- Jang, D., Murrell, G. A. C. (1998). Nitric Oxide in Arthritis. **Free Radical Biology and Medicine** 24(9): 1511-1519.
- Jayakumar, A. R., Sujatha, R., Paul, V., Asokan, C., Govindasamy, S., Jayakumar, R. (1999). Role of nitric oxide on GABA, glutamic acid, activities of GABA-T and GAD in rat brain cerebral cortex. **Brain Research** 837(1-2): 229-235.
- Johnson, J., Chen, T. K., Rickman, D. W., Evans, C., Brecha, N. C. (1996). Multiple-aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. **J Comp Neurol** 375: 212-224.
- Kakuda, D. K., Finley, K. D., Maruyama, M., MacLeod, C. L. (1998). Stress differentially induces cationic amino acid transporter gene expression. **BBA-Biomembranes** 1414(1-2): 75-84.
- Kalloniatis, M., Fletcher, E. L. (1993). Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina. **The Journal of Comparative Neurology** 336(2): 174-193.
- Kalloniatis, M., Tomisich, G. (1999). Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. **Progress in Retinal and Eye Research** 18(6): 811-866.

- Kamada, Y., Mizuno, A., Matsuda, M. (1981). Effect of L-glutamic acid on [¹⁴C] GABA release from isolated rat retina. **Brain Res** 229(1): 251-255.
- Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y. C., Murad, F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proc Natl Acad Sci US A** 95(20): 11584-11589.
- Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Itoh, T. (1995). Nitric oxide inhibition of the depolarization-evoked glutamate release from synaptosomes of rat cerebellum. **Neurosci Lett** 194(1-2): 5-8.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2003). Principles of Neuroscience, 4th, New York: McGraw-Hill Health Professions Division.
- Kano, T., Shimizu-Sasamata, M., Huang, P. L., Moskowitz, M. A., Lo, E. H. (1998). Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. **Letter to Neuroscience** 86 (3) 695-699
- Kaufman, D. L., Houser, C. R., Tobin, A. J. (1991). Two forms of the-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. **J Neurochem** 56(2): 720-723.
- Kavanaugh, M. P., Arriza, J. L., North, R. A., Amara, S. G. (1992). Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. **Journal of Biological Chemistry** 267(31): 22007-22009.
- Kelly, C. J., Gold, D. P. (1999). Nitric oxide in interstitial nephritis and other autoimmune diseases. **Semin Nephrol** 19(3): 288-295.
- Koeberle, P. D., Ball, A. K. (1999). Nitric Oxide Synthase Inhibition Delays Axonal Degeneration and Promotes the Survival of Axotomized Retinal Ganglion Cells. **Experimental Neurology** 158(2): 366-381.
- Kolb, H. (2003). How the retina works. **American Scientist** 91(1): 28–35.
- Kolb, H., Famiglietti, E.V. (1974). Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of the cat retina. **Science** 186: 47–49.
- Kolb, H., Nelson, R., Mariani, A. (1981). Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. **Vision. Res.** 21: 1081–1114.
- Kooy, N. W., Lewis, S. J., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R., Beckman, J. S. (1997). Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. **Crit Care Med** 25(5): 812-819.

- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Suschek, C., Kolb-Bachofen, V. (2001). Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. **International Immunopharmacology** 1(8): 1407-1420.
- Kurenyy, D. E., Moroz, L. L., Turner, R. W., Sharkey, K. A., Barnes, S. (1994). Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. **Neuron** 13(2): 315-324.
- Kuriyama, K., Ohkuma, S. (1995). Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. **Jpn J Pharmacol** 69(1): 1-8.
- Kurz, S., Harrison, D. G. (1997). Insulin and the Arginine Paradox. **Am Soc Clin Investig.** 99: 369-370.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 89(14): 6348.
- Larsson, O. M., Hertz, L., Schousboe, A. (1980). GABA uptake in astrocytes in primary cultures: coupling with two sodium ions. **J Neurosci Res** 5(6): 469-477.
- Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E. (1993). Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. **J Neurosci** 13(3): 1088.
- Li, D. P., Chen, S. R., Pan, H. L. (2002). Nitric Oxide Inhibits Spinally Projecting Paraventricular Neurons Through Potentiation of Presynaptic GABA Release. **Journal of Neurophysiology** 88(5): 2664-2674.
- Li, Y., Zhang, W., Stern, J. E. (2003). Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: role of GABA. **Neuroscience** 118(3): 585-601.
- Light, D. B., Corbin, J. D., Stanton, B. A. (1990). Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. **Nature** 344(6264): 336-339.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature** 410(6827): 490-494.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., Nelson, N. (1993). Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain [corrected][published erratum appears in J Biol Chem 1993 Apr 25; 268 (12): 9156]. **Journal of Biological Chemistry** 268(3): 2106-2112.

