



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

ADELAIDE DA CONCEIÇÃO FONSECA PASSOS

EVIDÊNCIA IMUNOHISTOQUÍMICA DA LIBERAÇÃO DE SEROTONINA
(5-HT) REGULADA POR RECEPTORES DE GLUTAMATO EM
CÉLULAS DA RETINA DE PINTO

Belém-Pará
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ADELAIDE DA CONCEIÇÃO FONSECA PASSOS

**EVIDÊNCIA IMUNOHISTOQUÍMICA DA LIBERAÇÃO DE SEROTONINA
(5-HT) REGULADA POR RECEPTORES DE GLUTAMATO EM
CÉLULAS DA RETINA DE PINTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração: Neurociências) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Co-orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Belém-Pará
2008

Passos, Adelaide da Conceição Fonseca

Evidência imunohistoquímica da liberação de serotonina (5-HT) regulada por receptores de glutamato em células da retina de pinto / Adelaide da Conceição Fonseca Passos, 2008.

xiii, 84 p.

Tese - Doutorado - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Retina 2. Serotonina 3. Cainato 4. Liberação

I. Do Nascimento, José Luiz Martins. II. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título

EVIDÊNCIA IMUNOHISTOQUÍMICA DA LIBERAÇÃO DE SEROTONINA
(5-HT) REGULADA POR RECEPTORES DE GLUTAMATO EM
CÉLULAS DA RETINA DE PINTO

ADELAIDE DA CONCEIÇÃO FONSECA PASSOS

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Co-orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Tese aprovada em 14 de novembro de 2008.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki-Britto

Profa. Dra. Maria Elena Crespo López

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Belém-Pará
2008

*V*ossos filhos não são vossos.
*S*ão os filhos e as filhas da vida.
*C*hegam através de vós, mas não são realmente vossos.
*P*odereis dar-lhes vosso amor, mas não vossos
pensamentos, porque têm seus próprios pensamentos.
*P*odereis abrigar seus corpos, mas não suas almas,
porque suas almas moram na casa do amanhã ...
*P*orque a vida não retrocede, nem se estanca.
*S*ois os arcos para que vossos filhos,
flechas vivas, lancem-se ao espaço.

K alhil Gibrán

Aos meus grandes e
eternos amores, Carlos
Passos, Carlos Eduardo e
Bruno Andrey.

AGRADECIMENTOS

Nesses últimos anos vivi muitas alegrias, incertezas, frustrações, mas triunfou a perseverança, a confiança no amanhã, e, principalmente, a fé inabalável no Criador. Gostaria de não esquecer as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa, mas tenho certeza que acabarei esquecendo, pois foram tantas, que não caberiam nas poucas linhas que posso escrever.

- Ao PROFESSOR Dr. José Luiz, meu orientador e idealizador deste trabalho, a quem sempre serei grata por ter me dado a oportunidade de ingressar na instigante Neurociência, pelo seu ideal de continuar formando seguidores, por sua espontânea bondade, mas, sobretudo, por encontrar forças para encarar os desafios;

- A professora Dra. Silene Lima, minha co-orientadora, que foi muito mais do que isso. Espero nunca esquecer tudo o que você fez por mim, por ter me acolhido carinhosamente no seu laboratório, por seu incentivo, apoio, confiança, e como não poderíamos esquecer, pela amizade consolidada;

- A professora Dra. Dânia Hamassaki-Britto (USP) que me recebeu gentilmente em seu laboratório, colocando à disposição os recursos humanos e materiais necessários para o meu aprendizado;

- Ao professor Dr. Claudio Salgado e sua equipe, pela compreensão em todas as demandas;

- Aos professores doutores da banca examinadora de defesa da tese: Dânia Emi Hamassaki-Britto, Maria Elena Crespo López, Luiz Carlos de Lima Silveira,

Juarez Antônio Simões Quaresma e Manoel da Silva Filho. Obrigada por terem disposto do precioso e exíguo tempo para lerem e avaliarem o trabalho;

- Ao professor Dr. Edmar Costa e seus colaboradores, por permitir em determinada fase do trabalho, a realização dos cortes de retina no criostato do seu laboratório;

- Aos meus três brilhantes companheiros desde o início do mestrado, com os quais assumir débitos impagáveis, Fernando Allan, Anderson Herculano e Luis Antônio;

- Aos obstinados amigos dos laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia: Michele, minha companheira constante nesta última fase; Karen, minha querida e meiga confidente; Tati, Tarcy, Gabi, Keuri, Barbarela, Moisés, Chubert, Gilmara, Soraya, Toninho, e tantos outros que passaram, mas que deixaram lembranças maravilhosas;

- A grande amiga Ivanira, minha terapeuta sem honorários. Retribuo com a escuta recíproca;

- Aos meus pais abençoados pelo amor incondicional, me perdoem os momentos de ausência;

- Aos meus irmãos biológicos que sempre me incentivaram na busca do conhecimento, mesmo não compreendendo a necessária dedicação.

- E a tantos outros que reconheço o apoio, a torcida, ou simplesmente, as palavras de estímulo como “BOA SORTE!!!”.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 RETINA	1
1.1.1 Organização Morfofuncional da Retina	1
1.1.2 A Retina como Modelo de Estudo	4
1.1.3 Sistemas de Neurotransmissores na Retina	5
1.1.4 Receptores Ionotrópicos de Glutamato na Retina	9
1.2 SEROTONINA	11
1.2.1 Serotonina no Sistema Nervoso Central	11
1.2.2 Transportador de Serotonina	12
1.2.3 Serotonina na Retina	15
1.3 REGULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NEUROATIVAS NA RETINA MEDIADA POR RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES ...	19
1.4 OBJETIVOS	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 ANIMAIS	25
2.2 PROCESSAMENTO PARA IMUNOHISTOQUÍMICA DAS RETINAS TRATADAS E NÃO TRATADAS	25
2.2.1 Enucleação e Dissecção	25

2.2.2 Incubação e Fixação	27
2.2.3 Crioproteção e Corte	33
2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA	34
2.4 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL	38
2.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA	40
2.5.1 Densitometria	40
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
3. RESULTADOS	41
3.1 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS CONTROLES E TRATADAS	41
3.1.1 Retinas Controle	41
3.1.2 Retinas Tratadas	41
3.2 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL	57
4. DISCUSSÃO	59
4.1 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS CONTROLES	59
4.2 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS TRATADAS	63
5. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático da retina mostrando sua estrutura laminar e seus elementos neurais. SE, segmento externo; SI, segmento interno; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CGC, camada de células ganglionares; CFN, camada de fibras nervosas (Modificado de Rodieck, 1998) 2
- Figura 2.** Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica ilustrando as três diferentes classes de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, KA e NMDA). Glu, glutamato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; EAAT, transportador de aminoácido excitatório; VS, vesícula sináptica 8
- Figura 3.** (A) Modelo bidimensional do transportador de serotonina (SERT) da membrana neuronal de rato mostrando a homologia com os transportadores de norepinefrina (NET), dopamina (DAT) ou ambos. (B) Representação esquemática do mecanismo de recaptação de 5-HT pelo SERT envolvendo um co-transporte de Na^+ , Cl^- e 5-HT protonada ligados ao transportador na porção extracelular antes da translocação (Fonte: Frazer e Hensler, 1999) 14
- Figura 4.** Desenho experimental ilustrando a dissecação da retina e a obtenção de dois fragmentos centrais do tecido, eleitos aleatoriamente como grupo controle ou determinado grupo experimental: NMDA (100 μM) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μM) e cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM) 26
- Figura 5.** Desenho experimental ilustrando a incubação dos fragmentos de retina somente em solução de Ringer Locke ou contendo um dos agonistas glutamatérgicos testados: NMDA (100 μM) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μM) e cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM). Seguindo-se a fixação do tecido em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, por 2 horas 28
- Figura 6.** Desenho experimental ilustrando o pré-tratamento dos fragmentos de retina com o antagonista DNQX (100 μM), seguindo-se o tratamento com o agonista cainato (5 μM e 10 μM). Tecido posteriormente fixado em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, por 2 horas 30
- Figura 7.** Desenho experimental ilustrando o pré-tratamento dos fragmentos de retina com o bloqueador fluoxetina (10 μM), seguindo-se a adição do agonista cainato (5 μM e 10 μM). Tecido posteriormente fixado em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, por 2 horas 31
- Figura 8.** Desenho experimental ilustrando a incubação dos fragmentos de retina em solução de Ringer Locke sem Ca^{+2} na presença do agonista cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM). Controle experimental representado pela incubação do material em tampão de Ringer Locke com íons Ca^{+2} . Seguindo-se a fixação do tecido em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, por 2 horas 32
- Figura 9.** Desenho experimental ilustrando as secções obtidas a partir dos fragmentos de retina e submetidas ao procedimento imunohistoquímico para evidencição do padrão de marcação do tecido após o tratamento com os moduladores glutamatérgicos 36
- Figura 10.** Desenho experimental ilustrando a coloração das secções pelo método de Nissl. Imersão das lâminas em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 70%, 20%) por 1 minuto, lavagem na água destilada e passagem pelo corante tionina. Lavagem novamente em água destilada e imersão em soluções crescentes de álcool

(20%, 70%, 95%, 100%) por 1 minuto, seguida da clarificação em xileno 100% por 3 minutos e montagem das lâminas com Entellan 39

Figura 11. Fotomicrografia de corte transversal de retina de pinto (P1) não-incubada ou incubada somente em tampão de Ringer Locke por 30 minutos e imunorreagida para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. CTR, controle. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 42

Figura 12. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) incubadas com os agonistas de glutamato {**B**, NMDA (100 μ M) sem Mg^{2+} ; **C**, AMPA (100 μ M); **D**, cainato (5 μ M); **E**, cainato (10 μ M); **F**, cainato (50 μ M)} por 30 minutos e imunorreagidas para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 44

Figura 13. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) incubadas com o agonista cainato (**C**, 1 μ M; **D**, 5 μ M; **E**, 10 μ M; **F**, 50 μ M) por 30 minutos e imunorreagidas para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CTR (RL), controle incubado em tampão de Ringer Locke. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 47

Figura 14. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) tratadas com **B**, cainato (10 μ M) por 30 minutos ou pré-tratadas com o antagonista **C**, DNQX (100 μ M) por 20 minutos e tratadas com cainato (10 μ M) por 30 minutos, a seguir imunorreagidas para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 49

Figura 15. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) tratadas com cainato (**C**, 5 μ M; **E**, 10 μ M) por 30 minutos ou pré-tratadas com o bloqueador fluoxetina (10 μ M) por 20 minutos e tratadas com cainato (**D**, 5 μ M; **F**, 10 μ M) por 30 minutos, a seguir imunorreagidas para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 52

Figura 16. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) incubadas em tampão de Ringer Locke sem Ca^{+2} com o agonista cainato (**D**, 1 μ M; **F**, 5 μ M) por 30 minutos e imunorreagidas para 5-HT. O controle experimental foi realizado em tampão contendo íons Ca^{+2} (**C**, 1 μ M; **E**, 5 μ M). CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 55

Figura 17. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) incubadas em tampão de Ringer Locke sem Ca^{+2} com o agonista cainato (**D**, 10 μ M; **F**, 50 μ M) por 30 minutos e imunorreagidas para 5-HT. O controle experimental foi realizado em tampão contendo íons Ca^{+2} (**C**, 10 μ M; **E**, 50 μ M). CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. Objetiva de 100x. Escala = 20 μ m 56

Figura 18. Fotomicrografias de cortes transversais de retinas de pinto (P1) coradas pelo método de Nissl pós-tratamento com o agonista cainato. **A**, controle; **B**, cainato (10 μ M). CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Objetiva de 40x. Escala = 50 μ m 58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e tratadas com diferentes moduladores glutamatérgicos {NMDA (100 μ M) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μ M), cainato (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M)} (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle) 43

Gráfico 2. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e tratadas com diferentes concentrações de cainato (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle) 46

Gráfico 3. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e pré-tratadas com DNQX (100 μ M), seguido do tratamento com cainato (10 μ M) (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle) 48

Gráfico 4. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e pré-tratadas com fluoxetina (10 μ M), seguido do tratamento com cainato (5 μ M e 10 μ M) (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle) 51

Gráfico 5. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e tratadas com cainato (5 μ M e 50 μ M) em tampão de Ringer Locke sem Ca^{2+} . O controle experimental foi realizado em tampão de Ringer Locke com íons Ca^{+2} (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle) 54

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

AADC: descarboxilase de aminoácidos aromáticos

AAE: aminoácido excitatório

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato

BSA: albumina de soro bovino

CaCl₂: cloreto de cálcio

CCG: camada de células ganglionares

CFN: camada de fibras nervosas

CNE: camada nuclear externa

CNI: camada nuclear interna

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

CPE: camada plexiforme externa

CPI: camada plexiforme interna

DAB: diaminobenzidina tetrahydrocloreto

DAT: transportador de dopamina

DNQX: 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona

GABA: ácido γ -aminobutírico

GYKI: 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenodioxo-5H-2,3-benzodiazepinico

KA: cainato ou ácido caínico

KCl: cloreto de potássio

LDH: lactato desidrogenase

MAO: monoamina oxidase

MK-801: 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzoaminociclohepten-5,10-imina

hidrogênio maleato

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NBQX: 2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoi-benzo(f)quinoxalina

NET: transportador de norepinefrina

NGS: soro normal de cabra

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

PCP: fenciclidina

SERT: transportador de serotonina

SNC: sistema nervoso central

TMDs: domínios transmembrana

TrOH: triptofano hidroxilase

RESUMO

No presente trabalho investigamos através de técnica imunohistoquímica os prováveis mecanismos envolvidos na regulação da liberação de serotonina (5-HT) na retina de pinto. Nossos resultados assinalam para a existência de possíveis interações entre dois sistemas de neurotransmissores presentes na retina de aves, o glutamato e a 5-HT. Células amácrinas e bipolares imunorreativas a 5-HT foram identificadas na camada nuclear interna (CNI). O estudo evidenciou alterações no padrão de imunorreatividade das células a 5-HT após o tratamento com o agonista cainato, indicando que a ativação de receptores de glutamato do tipo cainato induz a liberação de 5-HT das células 5-HT⁺. O efeito estimulatório do cainato pode ser bloqueado pela presença do antagonista DNQX. Os receptores de glutamato dos tipos NMDA e AMPA ativados não regulam a liberação de 5-HT na retina de pinto, uma vez que não foram evidenciadas alterações no padrão de expressão do neurotransmissor após a incubação com estes agonistas. O bloqueio do transportador de 5-HT (SERT) com o inibidor fluoxetina não alterou a liberação estimulada do neurotransmissor, sugerindo que essa liberação não ocorre por reversão do transportador. A liberação de 5-HT induzida pela ativação de receptores do tipo cainato provavelmente envolve mecanismos exocitóticos dependentes de Ca⁺², pois a ausência do íon no meio representou um fator regulatório negativo na liberação estimulada do neurotransmissor. O padrão histológico das retinas tratadas com o agonista cainato não revelou alterações que indicassem lise celular. Provavelmente, a redução evidente da imunorreatividade para 5-HT induzida por cainato decorre conseqüentemente da liberação do neurotransmissor e não do extravasamento de 5-HT das células 5-HT⁺.

PALAVRAS-CHAVE: serotonina, cainato, liberação, retina, pinto.

ABSTRACT

In the present work we investigated by immunohistochemistry procedures the probable mechanisms involved in 5-hydroxytryptamine (5-HT) release regulation from the chick retina. Our results indicate the existence of possible interactions between two neurotransmitters systems present in avian retina, the glutamatergic and the serotonergic. 5-HT-immunoreactive amacrine and bipolar cells were identified in the inner nuclear layer (INL). The study showed alterations in 5-HT-immunoreactivity patterns after the tissue treatment with kainate agonist, indicating that activation of kainate receptors induce the 5-HT release from 5-HT neurons. The KA-induced effect can be blocked by the presence of the classical non-NMDA receptor antagonist DNQX. Activated NMDA and AMPA receptors do not regulate 5-HT release from chick retina, since alterations in neurotransmitter expression pattern after incubation with these agonists were not observed. In addition, the inhibition of serotonin transporter (SERT) with fluoxetine inhibitor did not influence neurotransmitter stimulated release, suggesting that the release do not occur by transporter reversion. The 5-HT release induced by the activation of kainate receptors probably involved exocytotic mechanisms Ca^{+2} -dependent, for the absence of ion in the medium represented a negative regulatory factor in neurotransmitter stimulated release. The histological pattern of the retinas treated with kainate agonist revealed no changes that could indicate cell damage. Consequently, the notable reduction in 5-HT-immunoreactivity KA-induced is probably due to the neurotransmitter release and not to an eventual 5-HT leakage out of damaged serotonergic cells.

KEY-WORDS: serotonin, kainate, release, retina, chick.

1. INTRODUÇÃO

1.1 RETINA

1.1.1 Organização Morfofuncional da Retina de Vertebrados

A retina constitui uma delgada camada especializada de tecido nervoso contida no interior do globo ocular, que mostra uma organização laminar de seus elementos neurais (Figura 1). Partindo da superfície escleral em direção ao humor vítreo encontra-se a camada formada pelos segmentos externos e internos dos fotorreceptores. Essa camada é separada por processos finos de células gliais da camada nuclear externa (CNE) que contém os corpos celulares dos fotorreceptores, neurônios responsáveis pela transdução do estímulo luminoso em sinal neural. Os terminais sinápticos dos fotorreceptores conectam-se na camada plexiforme externa (CPE) a duas classes de neurônios, as células bipolares e as células horizontais. A camada nuclear interna (CNI) é constituída dos corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas, cuja função principal é o processamento e transferência da informação visual oriunda dos fotorreceptores. Nesta camada encontram-se também os núcleos das células interplexiformes e células de Muller. As células bipolares e células amácrinas estabelecem conexões sinápticas na camada plexiforme interna (CPI) com a próxima classe de neurônios, as células ganglionares, cujos corpos celulares formam a camada de células ganglionares (CCG). Os axônios das células ganglionares constituem a camada de fibras nervosas (CFN), esses axônios formarão o nervo óptico que se projeta hierarquicamente aos centros superiores do cérebro (Ramón y Cajal, 1892).

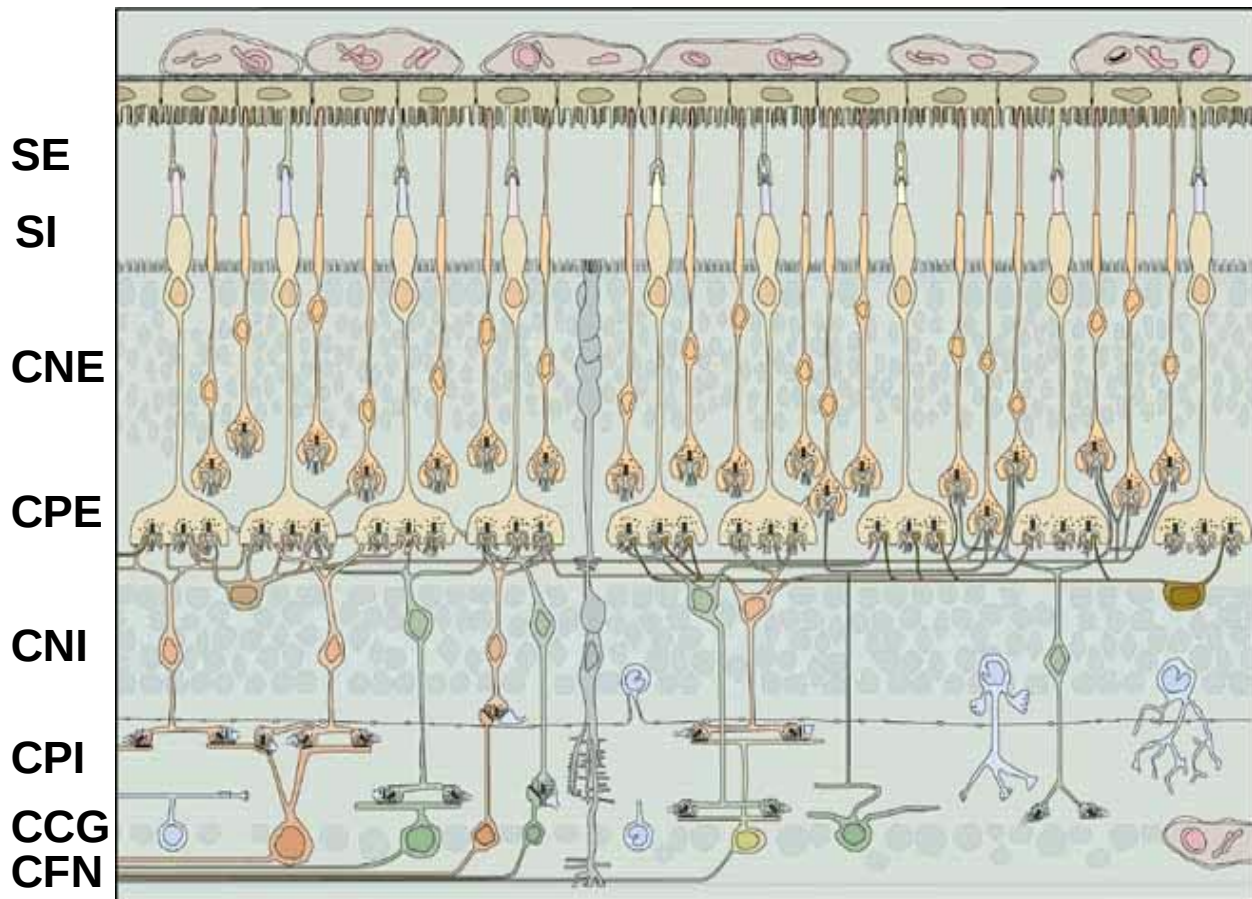


Figura 2. Desenho esquemático da retina mostrando sua estrutura laminar e seus elementos neurais. SE, segmento externo; SI, segmento interno; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CGC, camada de células ganglionares; CFN, camada de fibras nervosas (Modificado de Rodieck, 1998).

Os princípios gerais da função retiniana em vertebrados estão bem estabelecidos (Rodieck, 1998, para revisão). A retina consiste de dois circuitos tonicamente ativos, denominados de circuitos ON e OFF. Mudanças nos níveis de luz consistem de ações recíprocas sobre os dois circuitos, aumentando a atividade de um e diminuindo a atividade de outro (Massey & Redburn, 1987, para revisão).

A dicotomia dos circuitos ON e OFF na retina de vertebrados baseia-se na existência de dois tipos de células bipolares de cone que respondem diferentemente ao neurotransmissor glutamato dos fotorreceptores. As células bipolares-OFF despolarizam em resposta ao glutamato, portanto, são ativadas no escuro, ao passo que as células bipolares-ON hiperpolarizam, conseqüentemente, são inibidas no escuro. A base molecular para essa dicotomia é a expressão diferencial de receptores de glutamato na superfície dessas células. Células bipolares-OFF expressam receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA/KA, ao contrário, células bipolares-ON expressam receptores metabotrópicos do tipo mGluR6 (Wässle & Boycott, 1991, para revisão).

O fluxo da informação visual segue do fotorreceptor para a célula bipolar e, desta, para a célula ganglionar. No entanto, esses canais de sinalização não funcionam isoladamente, visto que a atividade de cada canal é continuamente modulada pela atividade de canais vizinhos. Essa modulação é chamada de centro-periferia antagônica e é determinada pelos referidos circuitos paralelos ON e OFF presentes na retina de vertebrados (Massey & Redburn, 1987, para revisão). No processamento da informação visual, o primeiro local onde ocorre a modulação é na CPE, na qual os fotorreceptores fazem sinapses diretas com

células bipolares formando o centro do campo receptor, ou sinapses indiretas via células horizontais formando a periferia do campo receptor. A estimulação de fotorreceptores no centro do campo receptor de uma célula bipolar é antagonizada pela estimulação de fotorreceptores na periferia do campo receptor, esse efeito antagônico periférico é mediado pelas células horizontais que agem promovendo uma inibição lateral (Saito, 1987). A organização dos campos receptores em centro-periferia antagônica passa das células bipolares para as células ganglionares via conexões laterais das células amácrinas na CPI (Kuffler, 1953).

O padrão de organização morfofuncional da retina de aves é semelhante à de outros vertebrados, no entanto, apesar da semelhança na citoarquitetura, a retina de aves exibe uma grande densidade celular, bem como, uma laminação extremamente intrincada na CPI (Sillman, 1973). A presença de uma especialização anatômica na região ventral da retina, denominada *pecten*, é também outra característica peculiar da retina de aves. A retina de aves é avascular, atribuindo-se ao *pecten*, juntamente com a irrigação da coróide, as funções de nutrição e oxigenação do tecido retiniano (Pearson, 1972).

1.1.2 A Retina como Modelo de Estudo

Na neurofarmacologia, assim como em todas as áreas da biologia experimental, a escolha correta do modelo tecidual é de extrema importância para a eficácia do método. A retina constitui um modelo experimental excelente para se estudar a morfologia, fisiologia e bioquímica de determinados sistemas neuronais por inúmeras razões, entre as quais: a) a facilidade de obtê-la; b) apresenta um padrão de desenvolvimento e organização sináptica semelhante

ao encontrado em outras estruturas centrais; c) exibe uma organização histológica em camadas e subcamadas (Masland, 2001); d) constitui um sistema propício para se estudar a comunicação intercelular como mostram diversos estudos sobre as moléculas envolvidas nas sinapses retinianas (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Wässle & Boycott, 1991, para revisão); e) é um tecido muito utilizado em estudos ontogenéticos e toxicológicos; e, finalmente, f) a resposta de suas células resulta essencialmente de um único estímulo, a luz.

1.1.3 Sistemas de Neurotransmissores na Retina

Na retina de vertebrados, como em todo o sistema nervoso central (SNC), as células se comunicam principalmente através de numerosos neurotransmissores e neuromoduladores. Essencialmente, todos os neurotransmissores identificados no cérebro estão presentes na retina, incluindo, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina, acetilcolina, dopamina, serotonina e diversos neuropeptídeos (Massey & Redburn, 1987, para revisão). Como o presente trabalho privilegia a interação entre os receptores de glutamato e a serotonina em células da retina de pinto, limitaremos nossos comentários a esses sistemas.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de vertebrados (Michaelis, 1998, para revisão; Watkins & Jane, 2006). Na retina, ele é liberado pelos fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares, neurônios diretamente envolvidos no processamento da informação visual ao longo da via vertical (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Thoreson & Witkovsky, 1999). As sinapses glutamatérgicas são mediadas por duas classes

de receptores: os receptores ionotrópicos, formados por canais de cátions não-seletivos controlados por neurotransmissores, e os receptores metabotrópicos, associados via proteínas G a sistemas de segundos mensageiros (Monaghan e cols., 1989, para revisão; Seeburg, 1993; Thoreson & Witkovsky, 1999). Os receptores ionotrópicos, objeto de nosso estudo, foram classificados de acordo com suas características farmacológicas e eletrofisiológicas em três grupos principais: os receptores NMDA, AMPA e KA (Figura 2), que respondem seletivamente aos agonistas exógenos, N-Metil-D-Aspartato, α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato e cainato, respectivamente (Monaghan e cols., 1989, para revisão; Brandstätter e cols., 1998; Lerma e cols., 2001). Os receptores AMPA e KA são coletivamente conhecidos como os receptores não-NMDA e são responsáveis pela maior parte da neurotransmissão excitatória rápida no SNC (Mayer & Westbrook, 1987).

Várias subunidades dos receptores ionotrópicos de glutamato já foram identificadas por estudos de clonagem molecular. O receptor AMPA é formado pelas subunidades GluR1-4, enquanto o receptor KA compreende as subunidades GluR5-7 e KA1-2. O receptor NMDA é composto pelas subunidades NR1, NR2A-D e NR3A-B, outras subunidades são os receptores órfãos delta1/2 (Michaelis, 1998, para revisão; Seeburg, 1993; Bettler & Mulle, 1995, para revisão; Ciabarra e cols., 1995; Sucher e cols., 1995; Nishi e cols., 2001; Sucher e cols., 2003). Os receptores ionotrópicos são extremamente diversos na composição de suas subunidades, o que parece redundar em moléculas receptoras com diferentes condutâncias, amplitudes de corrente, características de dessensibilização e modulação por fosforilação (Mammen e

cols., 1997; Thoreson & Witkovsky, 1999; Swanson e cols., 2002; Jaskolski e cols., 2005, para revisão).

As respostas dos diferentes receptores ionotrópicos de glutamato podem ser distinguidas pela utilização de antagonistas seletivos. Os receptores AMPA são seletivamente bloqueados por antagonistas não-competitivos, tais como, os compostos 2,3-benzodiazepínicos (GYKI 52466 ou GYKI 53655), e por antagonistas competitivos potentes, os compostos CNQX, DNQX e NBQX, os quais, entretanto, em altas concentrações antagonizam também os receptores KA. Concentrações altas de CNQX e DNQX, mas não de NBQX, antagonizam também os receptores NMDA (Thoreson & Witkovsky, 1999). Os receptores NMDA são bloqueados pelos antagonistas não-competitivos MK-801, fenciclidina (PCP) e o anestésico cetamina (Mori & Mishina, 1995; Dingledine & McBain, 1999).

Até algum tempo atrás haviam poucos trabalhos publicados mostrando correntes farmacologicamente isoladas evocadas apenas pelo receptor AMPA, ou pelo receptor KA, todavia, esse problema começa a ser corrigido com a descoberta de antagonistas seletivos para esses receptores (Tarnawa e cols., 1993; Paternain e cols., 1995).

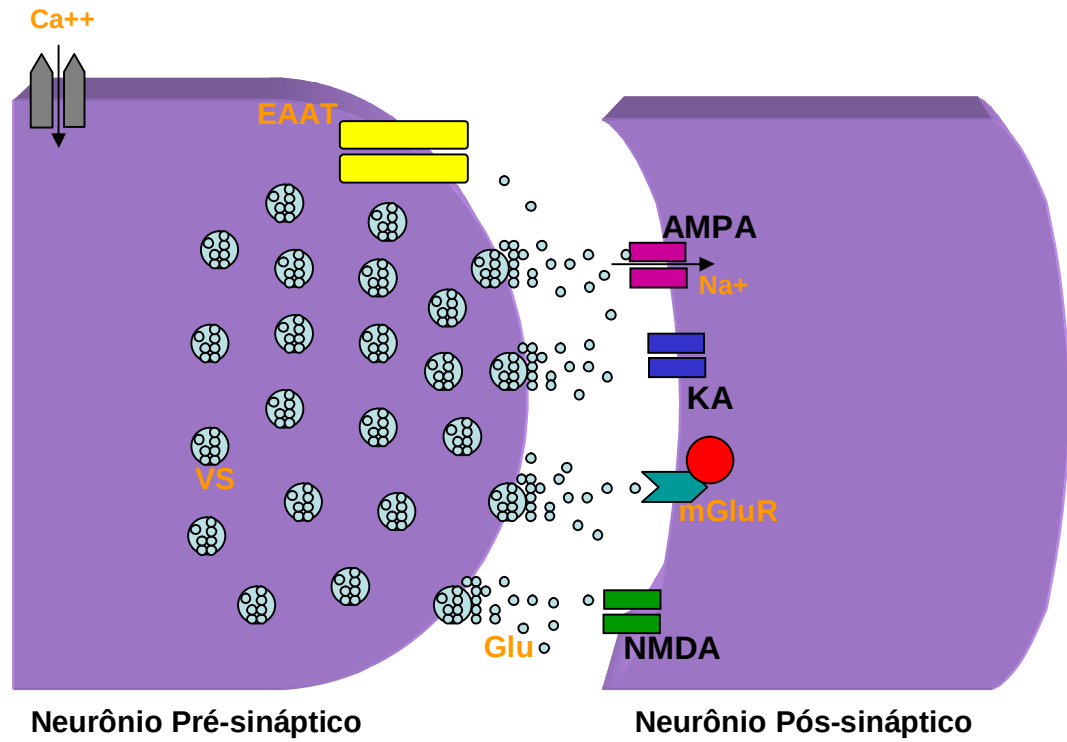


Figura 3. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica ilustrando as três diferentes classes de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA, KA e NMDA). Glu, glutamato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; EAAT, transportador de aminoácido excitatório; VS, vesícula sináptica.

1.1.4 Receptores Ionotrópicos de Glutamato na Retina

Vários estudos de hibridização *in situ* e imunomarcação têm permitido determinar os níveis de expressão e os padrões de distribuição das diferentes subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato na retina de várias classes de vertebrados, inclusive em aves (Hamassaki-Britto e cols., 1993; Peng e cols., 1995; Brandstätter e cols., 1997; Bredariol & Hamassaki-Britto, 2001; Hack e cols., 2002).

Hamassaki-Britto e cols. (1993) mostraram em estudos de hibridização *in situ* que todas as subunidades clonadas dos receptores AMPA (GluR1-4) e KA (GluR5-7) são expressas por células horizontais, bipolares, amácrinas e ganglionares nas retinas de gato e rato. Entretanto, várias dessas subunidades parecem ter um padrão de expressão limitado, indicando sua localização em determinado subgrupo de neurônios da retina.

Peng e cols. (1995), utilizando técnica imunocitoquímica localizaram em células horizontais, amácrinas, ganglionares, e possivelmente em células bipolares da retina de rato, as subunidades GluR6/7 dos receptores KA, dados consistentes com aqueles mostrados pelos estudos de hibridização *in situ* (Hamassaki-Britto e cols., 1993).

Estudos de imunomarcação permitiram identificar que as subunidades GluR6/7 e KA2 dos receptores KA estavam presentes nas duas camadas plexiformes da retina de rato. Na CPI, as diferentes subunidades estavam localizadas nos processos de células amácrinas e ganglionares, pós-sinapticamente as células bipolares de cones e de bastonetes (Brandstätter e cols., 1997).

Hack e cols. (2002), examinaram por imunohistoquímica o padrão de distribuição das subunidades GluR1-4 dos receptores AMPA, GluR6/7 e KA2 dos receptores KA, e das subunidades delta1/2 dos receptores ionotrópicos de glutamato durante o desenvolvimento pós-natal da retina de rato. As várias subunidades são expressas cedo no período pós-natal e a maior parte delas, com exceção da delta1/2, são encontradas em ambas as camadas sinápticas da retina, sugerindo o envolvimento dos receptores ionotrópicos de glutamato nos processos de maturação sináptica e formação de circuitarias nas camadas plexiformes em desenvolvimento.

Estudos por marcação imunohistoquímica dos receptores ionotrópicos de glutamato na retina de pinto em vários estágios do desenvolvimento embrionário (E5 a E18) e pós-natal (P1), indicaram que todas as subunidades testadas, GluR1, GluR2/3, GluR4 (AMPA); GluR5-7 (KA); e NR1 (NMDA), são expressas por células da CNI e da CCG, com padrões de distribuição característicos nos estágios inicial e tardio da embriogênese (Bredariol & Hamassaki-Britto, 2001). As autoras reportam que especialmente em P1 as células amácrinas mostraram uma maior densidade de subunidades dos receptores AMPA/KA em relação à subunidade NR1 do receptor NMDA, esta última presente em grande parte nas células da CCG. Nesse estudo foi também evidenciado que todas as subunidades dos receptores AMPA/KA e NMDA parecem ser mais expressas durante o desenvolvimento embrionário do que no período pós-natal, sugerindo que esses receptores podem exercer papéis importantes no desenvolvimento da retina.

1.2 SEROTONINA

1.2.1 Serotonina no Sistema Nervoso Central

A serotonina também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina encontrada em alguns tipos celulares, inclusive em neurônios. No SNC, a 5-HT atua tanto como neurotransmissor quanto neuromodulador (Sur e cols., 1996). A neurotransmissão serotoninérgica influencia muitas funções cerebrais, entre as quais, emoção, cognição, movimento, dor, assim como funções circadianas e neuroendócrinas, incluindo, alimentação, sono e reprodução (Sur e cols., 1996; Mössner e cols., 2000).

A síntese da 5-HT envolve a hidroxilação enzimática do anel benzeno do triptofano para formar 5-hidroxitriptofano (5-HTP), em uma reação catalisada pela enzima triptofano hidroxilase (TrOH), cuja inibição promove uma diminuição acentuada no conteúdo de 5-HT no SNC. O passo metabólico subsequente na síntese de 5-HT envolve a descarboxilação do 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC), formando 5-HT (Cooper e cols., 1991).

No final da década de 70, dois avanços simultâneos estimularam o interesse no estudo da 5-HT no SNC: 1) A localização *in situ* de 5-HT através de uma reação histoquímica, atualmente denominada técnica de Falck-Hillarp, que já foi suplantada por uma técnica mais sensível, a imunohistoquímica (Brunken e cols., 1993, para revisão); e 2) A identificação a nível molecular de múltiplos receptores de 5-HT (Peroutka & Synder, 1979; Peroutka & Synder, 1981). Esses avanços tornaram possível o estudo atual do sítio de síntese e liberação de 5-HT, bem como seu provável modo de ação.

Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos encontram-se principalmente em um grupo de núcleos da formação reticular do tronco cerebral, situado próximo à linha média do bulbo, ponte e mesencéfalo – os núcleos da rafe (Steinbusch, 1981; Frazer & Hensler, 1999). Em 1964, Dahlstrom e Fuxe classificaram esses núcleos em grupos (B₁-B₉) baseados, particularmente, na estrutura anatômica correspondente (Tabela 1) (Cooper e cols., 1991; Frazer & Hensler, 1999).

Tabela 1. Classificação de grupos de corpos celulares serotoninérgicos segundo Dahlstrom e Fuxe baseada na estrutura anatômica correspondente (Fonte: Frazer & Hensler, 1999).