- Liu, Z., Neff, R. A., Berg, D. K. (2006). Sequential Interplay of Nicotinic and GABAergic Signaling Guides Neuronal Development. **Science** 314(5805): 1610.
- Lonart, G., Wang, J. I. A., Johnson, K. M. (1992). Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **European journal of pharmacology** 220(2-3): 271-272.
- Löscher, W., Hörstermann, D. (1994). Differential effects of vigabatrin, γ -acetylenic GABA, aminooxyacetic acid, and valproate on levels of various amino acids in rat brain regions and plasma. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 349(3): 270-278.
- Louzada, P. R., Lima, A. C. P., Mendonca-Silva, D. L., Noel, F., De Mello, F. G., Ferreira, S. T. (2004). Taurine prevents the neurotoxicity of β -amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. **The FASEB Journal** 18(3): 511.
- Layer P.G., Vollmer G.(1982) Lucifer yellow stains displaced amacrine cells of the chicken retina during embryonic development. **Neurosci Lett.**31(2):99-104
- Macdonald, R. L., Olsen, R. W. (1994). Gaba_A Receptor Channels. **Annual Review of Neuroscience** 17(1): 569-602.
- Magalhães, C. R., Socodato, R. E. S., Paes-de-Carvalho, R. (2006). Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. **International Journal of Developmental Neuroscience** 24(1): 53-60.
- Mager, S., Naeve, J., Quick, M., Labarca, C., Davidson, N., Lester, H. A. (1993). Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. **Neuron** 10(2): 177-188.
- Marc, R. E., Liu, W. L. S. (2000). Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: Nested feedback, concatenated inhibition, and axosomatic synapses. **The Journal of Comparative Neurology** 425(4): 560-582.
- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism, **ASBMB**. **268**: 12231-12234.
- Marshall, J., Voaden, M. (1974). An autoradiographic study of the cells accumulating ³H gamma-aminobutyric acid in the isolated retinas of pigeons and chickens. **Invest Ophthalmol** 13(8): 602-607.
- Massey, S. C., Maguire, G. (1995). The role of glutamate in retinal circuitry. **Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission** 2: 201-221.

- Matsuda, T., Wu, J. Y., Roberts, E. (1956). Immunochemical studies on glutamic acid decarboxylase (EC 4.1.1.15) from mouse brain. **J Neurochem.** 21(1):159-66
- Mayer, B., John, M., Bohme, E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. **FEBS Lett** 277(1-2): 215-219.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature** 309(26): 261-263.
- McDonald, L. J., Murad, F. (1995). Nitric oxide and cGMP signaling. **Adv Pharmacol** 34: 263-275.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F., Fischmeister, R. (1993). Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. **Journal of Biological Chemistry** 268(35): 26286-26295.
- Mey, J., Thanos, S. (2000). Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. **Brain Research Reviews** 32(2-3): 343-379.
- Moller, M., Jones, N. M., Beart, P. M. (1995). Complex involvement of nitric oxide and cGMP at N-methyl-D-aspartic acid receptors regulating gamma-[³H] aminobutyric acid release from striatal slices. **Neurosci Lett** 190(3): 195-198.
- Morán, J., Pasantes-Morales, H. (1983). Effects of excitatory amino acids, and of their agonists and antagonists on the release of neurotransmitters from the chick retina. **Journal of Neuroscience Research** 10(3): 261-271.
- Morán, J., Pasantes-Morales, H. (1983). Effects of excitatory amino acids, and of their agonist and antagonists on the release of neurotransmitters from the chick retina. **J. Neurosci. Res.** 10: 261-271
- Morán, J., Pasantes-Morales, H., Redburn, D. A. (1986). Glutamate receptor agonists release [³H] GABA preferentially from horizontal cells. **Brain research.** 398(2): 276-287.
- Mosinger, J. L., Yazulla, S., Studholme, K. M. (1986). GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. **Exp Eye Res** 42(6): 631-644.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady Jr, R. O., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., Snyder, S. H. (2000). D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97(9): 4926.