Núcleos de neurônios contendo 5-HT	Estrutura anatômica
B ₁	Núcleo pálido da rafe, bulbo ventrolateral caudal
B ₂	Núcleo obscuro da rafe
B ₃	Núcleo magno da rafe, bulbo ventrolateral rostral
B ₄	Núcleo obscuro da rafe, parte dorsolateral
B ₅	Núcleo mediano da rafe, parte caudal
B ₆	Núcleo dorsal da rafe, parte caudal
B ₇	Núcleo dorsal da rafe, parte rostral
B ₈	Núcleo mediano da rafe, parte rostral principal
B ₉	Núcleo pontino oralis, região supramedular

1.2.2 Transportador de Serotonina

Existem múltiplos subtipos de receptores pré e pós-sinápticos de 5-HT mediando as complexas ações da neurotransmissão serotoninérgica, no entanto, a remoção de 5-HT da fenda sináptica é regulada por uma única proteína, o transportador de serotonina (SERT) (Blakely e cols., 1991; Ramamoorthy & Blakely, 1999; Mössner e cols., 2000). Esses transportadores presentes nas membranas dos terminais nervosos e corpos celulares de

neurônios 5-HT desempenham um papel importante no controle da neurotransmissão serotoninérgica por determinar a magnitude e a duração das respostas serotoninérgicas (Mössner e cols., 2000). Os SERTs regulam os níveis sinápticos e extrasinápticos de 5-HT por fornecer um eficiente mecanismo de recaptação que conduz a 5-HT de volta aos terminais sinápticos, terminando assim sua ação (Vicentic e cols., 1999; Kubota e cols., 2001).

O modelo atual do mecanismo de recaptação de 5-HT pelo SERT envolve um co-transporte de Na^+ , Cl^- e 5-HT protonada ligados ao transportador na porção extracelular antes da translocação, formando um complexo quaternário, que subsequente sofre uma alteração conformacional para liberar o neurotransmissor e os íons no interior do citoplasma (Sur e cols., 1996). No citoplasma, um K^+ associa-se com o SERT para promover a reorientação do transportador descarregado para outro ciclo de transporte (Figura 3A) (Frazer & Hensler, 1999).

Estudos de clonagem molecular dos transportadores de 5-HT de ratos e humanos têm estabelecido a estrutura primária dessa proteína transmembrana e mostrado ser ela membro de uma grande superfamília de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+ e Cl^- (Hoffman e cols., 1991; Worrall e cols., 1994; Kubota e cols., 2001). A estrutura do SERT mostra 12 domínios transmembrana (TMDs), com ambos os terminais carboxil e amino localizados na região intracelular, uma grande alça extracelular contendo sítios de glicosilação conectando os TMDs 3 e 4 (Kubota e cols., 2001; Nestler e cols., 2001). O SERT exibe cerca de 50% de homologia absoluta com os transportadores de norepinefrina (NET) e dopamina (DAT), com a maior

homologia presente nos TMDs 1 e 2, e nos TMDs de 4-8. As regiões menos conservadas são as caudas carboxil e amino terminais na porção intracelular (Figura 3B) (Frazer & Hensler, 1999).

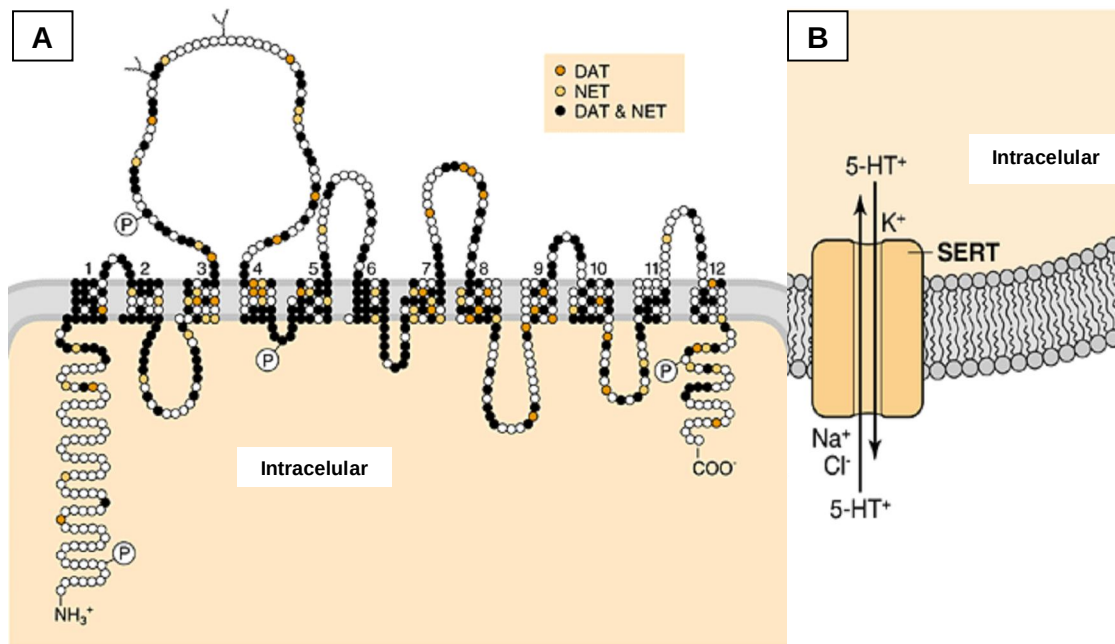


Figura 4. (A) Modelo bidimensional do transportador de serotonina (SERT) da membrana neuronal de rato mostrando a homologia com os transportadores de norepinefrina (NET), dopamina (DAT) ou ambos. (B) Representação esquemática do mecanismo de recaptação de 5-HT pelo SERT envolvendo um co-transporte de Na^+ , Cl^- e 5-HT protonada ligados ao transportador na porção extracelular antes da translocação (Fonte: Frazer & Hensler, 1999).

1.2.3 Serotonina na Retina

A 5-HT tem sido detectada na retina de várias espécies, entretanto, seus níveis diferem entre elas. Na maioria dos vertebrados não-mamíferos existem níveis detectáveis de 5-HT (Parkinson & Rando, 1981; Osborne e cols., 1982; Millar e cols., 1988; Marc e cols., 1988; Wilhelm e cols., 1993), no entanto, a existência de 5-HT na retina de vertebrados mamíferos está menos caracterizada, possivelmente em razão da concentração relativamente baixa de 5-HT endógena nessas retinas que permita sua detecção histológica (Osborne e cols., 1982).

Estudos em diferentes espécies de vertebrados demonstram que a maioria das retinas contém pelo menos uma classe de células amácrinas serotoninérgicas. Essas células são geralmente esparsas, porém mostram extensas ramificações na CPI (Ehinger, 1982; Brunken e cols., 1993, para revisão). Dados ultra-estruturais evidenciam que as células amácrinas serotoninérgicas são células amácrinas inter-amácrinas (Marc e cols., 1988; Watt & Wilson, 1990).

Parkinson & Rando (1981) constataram através de testes cromatográficos e eletroquímicos que a 5-HT é sintetizada e armazenada na retina de pinto. Para legitimar o papel da 5-HT como um neurotransmissor na retina dessa espécie, eles demonstraram que sob o estímulo da luz o *turnover* dos estoques de 5-HT na retina é alterado.

Osborne (1982) relata uma subpopulação de células amácrinas na retina de pinto contendo 5-HT e apresentando um sistema de captação de alta afinidade. A morfologia desses neurônios é diferente daquelas amácrinas que acumulam GABA, norepinefrina, dopamina, glicina e substância P. A 5-HT

acumulada nos neurônios serotoninérgicos pode ser liberada por concentrações despolarizantes de K^+ no meio de maneira dependente de Ca^{+2} . O autor conclui afirmando que seus resultados ratificam um papel para 5-HT como um neurotransmissor na retina de pinto.

Utilizando a histofluorescência e imunohistoquímica, Millar e cols. (1988) revelaram que a 5-HT parece ser um bom candidato a neurotransmissor em algumas células amácrinas e bipolares na retina de galinha. As células amácrinas continham 5-HT endógena, entretanto, não asseguram o mesmo para as células bipolares. Eles observaram ainda uma população esparsa de grandes células, e um grupo mais comum de pequenas células na CCG, que poderiam ser também serotoninérgicas.

Wilhelm e cols. (1993) localizaram células contendo 5-HT na retina de teleósteos, anfíbios, répteis, aves e de alguns mamíferos, contudo, os autores não puderam confirmar se esses neurônios contendo 5-HT na retina de mamíferos são capazes de sintetizá-la. Em aves, no entanto, foi possível constatar que todas as células amácrinas que acumulam 5-HT são capazes de sintetizá-la, porém, nenhuma das células bipolares mostrou imunorreatividade para a enzima TrOH, o que sugere um papel para 5-HT nessas células de neuromodulador ou co-transmissor.

Ríos e cols. (1997) descrevem o padrão morfológico de desenvolvimento e diferenciação de células amácrinas serotoninérgicas na retina de pinto de 12 dias de desenvolvimento embrionário ao 7º dia pós-natal. Essas células foram observadas na CNI com seus dendritos irradiando-se dentro da CPI. Células bipolares serotoninérgicas foram também descritas em pinto P1 na CNI, porém elas eram fracamente imunorreativas, provavelmente, constituindo um

subgrupo de células bipolares que acumulam 5-HT da fenda sináptica, e não “verdadeiros” neurônios serotoninérgicos.

O papel fisiológico da 5-HT na retina parece ser muito complexo, de modo que se deve evitar fazer qualquer generalização funcional. A resposta fisiológica a 5-HT reflete basicamente a natureza dos seus receptores. É provável que a complexidade funcional da 5-HT na retina resulte também de sua distribuição distinta nos diversos tipos celulares, bem como na definição ainda pouco conhecida das interações sinápticas entre as células que contém 5-HT.

Foi demonstrado que além de seu papel como neurotransmissor na retina de *Xenopus laevis*, a 5-HT é também um substrato para a 5-HT *N*-acetiltransferase, enzima que participa da via de síntese do neurohormônio melatonina. O conteúdo de 5-HT na retina mostrou ser um fator limitante na síntese de melatonina (Cahill & Besharse, 1990).

Lima & Urbina (1998) afirmam que a 5-HT envolvida na síntese de melatonina na retina de diversas espécies possivelmente é liberada por fibras serotoninérgicas centrífugas originadas dos núcleos da rafe e área pré-óptica. De fato, lesões dos núcleos da rafe reduzem grandemente o conteúdo de 5-HT na retina (Villar e cols., 1987). Entretanto, experimentos bioquímicos e moleculares em retinas de ratos adultos, visando identificar a origem da 5-HT como substância precursora de melatonina, possibilitaram demonstrar a contribuição da síntese local de 5-HT para formação de melatonina (Chanut e cols., 2002). No entanto, como em vários outros estudos realizados em retinas de mamíferos, não foi possível identificar a enzima TrOH por

imunohistoquímica. É provável que isso ocorra devido o nível da enzima se encontrar abaixo do limite detectável pelo método.

Thomas e cols. (1993) utilizando ácido caínico para destruir as células bipolares e amácrinas imunorreativas a 5-HT na retina interna de galinha, determinaram que praticamente toda a atividade circadiana da enzima TrOH e a síntese de melatonina ocorrem em outras células que não as células bipolares e amácrinas. Estudos semelhantes realizados por Chong e cols. (1998) na retina de galinha mostraram alto nível rítmico de RNAm da enzima TrOH após o tratamento com ácido caínico, indicando que provavelmente a fonte primária da mensagem rítmica são os fotorreceptores sintetizando melatonina.

Em seus estudos Chong e cols. (1998) verificaram que o RNAm da enzima TrOH era intensamente expresso na camada de fotorreceptores, na porção vítrea da CNI, e em menor extensão na CCG. O RNAm da TrOH na retina do animal apresentava um ritmo circadiano, que poderia ser simultaneamente alterado por mudança no ciclo claro-escuro. Em experimentos paralelos na glândula pineal, eles encontraram um padrão similar de expressão, no entanto, enquanto um pulso de luz durante a noite suprimia em 25% o RNAm da TrOH da retina, na pineal não ocorria nenhuma alteração, sugerindo que existem diferenças específicas entre esses tecidos quanto à regulação pela luz. Todas essas observações constituíram a primeira evidência de que o RNAm da enzima TrOH na retina de galinha está sob o controle de um relógio circadiano.

1.3 REGULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NEUROATIVAS NA RETINA MEDIADA POR RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES

Estudos sobre a regulação da liberação de neurotransmissores na retina de várias espécies (Moran & Pasantes-Morales, 1983; Weiler & Schütte, 1985a; Do Nascimento & De Mello, 1985; Do Nascimento e cols., 1998; Andrade da Costa e cols., 2000; Calaza e cols., 2001; Andrade da Costa e cols., 2001), permitem verificar a existência de inúmeras interações entre os diferentes sistemas de neurotransmissores presentes nas células visuais e essas interações certamente influenciam as funções sinápticas das células envolvidas.

Moran & Pasantes-Morales (1983) investigaram os efeitos de aminoácidos excitatórios e seus agonistas e antagonistas sobre a liberação de neurotransmissores na retina de pinto. O glutamato (0.5 - 2 mM) aumentou a liberação de [^3H]GABA em mais de 4 vezes, enquanto o aumento sobre a liberação de [^{14}C]glicina foi em torno de 2 vezes. A presença do antagonista de receptor de glutamato diminuiu a liberação estimulada de [^3H]GABA em torno de 50% e da [^{14}C]glicina em 95%. O cainato (10 μM) induziu a liberação de glicina, mas não de GABA. A liberação de GABA pelos aminoácidos excitatórios e agonistas era independente de Ca^{+2} , mas dependente de Na^{+} , enquanto a liberação de glicina era acentuadamente dependente de Ca^{+2} .

Dados consistentes sobre a regulação do transporte de GABA em células cultivadas da retina de pinto apontam para um modelo de liberação do neurotransmissor GABA por permuta com o L-glutamato externo, através de um mecanismo carreador de alta afinidade e dependente de Na^{+} . Desde que GABA e glutamato sabidamente exercem efeitos antagonistas, os autores

especulam o significado funcional desse transporte como de um controle fino sobre a excitabilidade de microrregiões da retina em que esses neurotransmissores são utilizados (Do Nascimento & De Mello, 1985).

Do Nascimento e cols. (1998) mostraram que a ativação de receptores ionotrópicos de glutamato induzia a liberação de GABA em células cultivadas da retina de embriões de galinha. Essa liberação estimulada do neurotransmissor GABA era inibida pela dopamina, mas apenas quando o receptor de glutamato ativado era do tipo NMDA. Os autores consideraram essa inibição pela dopamina como atípica, já que antagonistas conhecidos dos principais receptores dopaminérgicos (D_1 - D_5) não bloquearam o efeito inibitório de dopamina sobre a liberação induzida do neurotransmissor GABA. É possível que o neurotransmissor dopamina exerça seu efeito inibitório direto sobre algum sítio alostérico do receptor de NMDA.

Calaza e cols. (2001) verificaram que o glutamato e seus agonistas promovem a liberação de GABA de retina isolada e de células retinianas cultivadas. Retinas de embriões de galinha de 2 a 7 dias de desenvolvimento foram estimuladas com diferentes agonistas glutamatérgicos e a marcação de células positivas para GABA foi detectada no tecido por imunohistoquímica. A exposição das retinas a 100 μ M de NMDA por 30 minutos resultou numa redução de 50% no número de células amácrinas imunorreativas a GABA, enquanto, o tratamento com cainato na mesma concentração, promoveu uma redução de 50% no número de células amácrinas e horizontais imunorreativas a GABA.

Weiler & Schütte (1985a) utilizaram a imunofluorescência para quantificar a 5-HT em células bipolares-OFF da retina de tartaruga. Eles

observaram que a incubação em solução de Ringer Locke contendo 5-HT e pargilina, um inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO), aumentava a imunofluorescência que era subsequente reduzida pela incubação em Ringer Locke com altas concentrações de K^+ de uma maneira dependente de Ca^{+2} . Os autores relatam também que se essas retinas pré-carregadas fossem expostas a 10 μM de cainato, a imunofluorescência diminuía de maneira dependente do tempo. Para os autores esses dados reforçam a idéia da 5-HT como um transmissor nas células bipolares-OFF da retina de tartaruga.

Estudos bioquímicos e morfológicos indicam que a 5-HT presente em uma população específica de células amácrinas nas retinas de muitos vertebrados não-mamíferos funciona como um neurotransmissor convencional (Parkinson & Rando, 1981; Osborne, 1982; Millar e cols., 1988; Wilhelm e cols., 1993, Ríos e cols., 1997). Na retina de vertebrados mamíferos já foram identificados os componentes moleculares de um sistema serotoninérgico funcional (Mitchell & Redburn, 1985), no entanto, o conteúdo de 5-HT nessas retinas é relativamente baixo, o que dificulta sua detecção por técnicas de imunomarcacão (Osborne e cols., 1982).

A retina de pinto apresenta altos níveis de 5-HT e sua imunorreatividade pode ser localizada em células amácrinas e células bipolares (Wilhelm e cols., 1993; George e cols., 2005). A 5-HT presente em uma população específica de células amácrinas na retina de aves provavelmente está envolvida com o processo de inibição lateral (Brunken e cols., 1993, para revisão). Enquanto a 5-HT acumulada em células bipolares e outras células amácrinas que não exibem imunorreatividade a enzima TrOH, parece funcionar como um neuromodulador (Wilhelm e cols., 1993).

Nos inúmeros trabalhos sobre o sistema visual é bem estabelecido que o glutamato constitui o neurotransmissor primário dos fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares da retina de vertebrados (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Michaelis, 1998, para revisão; Thoreson & Witkovsky, 1999). A interação do glutamato com outros sistemas de neurotransmissores na retina é extensivamente descrita na literatura (Tapia & Arias, 1982; Moran & Pasantes-Morales, 1983; Do Nascimento & De Mello, 1985; Duarte e cols., 1993; Do Nascimento e cols., 1998; Andrade da Costa e cols., 2000; Calaza e cols., 2001; Andrade da Costa e cols., 2001).

Com base nesses estudos resolvemos inicialmente investigar *in vitro* a existência de prováveis interações entre dois sistemas de neurotransmissores presentes na retina de aves: o glutamato e a 5-HT (Passos, 2003). A contribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato na regulação da liberação de substâncias neuroativas na retina de aves vem sendo demonstrada nas últimas décadas (Tapia & Arias, 1982; Do Nascimento e cols., 1998; Calaza e cols., 2001). A possibilidade da liberação de 5-HT nas células visuais da retina de pinto ser modulada pela ativação de receptores ionotrópicos de glutamato motivou o referido trabalho (Passos, 2003), através do qual demonstramos que a ativação de receptores específicos de glutamato, os receptores do tipo cainato, afeta a liberação de 5-HT em culturas celulares de retina embrionária (ANEXO - Figura A).

Vários trabalhos indicam que a liberação de neurotransmissores das células nervosas é mediada predominantemente por mecanismos exocitóticos dependentes de Ca^{+2} (Katz & Miledi, 1970; Osborne, 1982). No entanto, estudos subseqüentes em células cultivadas de retina de pinto reportam

mecanismos de liberação de GABA que envolvem reversão da proteína transportadora (Tapia & Arias, 1982; Duarte e cols., 1993), bem como heterotroca de GABA por glutamato, através de um transportador de alta afinidade (Do Nascimento & De Mello, 1985). Esses mecanismos se caracterizam particularmente como independentes de Ca^{+2} e dependentes de Na^{+} .