- Mullershausen, F., Friebe, A., Feil, R., Thompson, W. J., Hofmann, F., Koesling, D. (2003). Direct activation of PDE5 by cGMP long-term effects within NO/cGMP signaling. **The Journal of Cell Biology** 160(5): 719-727.
- Murad, F. (1986). Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J Clin Invest** 78(1): 1-5.
- Nakane, M., Mitchell, J., Förstermann, U., Murad, F. (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. **Biochemical and biophysical research communications** 180(3): 1396-1402.
- Naren, A. P., Nelson, D. J., Xie, W., Jovov, B., Pevsner, J., Bennett, M. K., Benos, D. J., Quick, M. W., Kirk, K. L. (1997). Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. **Nature** 390(6657): 302-305.
- Neal, M., Cunningham, J., Matthews, K. (1998). Selective release of nitric oxide from retinal amacrine and bipolar cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 39(5): 850-853.
- Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J., MacLeod, C. L. (2001). Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. **Journal of Biological Chemistry** 276(19): 15881-15885.
- Oh, S. J., Kim, I. B., Lee, M. Y., Chun, M. H., Chung, J. W. (1998). NOS-like immunoreactive neurons express GABA-like immunoreactivity in rabbit and rat retinae. **Experimental Brain Research** 120(1): 109-113.
- Ohkuma, S., Katsura, M., Guo, J. L., Narihara, H., Hasegawa, T., Kuriyama, K. (1996). Role of peroxynitrite in [³H] gamma-aminobutyric acid release evoked by nitric oxide and its mechanism. **Eur J Pharmacol** 301(1-3): 179-188.
- Ohkuma, S., Katsura, M., Hibino, Y., Hara, A., Shirotani, K., Ishikawa, E., Kuriyama, K. (1998). Mechanisms for facilitation of nitric oxide-evoked [³H] GABA release by removal of hydroxyl radical. **J Neurochem** 71(4): 1501-1510.
- Ohkuma, S., Katsura, M., Higo, A., Shirotani, K., Hara, A., Tarumi, C., Ohgi, T. (2001). Peroxynitrite affects Ca²⁺ influx through voltage-dependent calcium channels. **J Neurochem** 76(2): 341-350.
- Ohkuma, S., Narihara, H., Katsura, M., Hasegawa, T., Kuriyama, K. (1995). Nitric oxide induced [³H] GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. **J. Neurochem** 65(3): 1109-1114.

- Osborne, N. N., Herrera, A. J. (1994). The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. **Neuroscience** 59(4): 1071-1081.
- Owens, D. F., Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nat Rev Neurosci** 3(9): 715-727.
- Ozaki, M., Shibuya, I., Kabashima, N., Isse, T., Noguchi, J., Ueta, Y., Inoue, Y., Shigematsu, A., Yamashita, H. (2000). Preferential Potentiation by Nitric Oxide of Spontaneous Inhibitory Postsynaptic Currents in Rat Supraoptic Neurons. **Journal of Neuroendocrinology** 12: 273-281.
- Paes-de-Carvalho, R., Mattos, J. C. (1996) Development of nitric oxide synthase in the avian retina. **Rev. bras. biol.**
- Park, J. W., Park, S. J., Park, S. H., Kim, K. Y., Chung, J. W., Chun, M. H., Oh, S. J. (2006). Up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase in experimental diabetic retina. **Neurobiology of Disease** 21(1): 43-49.
- Park, S. H., Park, J. W., Park, S. J., Kim, K. Y., Chung, J. W., Chun, M. H., Oh, S. J. (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. **Diabetologia** 46(9): 1260-1268.
- Paul, V. (2002). Evidence for the involvement of L-citrulline but not nitric oxide in the proconvulsant action of the precursor l-arginine on picrotoxin-induced convulsions in rats. **Biochemical Pharmacology** 63(11): 2019-2023.
- Paul, V., Ekambaram, P. (2005). Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on γ -aminobutyric acid concentration in the brain and on picrotoxin-induced convulsions in combination with phenobarbitone in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 80(3): 363-370.
- Paul, V., Jayakumar, A. R. (2000). A role of nitric oxide as an inhibitor of γ -aminobutyric acid transaminase in rat brain. **Brain Research Bulletin** 51(1): 43-46.
- Perez, M. T. R., Davanger, S. (1994). Distribution of GABA immunoreactivity in kainic acid-treated rabbit retina. **Experimental Brain Research** 100(2): 227-238.
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H., Nakane, M., Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88(23): 10480.