Baseado nesses dados partiu-se para analisar os prováveis mecanismos envolvidos na regulação da liberação de 5-HT induzida por receptores glutamatérgicos em células cultivadas da retina de embriões de galinha (Passos, 2003). O estudo analisou o papel do transportador de serotonina (SERT) na liberação estimulada de 5-HT, utilizando como ferramenta metodológica o bloqueio da funcionalidade da proteína por um agente específico, a fluoxetina. Nossos resultados demonstraram que a liberação de 5-HT na retina parece envolver mecanismos excitatórios dependentes de Ca^{+2} , pois o bloqueio do transportador de 5-HT com o inibidor fluoxetina não alterou a liberação estimulada do neurotransmissor, sugerindo que essa liberação não ocorre por reversão do transportador (ANEXO - Figura B).

Precisávamos agora obter evidências morfológicas que ratificassem esses dados bioquímicos. Assim, no presente trabalho partimos para analisar através de técnica imunohistoquímica no tecido retiniano intacto de pinto (P1) a liberação de 5-HT induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos. O estudo permitiu evidenciar alterações no padrão de imunorreatividade das células a 5-HT após a estimulação farmacológica com determinados agonistas e antagonistas de glutamato, bem como identificar alguns dos prováveis mecanismos envolvidos no processo de liberação de 5-HT na retina de pinto,

corroborando os resultados bioquímicos anteriormente apresentados (Passos, 2003).

1.4 OBJETIVOS

GERAL

- Investigar a regulação da liberação de serotonina por receptores glutamatérgicos em células da retina de pinto.

ESPECÍFICOS

- Identificar as populações de células imunorreativas ao anticorpo contra serotonina no tecido retiniano intacto;
- Determinar alterações no padrão de imunorreatividade ao anticorpo contra serotonina no tecido retiniano tratado com diferentes moduladores glutamatérgicos;
- Verificar o papel do transportador de serotonina (SERT) na liberação estimulada do neurotransmissor;
- Analisar o papel dos íons cálcio na regulação da liberação de serotonina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados no estudo 30 pintos pós-eclosão com um dia de idade (P1) da espécie *Gallus domesticus*, procedentes de uma granja local. Os pintos P1 foram anestesiados com injeção de vertanarcol (König) na dose de 30 mg / 100 g e Rompun (Bayer) na dose de 2 mg / 100 g via intraperitoneal, seguindo-se, imediatamente, a decapitação e a enucleação ocular. A fim de evitar possíveis interferências circadianas nas análises, os animais eram sacrificados no mesmo período do dia.

2.2 PROCESSAMENTO PARA IMUNOHISTOQUÍMICA DAS RETINAS TRATADAS E NÃO TRATADAS

2.2.1 Enucleação e Dissecção

Após a decapitação dos animais, os olhos eram cuidadosamente removidos das órbitas pelo desprendimento completo dos nervos ópticos. A separação entre a câmara anterior e posterior ocorria através de uma secção no nível da transição esclerocorneal, permitindo a retirada do cristalino e do humor vítreo. Com a utilização de instrumentais adequados, a retina era cuidadosamente dissecada, e dois fragmentos eram obtidos ao longo do eixo superior-inferior de uma mesma retina. Na obtenção destes fragmentos elegemos a retina central de modo a reduzir possíveis diferenças ao longo das excentricidades horizontais e verticais. Os fragmentos centrais de retina dos animais P1 eram escolhidos como controle ou como um determinado grupo experimental aleatoriamente (Figura 4).

ENUCLEAÇÃO E DISSECÇÃO

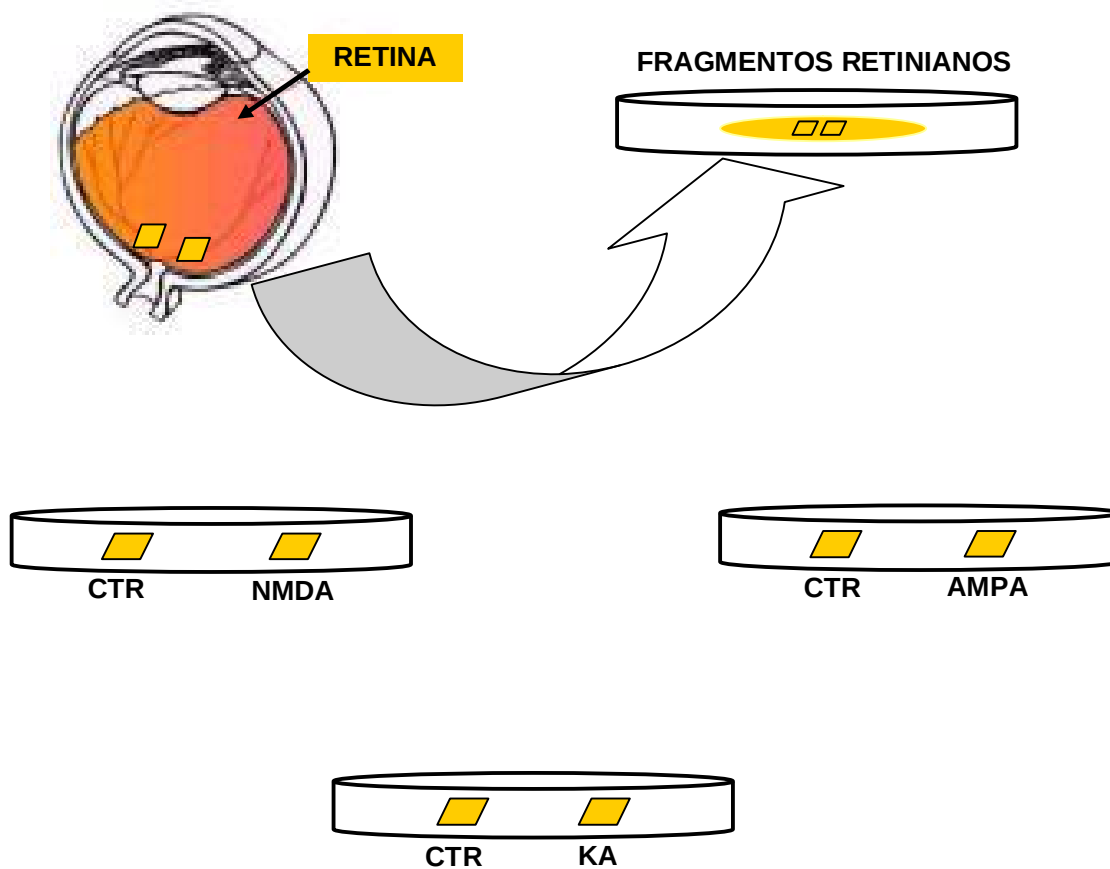


Figura 5. Desenho experimental ilustrando a disseção da retina e a obtenção de dois fragmentos centrais do tecido, eleitos aleatoriamente como grupo controle ou determinado grupo experimental: NMDA (100 μM) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μM) e cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM).

2.2.2 Incubação e Fixação

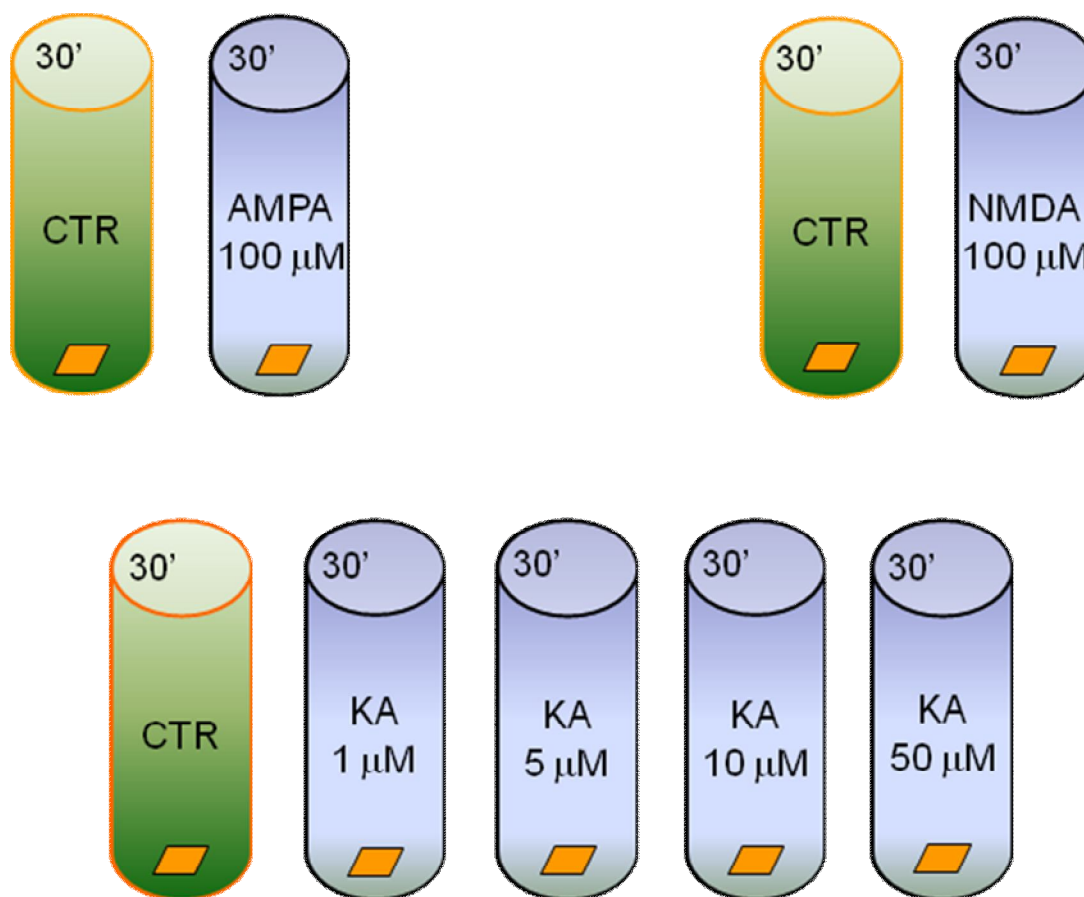
Os fragmentos de retina do grupo controle e experimental eram imersos, respectivamente, em solução de Ringer Locke somente, ou contendo um dos agonistas glutamatérgicos testados: NMDA (100 μ M) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μ M) e cainato (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) (Figura 5). Foi também considerado grupo controle, todos os fragmentos de retina que não sofreram qualquer tratamento.

Os fragmentos eram incubados a 37° C sob atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de ar por 30 minutos. A solução de Ringer Locke continha a seguinte composição: KCl 5,6 mM, NaCl 147,8 mM, $NaHCO_3$ 3,6 mM, HEPES 5,0 mM, glicose 5,6 mM e $CaCl_2$ 2,3 mM. A osmolalidade era sempre aferida utilizando somente soluções isosmóticas ao tecido, entre 300 - 315 mOsM. O pH foi verificado e ajustado para 7,2 - 7,4 com solução de NaOH 1 N. A incubação do tecido iniciava sempre no período 11:30h – 13:30h de modo a evitar alterações circadianas nas análises subseqüentes, especialmente no caso da análise do efeito sobre a 5-HT, que reconhecidamente tem sua concentração intra-retiniana alterada ao longo do dia (Chanut e cols., 2002).

Resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que determinados receptores de glutamato ativados induzem a liberação de 5-HT em células cultivadas da retina de embriões de galinha (secção 1.3 da Introdução). A utilização do presente desenho experimental no tecido retiniano intacto, permitiu analisar os efeitos da adição de determinados moduladores glutamatérgicos sobre o mecanismo envolvido no processo liberação da 5-HT na retina de pinto.

INCUBAÇÃO E FIXAÇÃO

INCUBAÇÃO - AGONISTAS GLUTAMATÉRGICOS



FIXAÇÃO – PA 4% 2h

TEMPERATURA 37° C
ESTUFA DE CO₂

Figura 6. Desenho experimental ilustrando a incubação dos fragmentos de retina somente em solução de Ringer Locke ou contendo um dos agonistas glutamatérgicos testados: NMDA (100 μM) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μM) e cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM), seguindo-se a fixação do tecido em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 2 horas.

Procurando avaliar criteriosamente o efeito do agonista cainato sobre a liberação de 5-HT, os fragmentos retinianos eram pré-incubados durante 20 minutos com o antagonista DNQX (100 μ M) (Figura 6). Em seguida, esses eram incubados com cainato (5 μ M e 10 μ M), ainda na presença do antagonista utilizado no pré-tratamento (VER ESQUEMA DO EXPERIMENTO).

ESQUEMA DO EXPERIMENTO

	PRÉ-INCUBAÇÃO (20')		INCUBAÇÃO (30')	
GRUPOS	CTR	KA	CTR	KA
SOLUÇÃO	Ringer	Ringer+DNQX	Ringer	Ringer+DNQX+KA

Investigamos também o papel do transportador de serotonina (SERT) na liberação estimulada do neurotransmissor através da pré-incubação do tecido com o bloqueador fluoxetina (10 μ M) durante 20' (Figura 7). A seguir tratamos o tecido com o agonista cainato (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M), ainda na presença da fluoxetina (VER ESQUEMA DO EXPERIMENTO).

ESQUEMA DO EXPERIMENTO

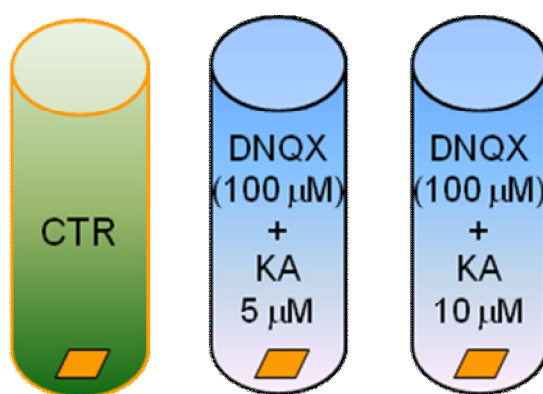
	PRÉ-INCUBAÇÃO (20')		INCUBAÇÃO (30')	
GRUPOS	CTR	KA	CTR	KA
SOLUÇÃO	Ringer	Ringer+Fluoxetina	Ringer	Ringer+Fluox.+KA

O papel dos íons Ca^{+2} na regulação da liberação de 5-HT foi adicionalmente analisado pela incubação da retina durante 30' em solução de Ringer Locke sem Ca^{+2} na presença do agonista cainato (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M). O controle experimental foi realizado em tampão de Ringer Locke com íons Ca^{+2} (Figura 8).

INCUBAÇÃO E FIXAÇÃO

PRÉ-INCUBAÇÃO (20') – ANTAGONISTA DE GLUTAMATO (DNQX)

INCUBAÇÃO (30') – AGONISTA DE GLUTAMATO (CAINATO)



FIXAÇÃO – PA 4% 2h

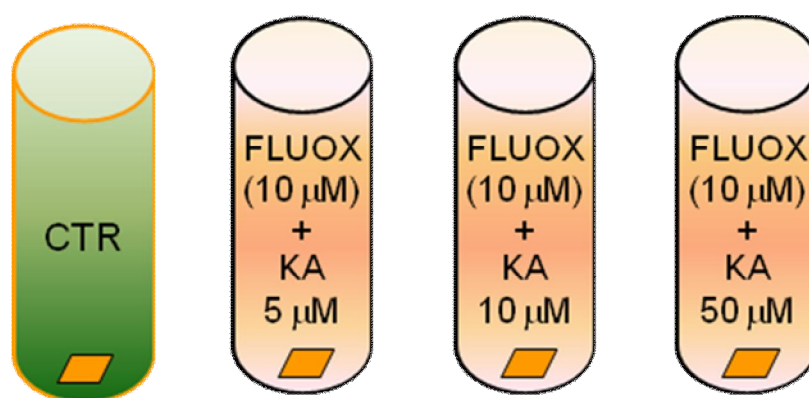
TEMPERATURA 37° C
ESTUFA DE CO₂

Figura 7. Desenho experimental ilustrando o pré-tratamento dos fragmentos de retina com o antagonista DNQX (100 μM), seguindo-se o tratamento com o agonista cainato (5 μM e 10 μM). O tecido foi posteriormente fixado em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 2 horas.

INCUBAÇÃO E FIXAÇÃO

PRÉ-INCUBAÇÃO (20') – BLOQUEADOR DO SERT (FLUOXETINA)

INCUBAÇÃO (30') – AGONISTA DE GLUTAMATO (CAINATO)



FIXAÇÃO – PA 4% 2h

TEMPERATURA 37° C
ESTUFA DE CO₂

Figura 8. Desenho experimental ilustrando o pré-tratamento dos fragmentos de retina com o bloqueador fluoxetina (10 μ M), seguindo-se a adição do agonista cainato (5 μ M e 10 μ M). O tecido foi posteriormente fixado em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 2 horas.

INCUBAÇÃO E FIXAÇÃO

GRUPO CONTROLE – RINGER LOCKE COM Ca^{+2} e AGONISTA (30')

GRUPO EXPERIMENTAL – RINGER LOCKE SEM Ca^{+2} e AGONISTA (30')

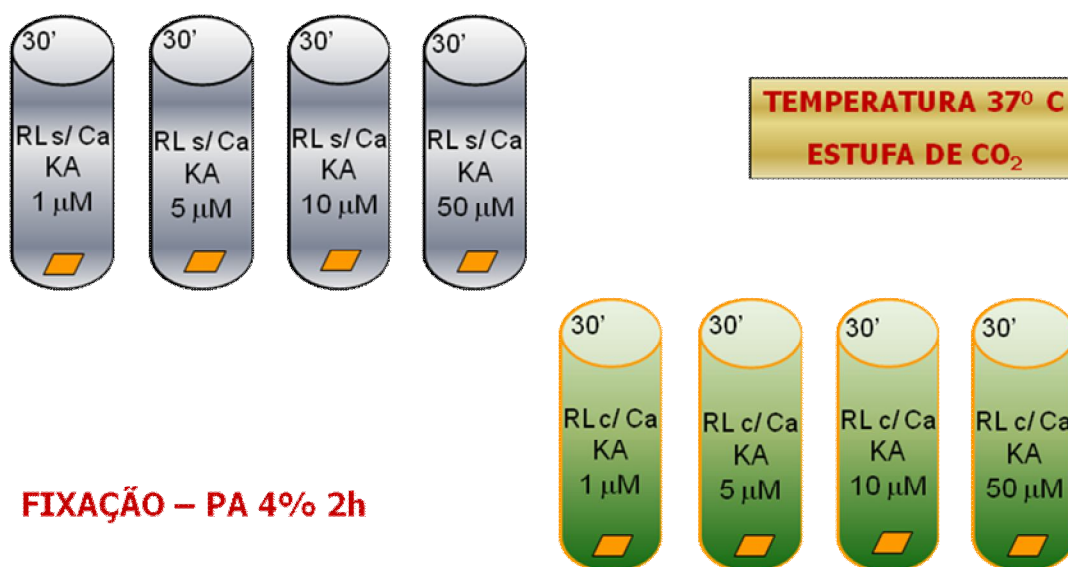


Figura 9. Desenho experimental ilustrando a incubação dos fragmentos de retina em solução de Ringer Locke sem Ca^{+2} na presença do agonista cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM). Controle experimental realizado em tampão de Ringer Locke com íons Ca^{+2} , seguindo-se a fixação do tecido em paraformaldeído a 4% (PA 4%) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 2 horas.