- Pow, D. V. (2001). Amino acids and their transporters in the retina. **Neurochemistry International** 38(6): 463-484.
- Prast, H. , Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol** 64(1): 51-68.
- Prickaerts, J., Steinbusch, H. W. M., Smits, J. F. M. e de Vente, J. (1997). Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: Effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **European journal of pharmacology** 337(2-3): 125-136.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Williams, S. M. (2001). Neuroscience. **Sinauer Associates, INC.** Third Edition.
- Qiang, M., Chen, Y. C., Wang, R., Wu, F. M., Qiao, J. T. (1997). Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. **Behav. Pharmacol** 8(2): 3.
- Rabkin, S. W., Klassen, S. S. (2007). Nitric oxide differentially regulates the gene expression of caspase genes but not some autophagic genes. **Nitric Oxide** 16(3): 339-347.
- Raviola, E., Dacheux, R. F. (1987). Excitatory dyad synapse in rabbit retina. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 84: 7324-7328
- Reiter, C. D., Teng, R. J., Beckman, J. S. (2000). Superoxide Reacts with Nitric Oxide to Nitrate Tyrosine at Physiological pH via Peroxynitrite. **Journal of Biological Chemistry** 275(42): 32460-32466.
- Reyes-Harde, M., Potter, B. V. L., Galione, A., Stanton, P. K. (1999). Induction of Hippocampal LTD Requires Nitric-Oxide-Stimulated PKG Activity and Ca²⁺ Release From Cyclic ADP-Ribose-Sensitive Stores. **Journal of Neurophysiology** 82(3): 1569-1576.
- Richerson, G. B., Wu, Y. (2003). Dynamic Equilibrium of Neurotransmitter Transporters: Not Just for Reuptake Anymore. **Journal of Neurophysiology** 90(3): 1363-1374.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻-co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature** 397(6716): 251-5.
- Roberts, E., Kuriyama, K. (1968). Biochemical-physiological correlations in studies of the gamma-aminobutyric acid system. **Brain Res** 8(1): 1-35.
- Roberts, E., Wein, J., Simonsen, D. G. (1964). Gamma-aminobutyric acid (GABA), vitamin B6, and neuronal function--a speculative synthesis. **Vitam Horm** 22: 503-559.