Após o período de incubação com todas as drogas testadas, os fragmentos de retina eram imersos em solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PA 4%) diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 2 horas. A seguir, o tecido era lavado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes, como preparação para as etapas posteriores. Utilizamos como referência para o protocolo apresentado, o trabalho de Calaza e cols. (2001).

2.2.3 Crioproteção e Corte

Para a obtenção dos cortes, os fragmentos de retina eram previamente imersos, por um período variável, em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) diluída em tampão fosfato 0,1 M, visando sua crioproteção. Após 24 horas em solução de sacarose 30%, os fragmentos eram montados em meio de inclusão (OCT) (Sakura Finetek, Torrance, CA) sobre uma pequena placa de alumínio e congelados em gelo seco ou nitrogênio líquido. Seguindo-se o congelamento, eram realizados cortes transversais de 12 - 15 μ m em um criostato JUNG CM3000 *Leica* (Reichert Histostat) a -21° C. Os cortes eram coletados sobre lâminas previamente gelatinizadas, mantidos em temperatura ambiente para secar e, finalmente, acondicionados em caixas de lâminas padrão a -20° C até o momento do procedimento imunohistoquímico. Comumente, ao retirarmos as caixas de lâminas com as secções de retina do freezer para utilizá-las na imunohistoquímica, aguardávamos um período de tempo até que essas alcançassem a temperatura ambiente para que as caixas fossem abertas.

2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

O procedimento imunohistoquímico dos cortes de retina iniciava com a lavagem em tampão fosfato 0,1 M durante 10 minutos, por três vezes, seguindo-se a pré-incubação em albumina de soro bovino (BSA) 1% e soro normal de cabra (NGS) 10% em tampão fosfato 0,1 M com 0,3% Triton X-100 durante 1 hora. O material era então incubado por 24 horas com o anticorpo primário produzido em coelho (5-HT rabbit antibody; *Immunostar*) na diluição 1:5000 em tampão fosfato 0,1 M com 0,3% Triton X-100. Na mesma lâmina estava o corte controle no qual o anticorpo primário era substituído por soro não-imune (Figura 9).

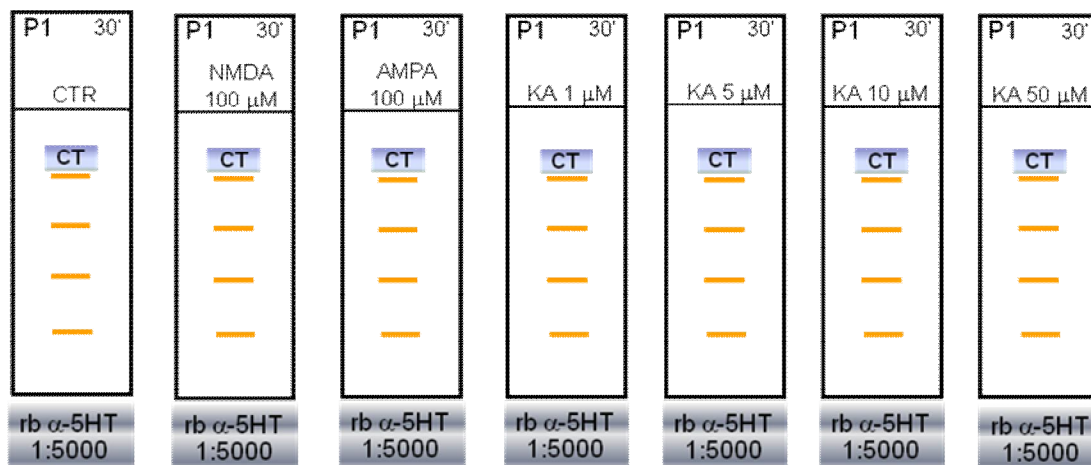
Após o referido período de incubação com o anticorpo primário, eram realizadas três lavagens consecutivas dos cortes em tampão fosfato 0,1 M durante 10 minutos cada. O material era posteriormente incubado com o anticorpo secundário biotinilado cabra anti-coelho para 5-HT (goat anti-rabbit; *Sigma*) na diluição de 1:200 em tampão fosfato 0,1 M com 0,3% Triton X-100 durante 24 horas. As titulações para o anticorpo primário e secundário foram determinadas em experimentos preliminares, baseando-se na marcação com menor relação sinal/ruído.

Seguindo o período de incubação com o anticorpo secundário, os cortes eram novamente lavados em tampão fosfato 0,1 M durante 10 minutos e então incubados no complexo avidina-biotina (Kit ABC, Elite Vectastain, Vector) na diluição de 1:50 em tampão fosfato 0,1 M com 0,3% Triton X-100 por no mínimo 2 horas. De acordo com a recomendação do fabricante, a solução de ABC era preparada 30 minutos antes de ser utilizada. Finalmente, após três novas lavagens, agora em PBS, durante 10 minutos, a reação era revelada

com o cromógeno DAB (0,05% 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorato), na presença de 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6. A reação era interrompida com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, após a constatação ao microscópio de células marcadas. As lâminas eram montadas com meio de glicerol a 40% em tampão fosfato 0,2 M. O selamento das lamínulas era feito com esmalte.

IMUNOHISTOQUÍMICA

AGONISTAS DE GLUTAMATO



ANTAGONISTA DE GLUTAMATO (DNQX)

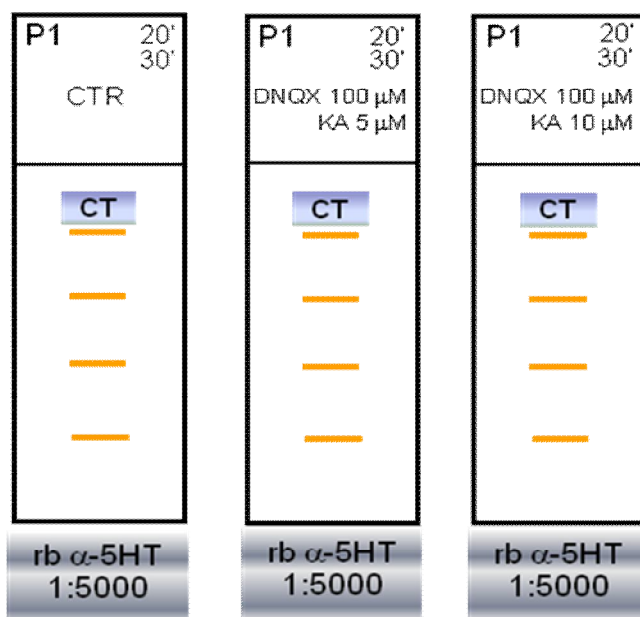
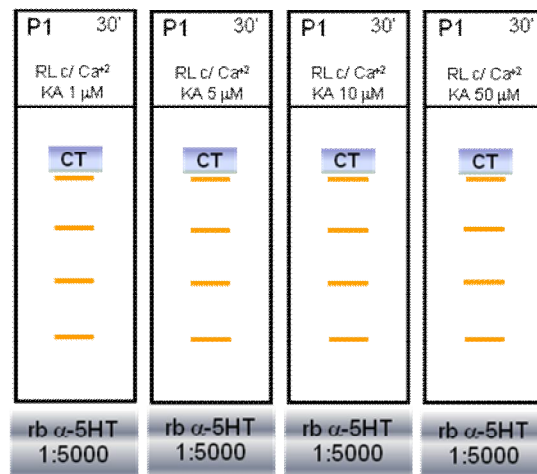
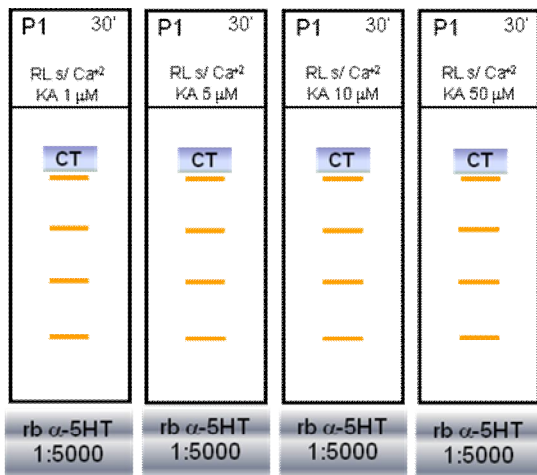
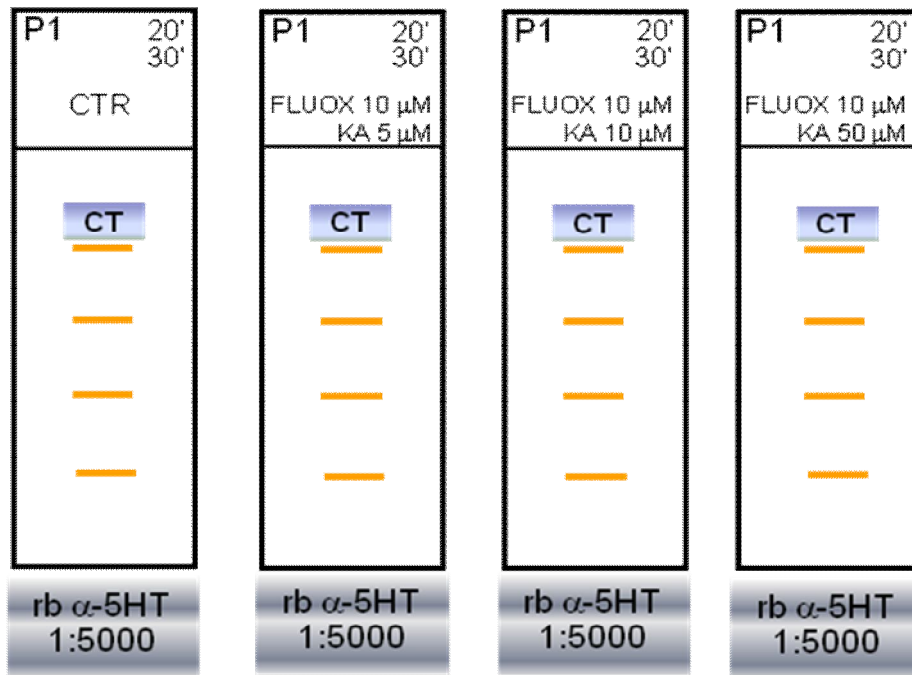


Figura 10. Desenho experimental ilustrando as secções obtidas a partir dos fragmentos de retina e submetidas ao procedimento imunohistoquímico para evidênciação do padrão de marcação do tecido após o tratamento com os moduladores glutamatérgicos.

IMUNOHISTOQUÍMICA



2.4 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL

A toxicidade induzida pela ativação dos receptores de cainato é bem reconhecida e requer um influxo excessivo de Ca^{+2} para os neurônios. A coloração pelo método de Nissl foi utilizada para visualizar o padrão histológico das secções de retinas controles e tratadas, bem como avaliar a integridade do tecido após o tratamento com diferentes concentrações do agonista cainato.

As lâminas com as secções de retina eram imersas em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 70% e 20%) por 1 minuto. A seguir, essas eram lavadas em água destilada e imersas no corante tionina por 30 a 60 segundos. Diferentes corantes podem ser utilizados para evidênciação da substância de Nissl, no entanto, utilizamos o corante tionina, pois esse mostrou um melhor padrão de marcação na retina de aves. Na seqüência da bateria, os cortes eram novamente lavados em água destilada para retirar o excesso de corante, e mergulhados imediatamente em soluções crescentes de álcool (20%, 70%, 95% e 100%) por 1 minuto. A clarificação ocorria pela imersão dos cortes em xileno 100% por 3 minutos, seguindo a montagem das lâminas com Entellan (Merck) (Figura 10).

COLORAÇÃO DE NISSL

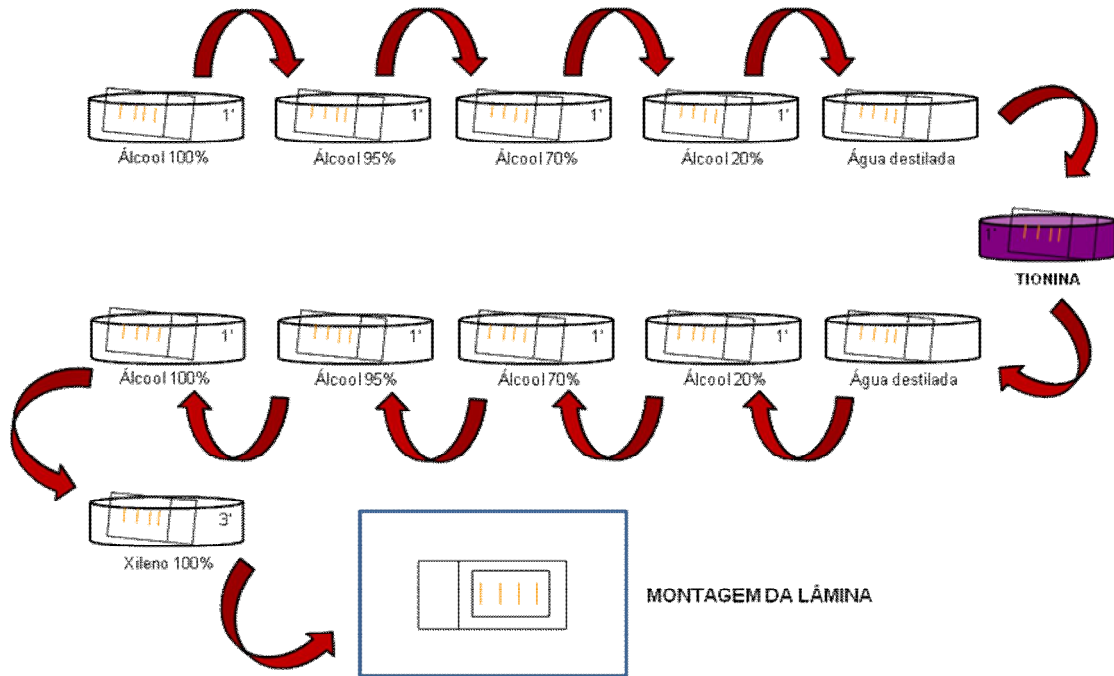


Figura 11. Desenho experimental ilustrando a coloração das secções pelo método de Nissl. Imersão das lâminas em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 70%, 20%) por 1 minuto, lavagem na água destilada e passagem pelo corante tionina. Lavagem novamente em água destilada e imersão em soluções crescentes de álcool (20%, 70%, 95%, 100%) por 1 minuto, seguida da clarificação em xileno 100% por 3 minutos e montagem das lâminas com Entellan.

2.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise do material revelado com DAB foi feita utilizando um microscópio óptico triocular (Olympus BX41) com epifluorescência e contraste interferencial diferencial (DIC)* (objetivas de 40x e 100x), acoplado à câmera fotográfica digital (Evolt 500, Olympus). Isso permitiu a observação e documentação fotográfica da expressão de 5-HT com o anticorpo utilizado, bem como o padrão de marcação do tecido após a estimulação com os moduladores de glutamato.

2.5.1 Densitometria

As alterações no padrão de imunorreatividade das células 5-HT-positivas (5-HT⁺) tratadas com as diferentes drogas foram analisadas por densitometria utilizando o software COREL•PHOTO-PAINT•X3 (Versão 13). A intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas foi estimada a partir de uma área retangular padrão, a qual incluía a porção medial da CNI, região onde se encontram as células amácrinas, bem como as células bipolares (ANEXO - Figura C). A resolução espacial do sistema era de 72 x 72 dpi. As imagens foram convertidas em tons de cinza de 8 bits e equalizadas automaticamente. Para a construção do histograma no referido software, uma área de contagem de pixels era delimitada.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação estatística dos resultados dos experimentos nos grupos controle e tratado, os dados foram analisados utilizando ANOVA: um critério e o pós-teste de Bonferroni, considerando significativo (* $p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS CONTROLES E TRATADAS

3.1.1 Retinas Controles

As retinas de pintos (P1) não-incubadas ou incubadas somente em tampão de Ringer Locke imunorreagiram para 5-HT permitindo a identificação do padrão de expressão do neurotransmissor com o anticorpo utilizado. Células amácrinas imunorreativas a 5-HT foram vistas na margem mais interna da CNI. Essas células apresentam corpos celulares grandes e ovais, fortemente marcados, com seus dendritos ramificando-se profusamente na CPI. Células bipolares 5-HT-positivas (5-HT⁺) são também reconhecidas na porção mais externa da CNI. Essas células mostram uma marcação menos intensa quando comparadas com as células amácrinas (Figura 11).

3.1.2 Retinas Tratadas

As retinas incubadas com os agonistas NMDA (100 μ M) sem Mg²⁺ e AMPA (100 μ M) mostraram imunorreatividade a 5-HT (5-HT-IR), sugerindo que esses moduladores glutamatérgicos provavelmente não exercem nenhum efeito na liberação do neurotransmissor. No entanto, as retinas tratadas com o agonista cainato (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) apresentaram uma evidente redução na 5-HT-IR (* p <0.01), quando comparadas com as retinas controles e tratadas com os agonistas NMDA (100 μ M) e AMPA (100 μ M) (Gráfico 1) (Figura 12, legenda na página oposta).

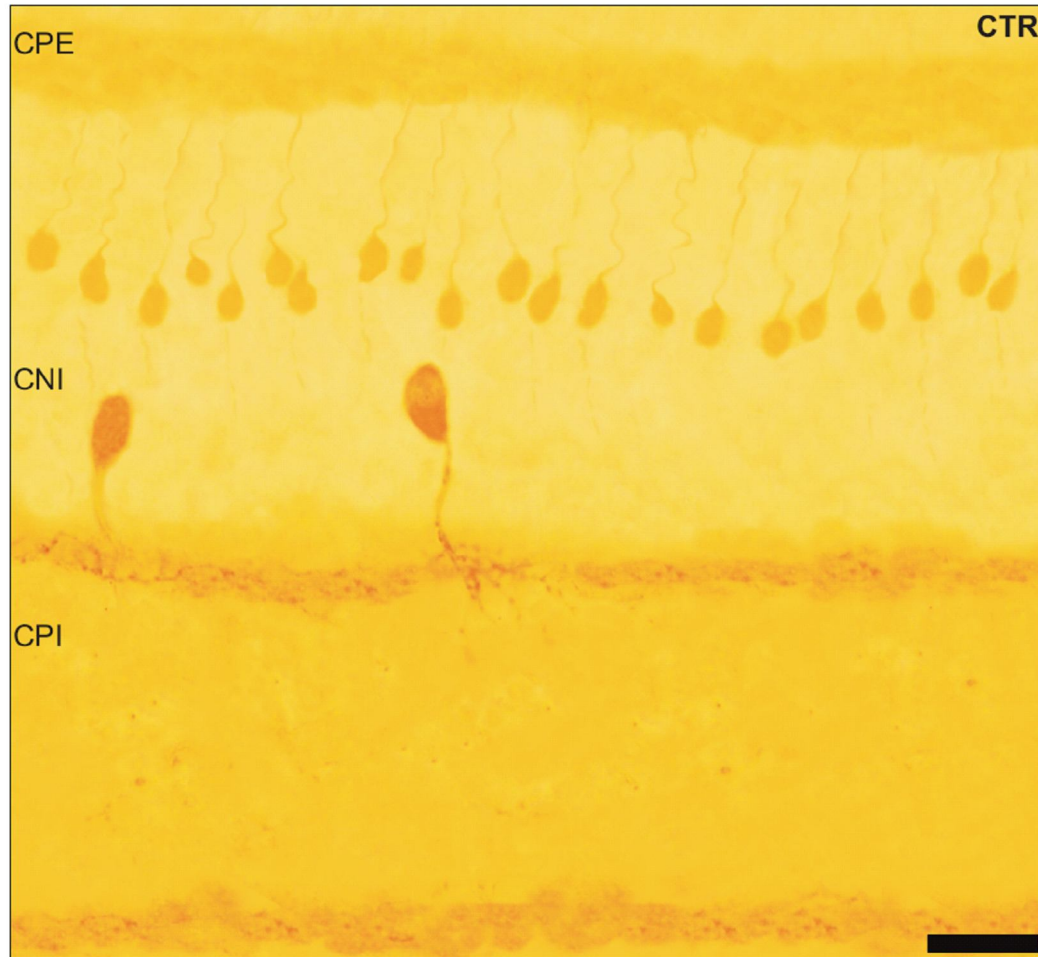


Figura 12. Fotomicrografia de corte transversal de retina de pinto (P1) não-incubada ou incubada somente em tampão de Ringer Locke por 30 minutos e imunorreagida para 5-HT. CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna. CTR, controle. Objetiva de 100x. Escala = 20 µm.

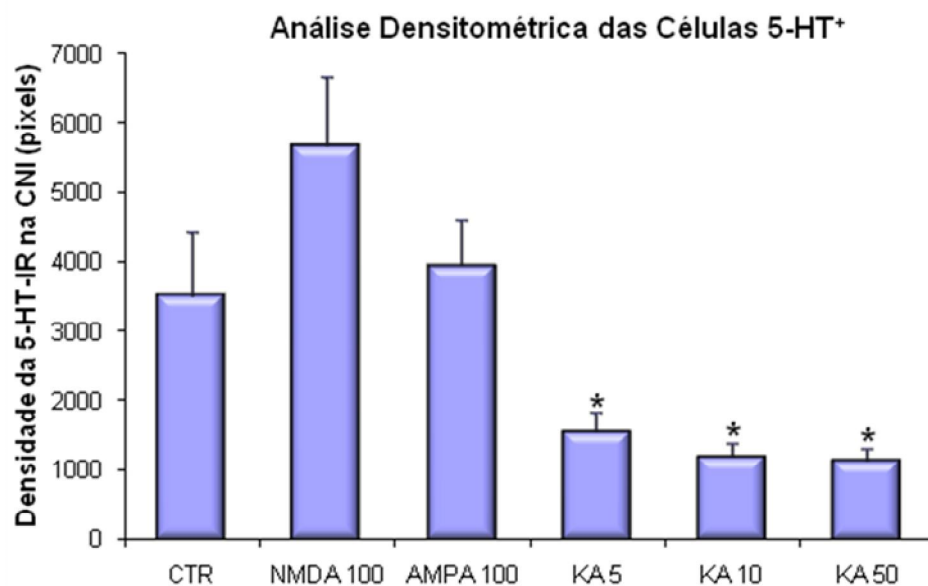
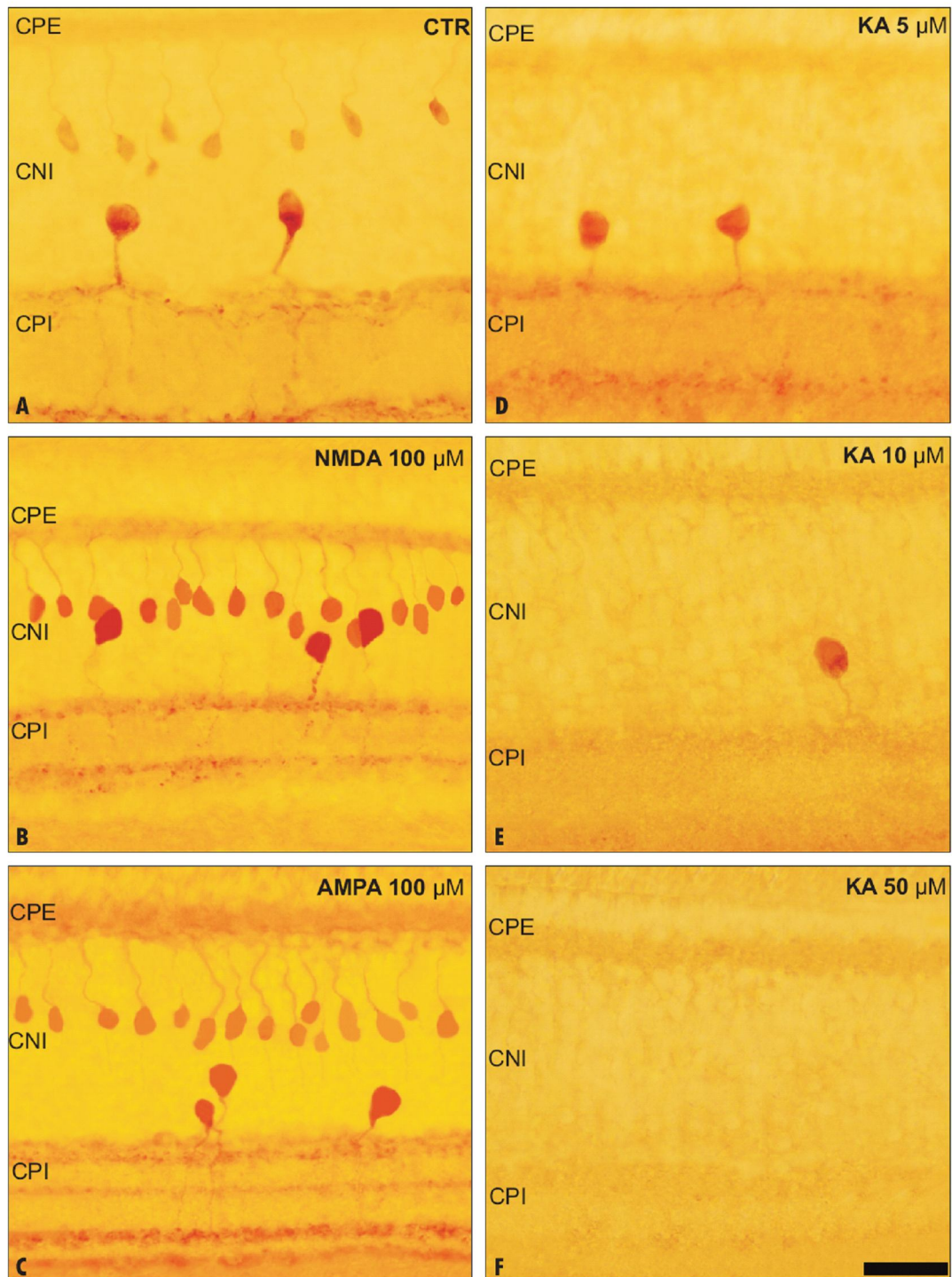


Gráfico 1. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNV das retinas controle e tratadas com diferentes moduladores glutamatérgicos {NMDA (100 μ M) sem Mg^{2+} , AMPA (100 μ M), cainato (5 μ M, 10 μ M, 50 μ M)} (ANOVA, * $p < 0.01$ em relação ao controle).



A partir da indicação de que a liberação de 5-HT na retina pinto possivelmente era regulada pela ativação de receptores do tipo cainato, partimos para analisar as respostas do tecido às diferentes concentrações do agonista. Os resultados demonstraram que o tratamento das retinas com cainato (1 μ M) nas mesmas condições experimentais não resultou em efeito estimulatório no mecanismo de liberação de 5-HT, já que não foi observada nas secções processadas uma redução significativa na 5-HT-IR (Figura 13, legenda na página oposta). Entretanto, o aumento gradual na concentração da droga, correspondeu proporcionalmente a uma diminuição significativa no padrão de imunorreatividade do tecido a 5-HT ($*p<0.01$) (Gráfico 2). Portanto, o efeito estimulatório do agonista cainato sobre a liberação do neurotransmissor demonstrou ser diretamente dependente da concentração utilizada.

É possível também observar que as retinas tratadas com cainato (50 μ M) apresentaram uma redução notável na 5-HT-IR na CPI quando comparadas com as retinas controles e aquelas tratadas com concentrações menores do agonista, permanecendo somente uma marcação puntiforme nos estratos 1 e 4/5 da CPI (Figura 13, legenda na página oposta). Essa redução na 5-HT-IR na neurópila da CPI sugere que a exposição ao cainato (50 μ M) promove a liberação do estoque endógeno do neurotransmissor.

Para avaliar o envolvimento do agonista cainato sobre a regulação da liberação de 5-HT na retina desses animais, seguimos para identificar as respostas do tecido diante do bloqueio com o antagonista DNQX (100 μ M). Os dados revelaram que o aumento na liberação de 5-HT induzido por cainato (10 μ M) foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista DNQX (Gráfico 3) (Figura 14, legenda na página oposta).

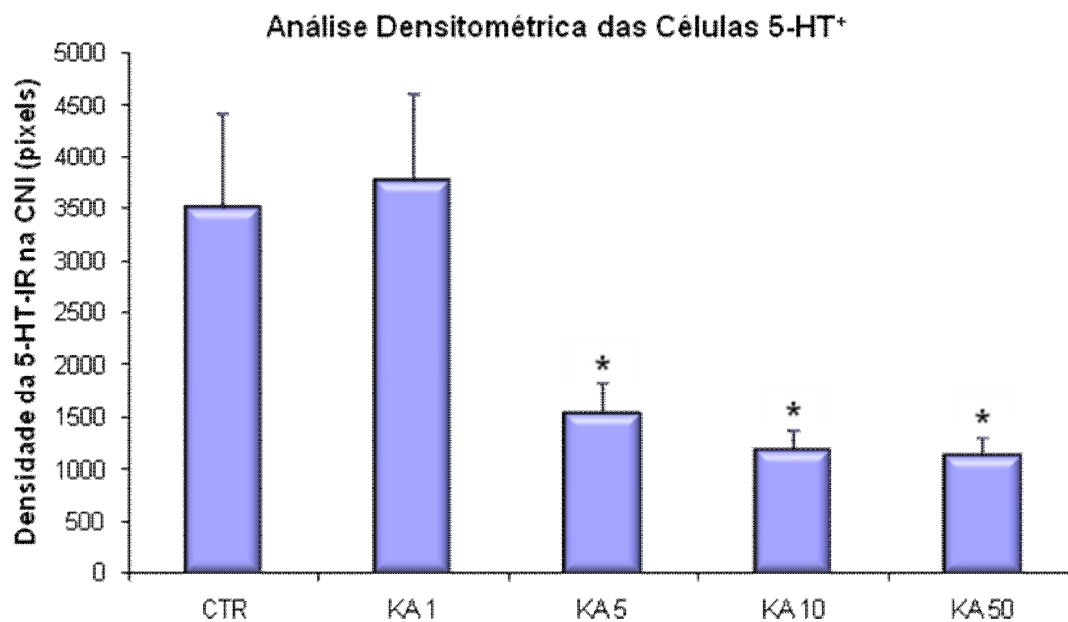
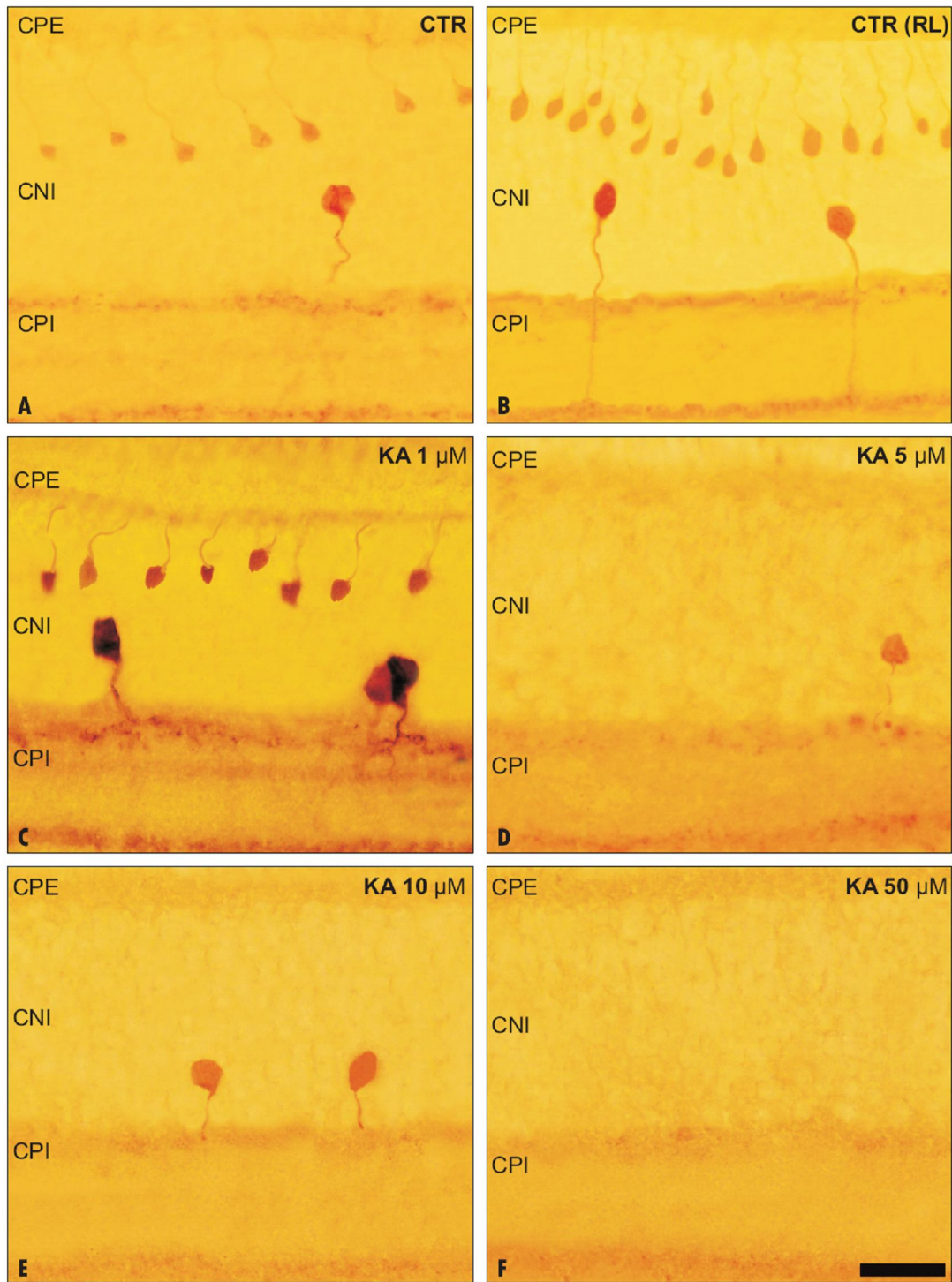


Gráfico 2. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNV das retinas controle e tratadas com diferentes concentrações de cainato (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) (ANOVA, * p <0.01 em relação ao controle).



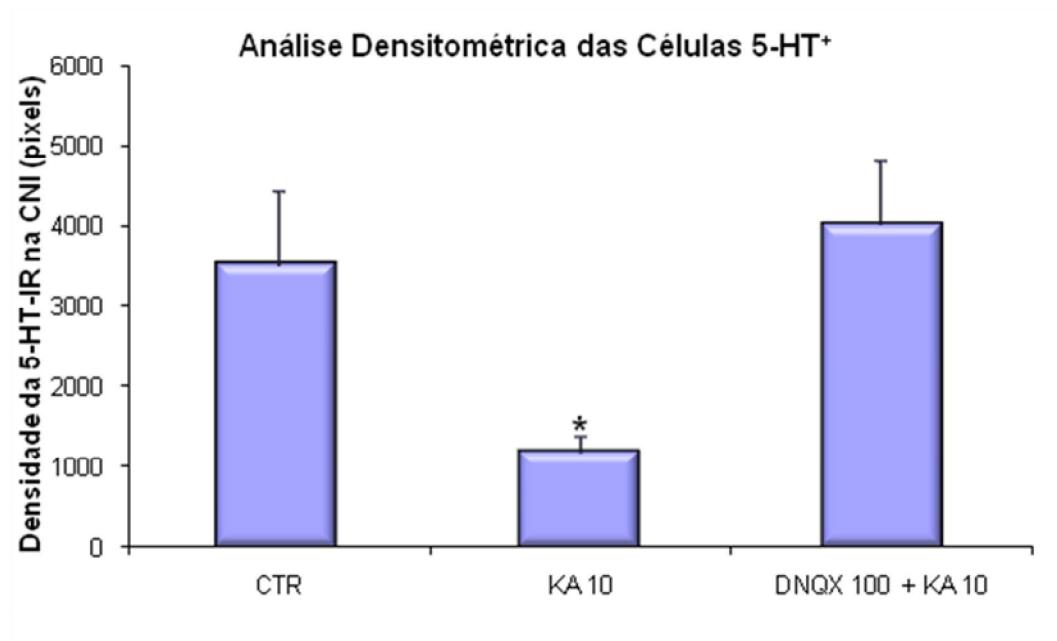
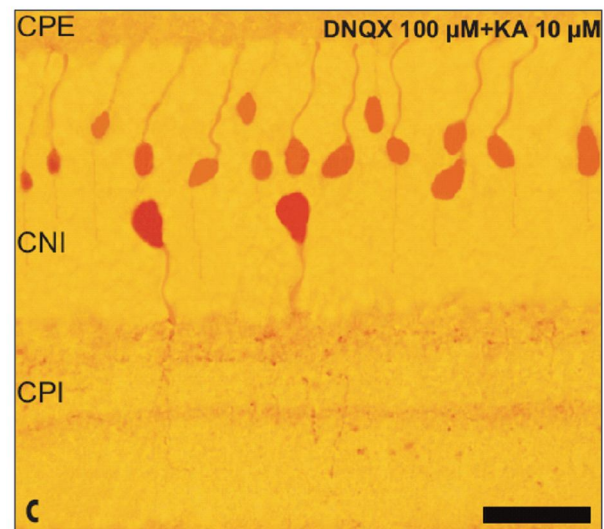
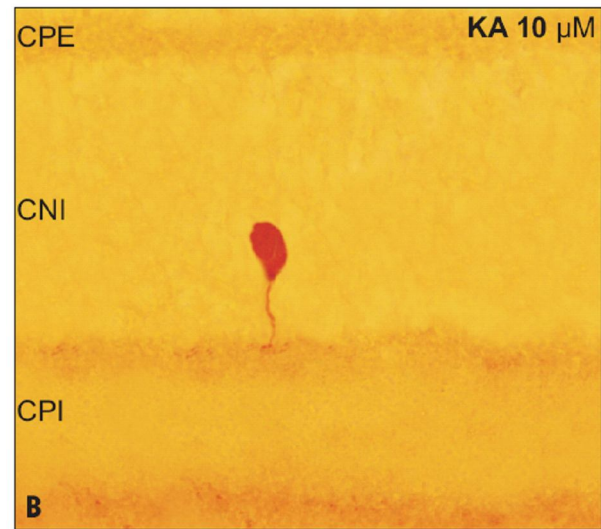
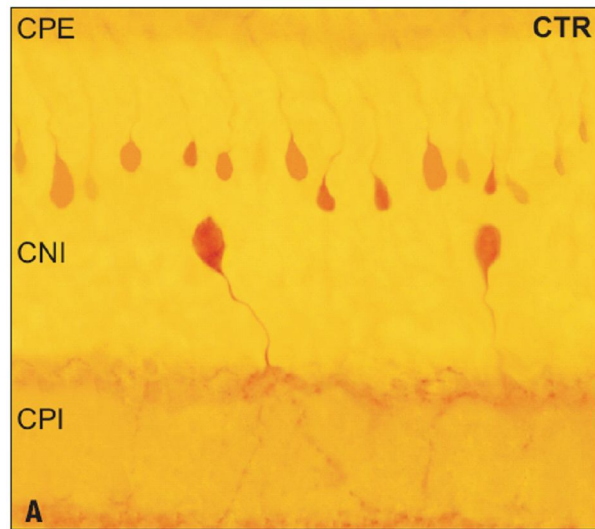


Gráfico 3. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNI das retinas controle e pré-tratadas com DNQX (100 μ M), seguido do tratamento com cainato (10 μ M) (ANOVA, * p <0.01 em relação ao controle).