- Rodieck, R. W. (1973) *The Vertebrate Retina*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Samdani, A. F., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (1997). Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia. **Stroke** 28(6): 1283-1288.
- Sandor, N. T., Brassai, A., Puskas, A., Lendvai, B. (1995). Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum. *Brain Research Bulletin* 36 (5): 483-486.
- Saransaari, P., Oja, S. S. (2006). Modulation of GABA Release by Second Messenger Substances and NO in Mouse Brain Slices Under Normal and Ischemic Conditions. **Neurochemical Research** 31(11): 1317-1325.
- Sayed, N., Baskaran, P., Ma, X., Akker, F., Beuve, A. (2007) Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. **PNAS** 104 (30):12312-12317.
- Schales, O., Schales, S. S. (1946). Glutamic acid decarboxylase in higher plants. II. pH-activity curve, reaction kinetics, inhibition by hydroxylamine. **Arch. Biochem.** 11: 155-166.
- Scherrer, P., Stoeckenius, W. (1985). Effects of tyrosine-26 and tyrosine-64 nitration on the photoreactions of bacteriorhodopsin. **Biochemistry** 24(26): 7733-7740.
- Schiller, P. H., Sandell, J. H. and Maunsell, J. H. R. (1986) Functions of the ON and OFF channels of the visual system. *Nature* 322: 824-825.
- Schuman, E. M., Madison, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science** 254(5037): 1503-1506.
- Schuman, E. M., Madison, D. V. (1994). Nitric Oxide and Synaptic Function. **Annual Review of Neuroscience** 17(1): 153-183.
- Schwartz, E. A. (1982). Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. **The Journal of Physiology** 323(1): 211-227.
- Schwartz, E. A. (1987). Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. **Science** 238(4825): 350-355.
- Segieth, J., Getting, S. J., Biggs, C. S., Whitton, P. S. (1995). Nitric oxide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. **Neurosci Lett** 200(2): 101-104.
- Segovia, G., Mora, F. (1998). Role of Nitric Oxide in Modulating the Release of Dopamine, Glutamate, and GABA in Striatum of the Freely Moving Rat. **Brain Research Bulletin** 45(3): 275-279.

- Segovia, G., Porras, A., Mora, F. (1994). Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. **Neuroreport** 5(15): 1937-1940.
- Sequeira, S. M., Ambrósio, A. F., Malva, J. O., Carvalho, A. P., Carvalho, C. M. (1997). Modulation of Glutamate Release from Rat Hippocampal Synaptosomes by Nitric Oxide. **Nitric Oxide** 1(4): 315-329.
- Sequeira, S. M., Duarte, C. B., Carvalho, A. P., Carvalho, C. M. (1998). Nitric oxide differentially affects the exocytotic and the carrier-mediated release of [³H] γ -aminobutyric acid in rat hippocampal synaptosomes. **Molecular Brain Research** 55(2): 337-340.
- Shen, K. Z., Cox, B. A., Johnson, S. W. (1997). L-arginine potentiates GABA-mediated synaptic transmission by a nitric oxide-independent mechanism in rat dopamine neurons. **Neuroscience** 79(3): 649-658.
- Shimizu-Sasamata, M., Bosque-Hamilton, P., Huang, P. L., Moskowitz, M. A., Lo, E. H. (1998). Attenuated Neurotransmitter Release and Spreading Depression-Like Depolarizations after Focal Ischemia in Mutant Mice with Disrupted Type I Nitric Oxide Synthase Gene. **Journal of Neuroscience** 18(22): 9564.
- Siegel, G., J., Agranoff, B., W. (1999). Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6^a Edição. Lippincott-Raven Publishers.
- Sjoeholm, A. (1998). Aspects of the involvement of interleukin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Cell Death and Differentiation** 5(6): 461-468.
- Smolenski, A., Burkhardt, A. M., Eigenthaler, M., Butt, E., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., Walter, U. (1998). Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 358(1): 134-139.
- Stamler, J. S., Lamas, S., Fang, F. C. (2001). Nitrosylation The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. **Cell** 106(6): 675-683.
- Stamler, J. S., Meissner, G. (2001). Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. **Physiological Reviews** 81(1): 209-237.
- Stern, J. E., Ludwig, M. (2001). NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 280(6): 1815-1822.