Após a comprovação de que a ativação de receptores do tipo cainato induzia a liberação de 5-HT na retina de pinto, procuramos compreender os prováveis mecanismos envolvidos nessa regulação. Desse modo, partimos para analisar o papel do transportador de serotonina (SERT) na liberação estimulada do neurotransmissor, utilizando como estratégia metodológica o bloqueio da proteína com um inibidor altamente seletivo, a fluoxetina (Prozac). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento da retina com o bloqueador fluoxetina (10 μ M), seguido da incubação do tecido com o agonista cainato (5 μ M e 10 μ M), não bloqueou a liberação estimulada de 5-HT, isso pode ser evidenciado pela redução significativa da imunorreatividade do tecido a 5-HT (* p <0.01) (Gráfico 4), sugerindo o não envolvimento do transportador nesse mecanismo de regulação.

Esses dados podem ser confirmados pela análise do padrão de expressão imunohistoquímica evidenciado após o tratamento com o agonista cainato, ainda na presença do bloqueador do SERT (Figura 15, legenda na página oposta). As imagens demonstram uma diminuição acentuada na 5-HT-IR nas secções processadas, ou seja, o bloqueio da proteína transportadora não correspondeu a um bloqueio na liberação. Ao compararmos essas secções com aquelas não submetidas ao pré-tratamento com o bloqueador fluoxetina, não observamos diferenças importantes no padrão de imunomarcacão. Na realidade, os dois tratamentos demonstram um decréscimo significativo de células bipolares 5-HT⁺ na porção mais externa da CNI, refletindo a maior sensibilidade dessas células ao efeito do cainato.

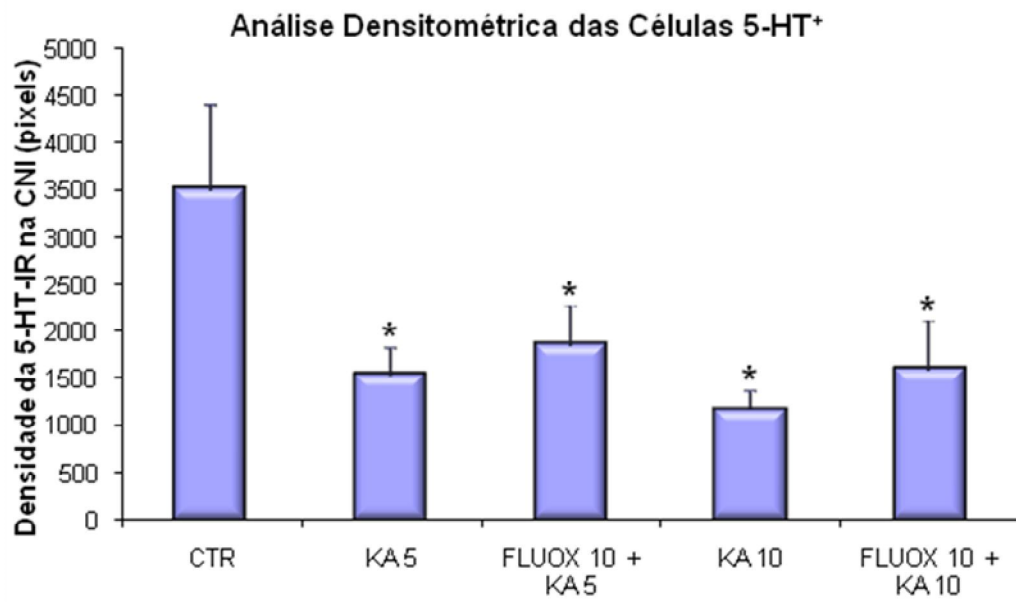
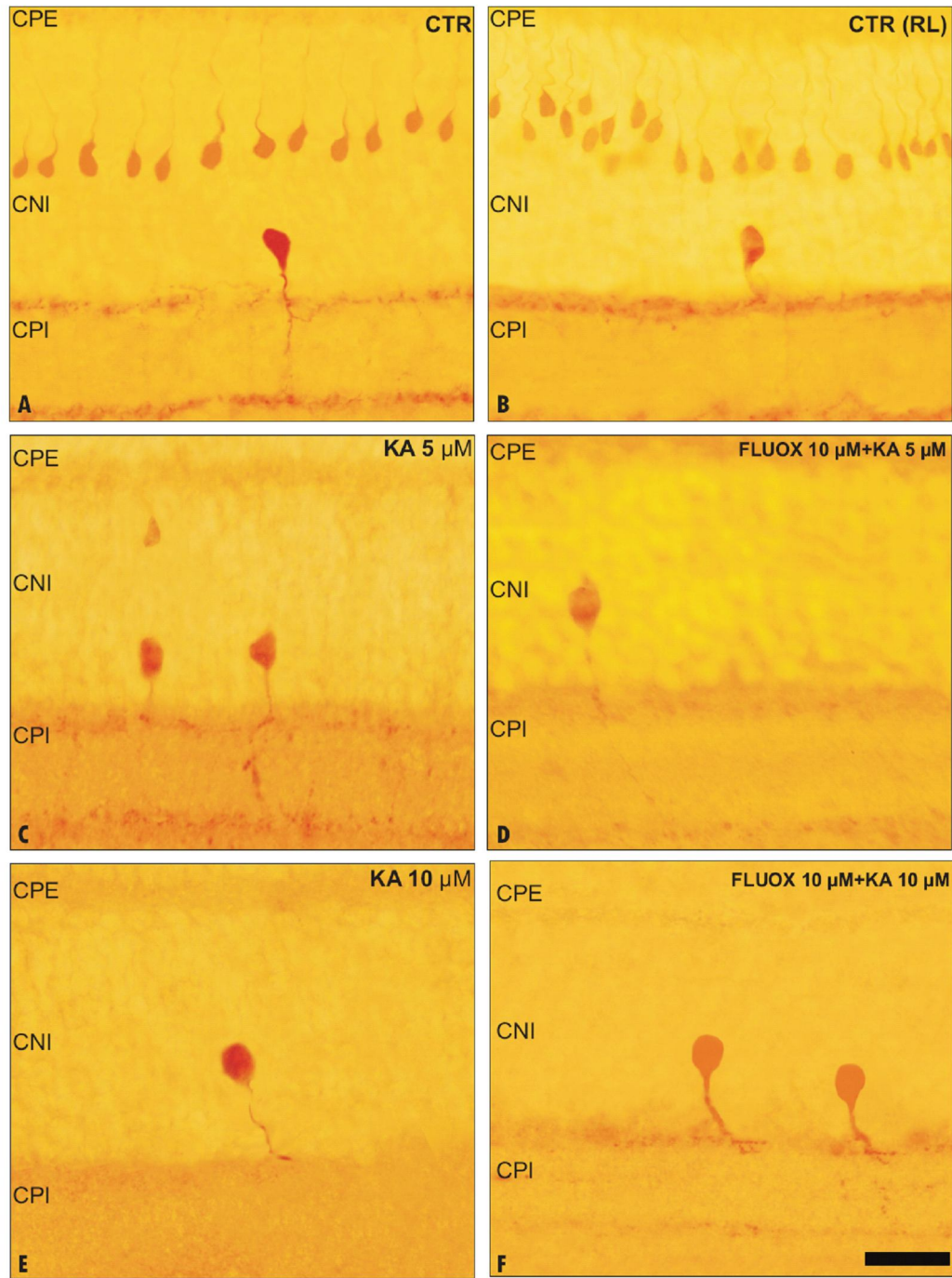


Gráfico 4. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNV das retinas controle e pré-tratadas com fluoxetina (10 μ M), seguido do tratamento com cainato (5 μ M e 10 μ M) (ANOVA, * p <0.01 em relação ao controle).



A partir da demonstração de que o bloqueio do SERT não alterava a liberação estimulada de 5-HT na retina, resolvemos analisar o envolvimento dos íons Ca^{+2} nessa regulação, incubando o tecido em tampão sem Ca^{+2} com o agonista cainato (1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM). Os resultados revelam que provavelmente a liberação de 5-HT na retina de pinto envolve mecanismos exocitóticos dependentes de Ca^{+2} , pois a ausência do íon no meio representou um fator regulatório negativo na liberação estimulada do neurotransmissor (Gráfico 5).

Ao analisar o padrão de imunoexpressão do neurotransmissor 5-HT nas secções processadas, verificamos que a redução evidente na 5-HT-IR após o tratamento com agonista cainato (5 μM , 10 μM e 50 μM) em tampão contendo íons Ca^{+2} , não pode ser observada nas secções tratadas em meio sem Ca^{+2} (Figuras 16 e 17, legendas nas páginas opostas). De fato, a presença do íon parece ser indispensável como mediador intracelular no mecanismo de liberação de 5-HT nas células da retina de aves.

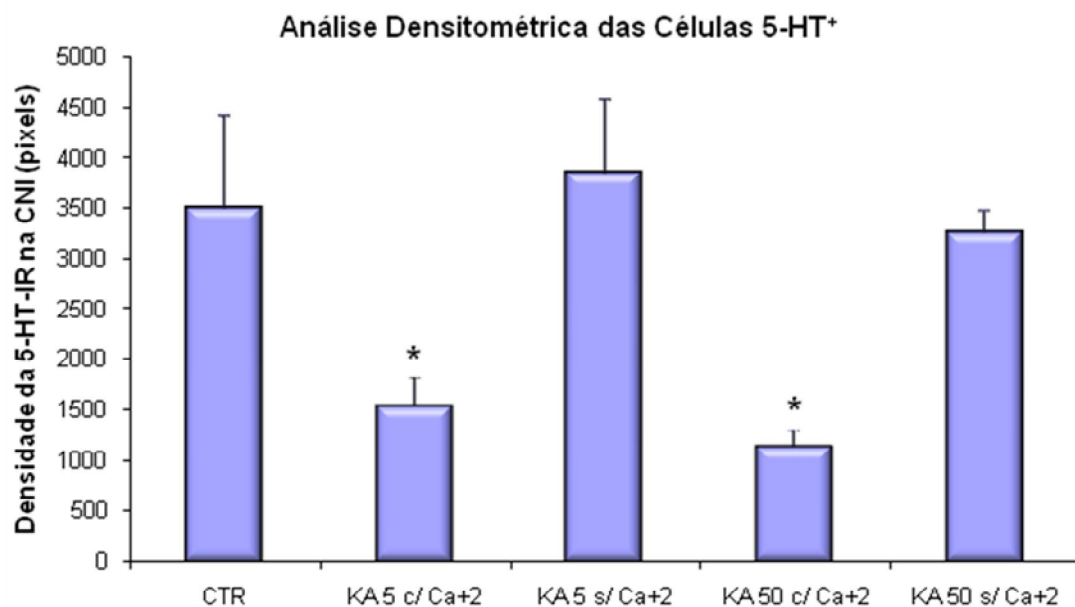
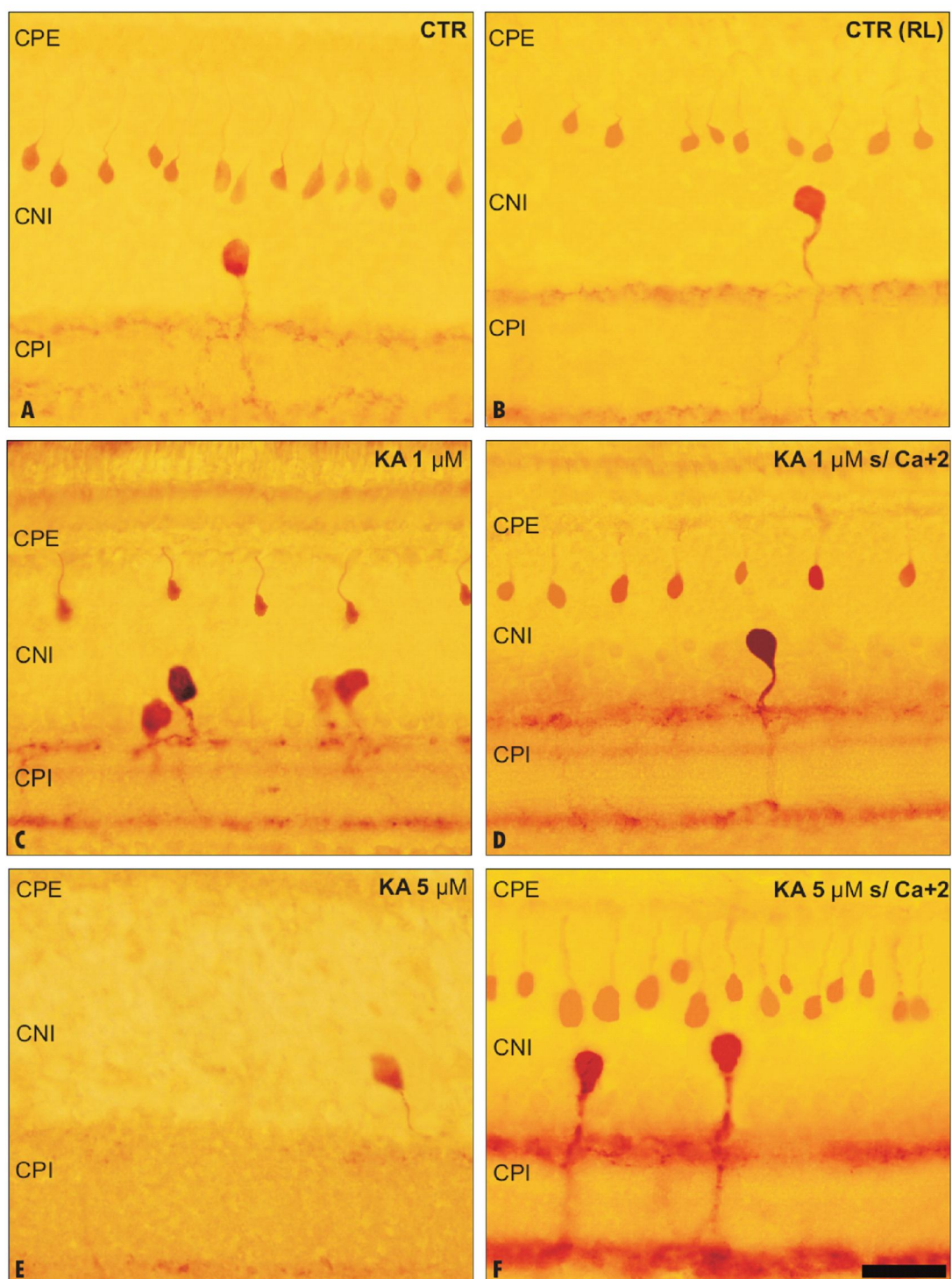
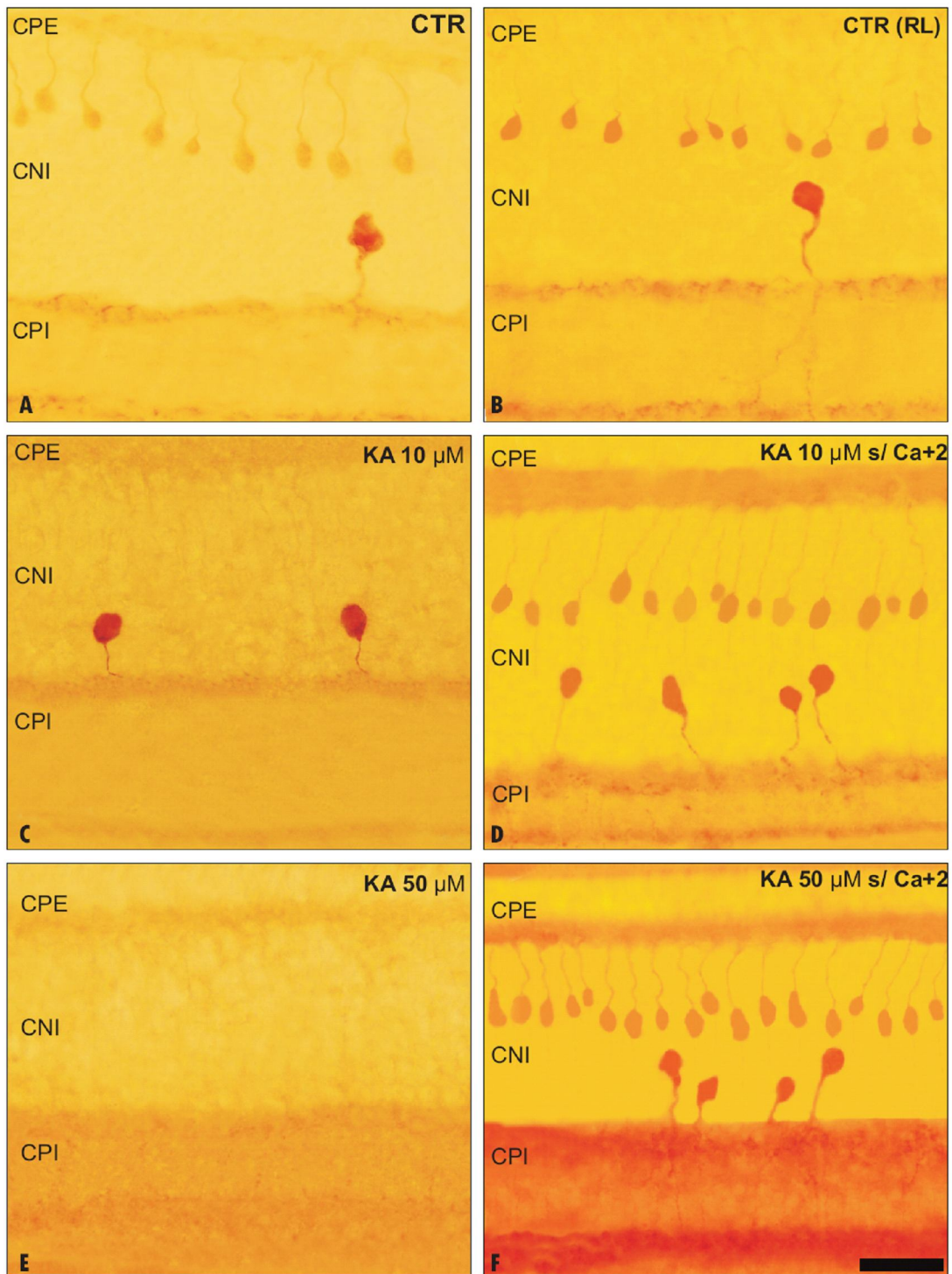


Gráfico 5. Quantificação da intensidade de marcação relativa à imunorreação do tecido a 5-HT na CNV das retinas controle e tratadas com cainato (5 μ M e 50 μ M) em tampão de Ringer Locke sem Ca^{2+} . O controle experimental foi realizado em tampão de Ringer Locke com íons Ca^{+2} (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação ao controle).