- Strolin Benedetti, M., Dostert, P., Marrari, P., Cini, M. (1993). Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. **J Neural Transm Gen Sect** 94(1): 21-30.
- Stuehr, D. J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. **BBA-Bioenergetics** 1411(2-3): 217-230.
- Sun, H., Crossland, W. J. (2000). Quantitative assessment of localization and colocalization of glutamate, aspartate, glycine, and GABA immunoreactivity in the chick retina. **The Anatomical Record** 260(2): 158-179.
- Takahashi, H., Shin, Y., Cho S., Zago, W., Nakamura, T., Gu, Z., Ma, Y., Furukawa, H., Liddington, R., Zhang D. (2007) Hypoxia Enhances S-Nitrosylation-Mediated NMDA Receptor Inhibition via a Thiol Oxygen Sensor Motif. **Neuron**. 53(1): 53-64
- Tapia, R., Arias, C. (1982). Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. **J. Neurochem.** 39: 1169-1178.
- Tatsukawa, T., Hirasawa, H., Kaneko, A., Kaneda, M. (2005). GABA-mediated component in the feedback response of turtle retinal cones. **Visual Neuroscience** 22(03): 317-324.
- Thoreson, W. B., Witkovsky, P. (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. **Prog Retin Eye Res** 18(6): 765-810.
- Trabace, L., Kendrick, K. M. (2000). Nitric Oxide Can Differentially Modulate Striatal Neurotransmitter Concentrations via Soluble Guanylate Cyclase and Peroxynitrite Formation. **Journal of Neurochemistry** 75(4): 1664-1674.
- Vardi, N., Sterling, P. (1994). Subcellular localization of GABA_A receptor on bipolar cells in macaque and human retina. **Vision Res** 34(10): 1235-1246.
- Varela, C., Rivera, L., Blanco, R., Villa, P. D. (2005). Depolarizing effect of GABA in horizontal cells of the rabbit retina. **Neuroscience Research** 53(3): 257-264.
- Verge, V. M., Xu, Z., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T. (1992). Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. **Proc Natl Acad Sci US A** 89(23): 11617-11621.
- Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U., Schousboe, A. (1999). The GABA Paradox. **Journal of Neurochemistry** 73(4): 1335-1342.
- Wade, R. S., Castro, C. E. (1990). Redox reactivity of iron (III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen and sulfur. **Chemical Research in Toxicology** 3(4): 289-291.

- Wall, M. J. (2003). Endogenous nitric oxide modulates GABAergic transmission to granule cells in adult rat cerebellum. **European Journal of Neuroscience** 18(4): 869-878.
- Wang, X., Robinson, P. J. (1997). Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. **J Neurochem** 68(2): 443-456.
- Wassle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. **Nat Rev Neurosci** 5(10): 747-757.
- Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W., Mitchell, J. B. (1998). The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis(New York. Print)** 19(5): 711-721.
- Wood, J. D., Kurylo, E., Lane, R. (1988). γ -Aminobutyric Acid Release from Synaptosomes Prepared from Rats Treated with Isonicotinic Acid Hydrazide and Gabaculine. **J. Neurochem** 50: 1839-1843.
- Worrall, D. M., Williams, D. C. (1994). Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. **Biochem. J** 297: 425-436.
- Wu, Y., Wang, W., Richerson, G. B. (2001). GABA Transaminase Inhibition Induces Spontaneous and Enhances Depolarization-Evoked GABA Efflux via Reversal of the GABA Transporter. **Journal of Neuroscience** 21(8): 2630.
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. e Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science** 256(5054): 225-228.
- Yamada, K., Nabeshima, T. (1997). Simultaneous measurement of nitrite and nitrate levels as indices of nitric oxide release in the cerebellum of conscious rats. **J Neurochem** 68(3): 1234-1243.
- Yang, H. W., Appenteng, K., Batten, T. F. C. (1997). Ultrastructural subtypes of glutamate-immunoreactive terminals on rat trigeminal motoneurons and their relationships with GABA-immunoreactive terminals. **Experimental Brain Research** 114(1): 99-116.
- Yang, X. L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Progress in Neurobiology** 73(2): 127-150.
- Yazulla, S. (1983). Stimulation of GABA release from retinal horizontal cells by potassium and acidic amino acid agonists. **Brain Res** 275(1): 61-74.
- Yazulla, S. (1986). GABAergic mechanisms in the retina. **Progress in retinal research** 5: 1-52.

- Yazulla, S., Cunningham, J., Neal, M. (1985). Stimulated release of endogenous GABA and glycine from the goldfish retina. **Brain research.** 345(2): 384-388.
- Yazulla, S., Kleinschmidt, J. (1983). Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. **Brain Res** 263(1): 63-75.
- Yazulla, S., Studholme, K. M., Vitorica, J., De Blas, A. L. (1989). Immunocytochemical localization of GABA_A receptors in goldfish and chicken retinas. **The Journal of Comparative Neurology** 280(1): 15-26.
- Yu, D., Eldred, W. D. (2005). Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. **J Comp Neurol** 483(3): 278-291.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)