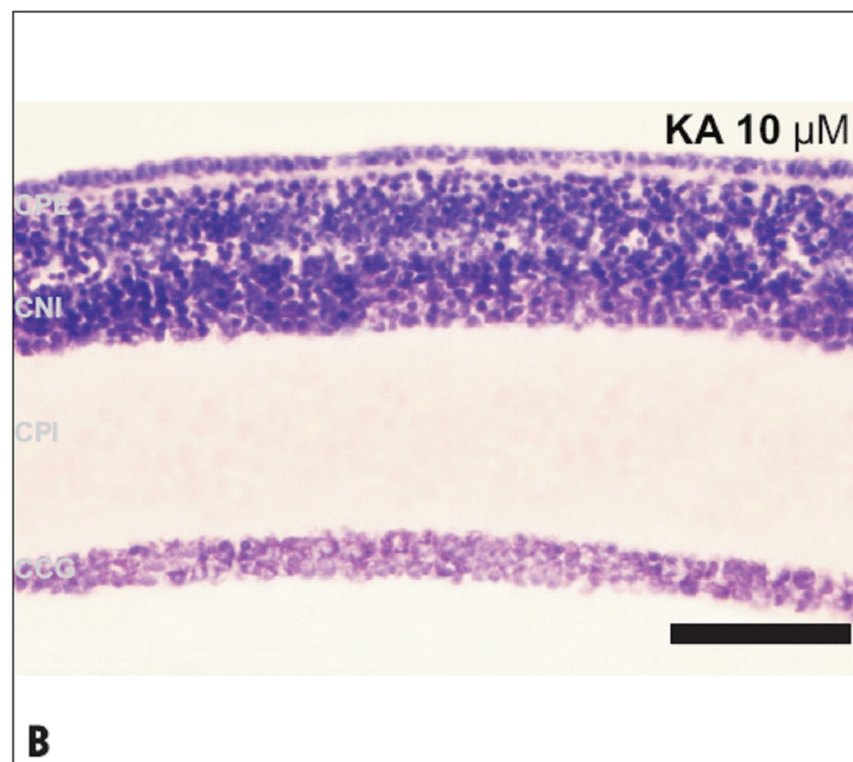
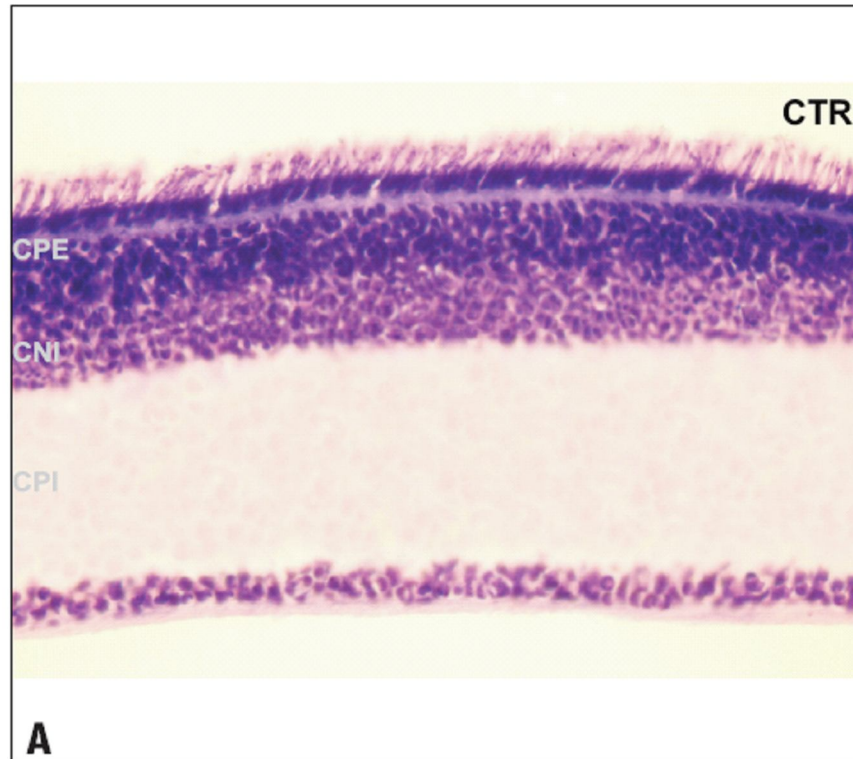




3.2 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE NISSL

O padrão morfológico das retinas dos grupos controle e experimental foi avaliado pela coloração de Nissl a partir da escolha do corante tionina, que revelou no decorrer dos experimentos uma melhor marcação para a retina de aves. O aspecto histológico das retinas tratadas com o agonista cainato não mostrou alterações morfológicas que indicassem rompimento celular quando comparadas com as retinas controle (Figura 18, legenda na página oposta). As concentrações utilizadas nos tratamentos, bem como o tempo de exposição do tecido ao cainato, não estão dentro dos limites que provocam excitotoxicidade.

Portanto, a integridade do tecido após o tratamento com diferentes concentrações da droga foi avaliada comparando o padrão histológico das retinas controle e tratadas com o agonista que promovia a diminuição da imunorreatividade do tecido a 5-HT, ou seja, o cainato. Consideramos que a redução evidente da imunorreatividade para 5-HT induzida por cainato (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) observada nas secções processadas provavelmente decorre da liberação do neurotransmissor e não em virtude do extravasamento de 5-HT em consequência de uma lise celular.



4. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou através de método imunohistoquímico os prováveis mecanismos envolvidos na regulação da liberação de 5-HT no tecido retiniano intacto de pinto (P1). A perspectiva de identificar esses mecanismos constitui efetivamente uma tentativa de compreender a importância funcional de mais uma das numerosas interações entre os diversos sistemas de neurotransmissores presentes nas células visuais.

Como referimos anteriormente, resultados bioquímicos de nosso laboratório demonstraram que a ativação de determinados receptores de glutamato promove a liberação de 5-HT em células cultivadas da retina de embriões de galinha (secção 1.3 da Introdução). A utilização de técnica imunohistoquímica na retina intacta permitiu corroborar esses dados, uma vez que foi possível evidenciar alterações no padrão de expressão do neurotransmissor 5-HT nas secções processadas, após manipulação farmacológica com diferentes moduladores glutamatérgicos.

4.1 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS CONTROLES

As retinas de pintos (P1) que não sofreram nenhum tratamento ou foram incubadas somente em tampão não mostraram diferença significativa no padrão de imunorreatividade a 5-HT (5-HT-IR), indicando que a simples incubação com Ringer Locke não alterou o padrão de marcação para o neurotransmissor. Células amácrinas e bipolares 5-HT⁺ foram vistas na margem mais interna e mais externa da CNI, respectivamente. As células amácrinas 5-HT⁺ identificadas na CNI apresentaram soma visivelmente

marcado e dendritos irradiando-se extensivamente dentro da CPI. A distribuição dessas células na CNI ocorria de forma isolada ou em série de duas a cinco células uniformemente espaçadas (Figura 11).

Nas últimas décadas, vários estudos bioquímicos e morfológicos têm demonstrado por diversas técnicas, inclusive pela imunohistoquímica, a existência de uma população específica de células amácrinas serotoninérgicas na retina de pinto (Wilhelm e cols., 1993; Ríos e cols., 1997; Fosser e cols., 2005; George e cols., 2005). Essas células apresentam imunorreatividade para a enzima de síntese do neurotransmissor, a triptofano hidroxilase (TrOH) (Millar e cols., 1988; Wilhelm e cols., 1993), sugerindo que a 5-HT nessas células parece desempenhar seu clássico papel de neurotransmissor.

A população específica de células amácrinas serotoninérgicas identificada nas retinas de pintos (P1) no decorrer dos experimentos, mostrou seu principal dendrito atravessando a CNI sem apresentar ramificações colaterais nesse nível. Por outro lado, as árvores dendríticas secundárias desses neurônios ao atravessarem a CPI, ramificavam-se profusamente nos estratos 1 e 4/5 dessa camada, com seus ramos exibindo varicosidades ao longo de todo seu comprimento. Essas ramificações extensivas dos dendritos nos estratos 1 e 4/5 da CPI são denominadas, respectivamente, rede serotoninérgica mais externa e mais interna, devido seus arranjos topográficos nos referidos estratos. Os resultados aqui apresentados estão consistentes com a mais completa descrição morfológica de células amácrinas na retina de pinto com fenótipo serotoninérgico já publicada (Ríos e cols., 1997).

Cajal (1892) dividiu arbitrariamente a neurópila da CPI da retina de vertebrados em 5 (cinco) estratos com base nas ramificações dendríticas das

células que estabelecem contatos sinápticos em diferentes estratos dessa camada. No entanto, existem outras subordens de organização no interior da CPI baseadas nas propriedades anatômicas e neuroquímicas das interações sinápticas, como por exemplo, a divisão em duas sublâminas (A e B), nas quais a sublâmina A (contém os estratos 1 e 2) e a sublâmina B (contém os estratos 3, 4 e 5).

As células bipolares 5-HT⁺ visualizadas na retina de pinto apresentaram, por sua vez, uma imunomarcacão menos intensa em relação às células amácrinas, no entanto, essas células encontravam-se em maior número e seus corpos celulares apresentavam uma morfologia bastante variada. Além disso, seus processos sinápticos orientavam-se em direção a CPE e CNI, contrariamente. A distribuição das células bipolares 5-HT⁺ nas secções coradas era enfileirada e posicionada distalmente num mesmo nível na porção medial da CNI (Figura 11). A fraca imunorreatividade exibida por essas células na retina de pinto, bem como o padrão morfológico do soma e de sua arborização dendrítica na CPE são muito semelhantes à descrição feita por Ríos e cols. (1997) na retina de embriões de pinto e animais pós-eclosão.

Nas retinas de várias espécies de não-mamíferos, inclusive em aves, foram observadas células bipolares imunorreativas a 5-HT, todavia, essas células não demonstraram conclusivamente conter serotonina endógena (Millar e cols., 1988; Marc e cols., 1988; Wilhelm e cols., 1993; Ríos e cols., 1997; George e cols., 2005). Na retina de teleósteos, por exemplo, uma única classe de células bipolares que transportava 5-HT foi observada, porém somente após a pré-incubação com [³H]5-HT (Marc e cols., 1988). Ao contrário, em répteis, foi possível demonstrar 5-HT endógena em células bipolares, embora com

amplificação desse conteúdo endógeno após a aplicação de 5-HT exógena, o que permitiu uma melhor descrição histológica do tecido. As células bipolares nas retinas desses répteis parecem constituir uma única classe de células que arborizam nos estratos 1 e 4/5 da CPI (Witkosky e cols., 1984; Weiler & Schütte, 1985b). Esses estudos foram os primeiros a sugerir que as células bipolares nas retinas de répteis podem ser serotoninérgicas e utilizarem a 5-HT no seu processamento neuronal, já que foi possível identificar a existência dos requerimentos básicos para essa denominação, ou seja, a presença de uma via metabólica para 5-HT e um mecanismo efetivo de captação da indolamina.

Em diferentes relatos sobre a existência de 5-HT nas retinas de algumas espécies de vertebrados é geralmente aceita a seguinte afirmativa: se os neurônios contêm 5-HT o suficiente que permita a detecção pela imunohistoquímica, essas células seriam capazes de sintetizar o neurotransmissor. Inversamente, os neurônios que somente podem ser visualizados após a pré-incubação com [³H]5-HT, essas células apenas acumulariam essa substância (Massey & Redburn, 1987, para revisão).

A identificação imunohistoquímica de células bipolares 5-HT⁺ nas retinas de nossos animais permite inferir somente que o conteúdo de 5-HT nessas retinas encontrava-se em quantidade detectável pelo método. Como não foi investigada a imunorreatividade do tecido para a enzima TrOH, seria precipitação afirmarmos que essas células sintetizam 5-HT na retina de pinto. A utilização de técnica imunohistoquímica que possibilita a identificação de células 5-HT⁺ nas retinas de aves, reportada por diversos autores, não certifica que células bipolares contenham 5-HT endógena, uma vez que essas células não mostraram imunorreatividade para a enzima de síntese do

neurotransmissor (Millar e cols., 1988; Wilhelm e cols., 1993), sugerindo que esses neurônios provavelmente constituem um subgrupo de células bipolares que acumulam 5-HT da fenda sináptica, e não “verdadeiros” neurônios serotoninérgicos (Ríos e cols., 1997).

4.2 PADRÃO DE IMUNORREATIVIDADE DAS CÉLULAS A 5-HT NAS RETINAS TRATADAS

Os resultados demonstraram que as retinas tratadas com os agonistas NMDA (100 μ M) sem Mg^{2+} e AMPA (100 μ M) não apresentaram uma diminuição na 5-HT-IR, indicando o não envolvimento desses agonistas glutamatérgicos no processo de liberação do neurotransmissor na retina de pinto (Figura 12, legenda na página oposta). Esses dados estão compatíveis com os resultados *in vitro* previamente mencionados (secção 1.3 da Introdução), nos quais verificamos que a ativação de receptores de glutamato dos tipos NMDA e AMPA não promove a liberação de 5-HT em culturas celulares de retinas de embriões de galinha (Passos, 2003). Contrariamente, na retina de peixes (*Raja erinacea*), o tratamento com NMDA promoveu um decréscimo detectável na 5-HT-IR em células amácrinas, mas não em células bipolares (Schuette & Chappell, 1998).

O tratamento do tecido com cainato (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M), por sua vez, resultou em uma redução acentuada na 5-HT-IR quando comparamos com as retinas controles e as incubadas com outros agonistas. Essa redução não foi observada na retina exposta ao cainato (1 μ M), revelando ser mais patente a partir de concentrações maiores, como por exemplo, no tratamento com cainato (50 μ M), no qual observamos uma ausência de marcação nas secções

processadas, o que pode representar a liberação total do conteúdo de 5-HT das células retinianas 5-HT⁺ (Figura 13, legenda na página oposta).

A ativação dos receptores do tipo cainato pode ser bloqueada pela utilização do antagonista DNQX (Honore e cols., 1988). A pré-incubação da retina com DNQX (100 μ M) resultou em um bloqueio na liberação mediada de 5-HT, isso pode ser revelado pela imunomarcação notável do tecido que foi submetido ao pré-tratamento (Figura 14, legenda na página oposta). Esses dados ratificam que os receptores de glutamato que estão realmente envolvidos na liberação de 5-HT na retina de pinto são os receptores do tipo cainato.

Analisando os prováveis mecanismos envolvidos na regulação da liberação de 5-HT induzida por receptores do tipo cainato, verificamos que a liberação de 5-HT na retina de pinto parece envolver mecanismos exocitóticos dependentes de Ca⁺², pois o bloqueio do transportador de 5-HT (SERT) com o inibidor fluoxetina, não alterou a liberação estimulada do neurotransmissor, sugerindo que essa liberação não ocorre por reversão do transportador (Figuras 15-17, legendas nas páginas opostas).

Esses resultados estão de acordo com estudos autoradiográficos e bioquímicos que indicam que os neurônios que acumulam 5-HT na retina de galinha liberam [³H]5-HT em concentrações despolarizantes de K⁺ no meio. Essa liberação é dependente de Ca⁺² e inibida pela presença de íons Co⁺², ou pela ausência de cálcio no meio (Osborne, 1982). Acredita-se que os íons Co⁺² interferem com a entrada de Ca⁺² nos terminais sinápticos, o que resulta em uma redução ou abolição na liberação do neurotransmissor (Weakly, 1973).

Calaza e cols. (2001) utilizaram para avaliar a integridade da retina de pinto após a exposição aos agonistas de glutamato, além do método de Nissl, a medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH). O emprego da técnica permitiu analisar a hipótese da liberação de GABA nessas retinas ser decorrente de morte celular provocada pelo tratamento com esses compostos. A exposição das retinas a 100 μ M de cainato por 30 minutos promovia uma redução de 50% no número de células amácrinas e horizontais imunorreativas a GABA. Os resultados revelaram que após o tratamento com cainato (100 μ M) mais do que 95% da atividade da LDH era detectada intracelularmente e não no meio, rejeitando a hipótese de que o tratamento com a droga provocaria lise celular e conseqüente redução do número de células GABA⁺.

Em nossos experimentos o agonista cainato foi utilizado em concentrações ainda menores do que aquelas utilizadas pelos referidos autores. Portanto, avaliamos que a acentuada diminuição na imunorreatividade do tecido a 5-HT induzida por cainato (5 μ M, 10 μ M e 50 μ M) observada em nossas secções seja possivelmente proveniente da liberação do neurotransmissor das células retinianas 5-HT⁺.

Os resultados do presente trabalho acrescentam-se aos inúmeros estudos que têm demonstrado a contribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato na regulação de substâncias neuroativas na retina de várias espécies de vertebrados (Osborne, 1982; Tapia & Arias, 1982; Moran & Pasantes-Morales, 1983; Weiler & Schütte, 1985a; Do Nascimento & De Mello, 1985; Schütte & Witkovsky, 1990; Duarte e cols., 1993; Do Nascimento e cols., 1998; Schuette & Chappell, 1998; Andrade da Costa e cols., 2000; Calaza e cols., 2001).

Duarte e cols. (1993) observaram que o efeito de L-glutamato na liberação de [^3H]GABA em células cultivadas da retina de galinha pode ser parcialmente revertido pelo antagonista de receptores NMDA (MK-801), bem como totalmente bloqueado pela adição conjunta dos antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA (CNQX). Esses dados sugerem a participação de ambos os subgrupos de receptores ionotrópicos no mecanismo de liberação de GABA nas retinas desses animais.

Andrade da Costa e cols. (2000) estabeleceram na retina de *Cebus apella* que células amácrinas e interplexiformes liberam GABA em resposta a estimulação com cainato, mas não com NMDA.

Schütte & Witkovsky (1990) estudando a morfologia e distribuição de neurônios que contêm e acumulam 5-HT na retina de *Xenopus laevis* verificaram que o tratamento com cainato estimulava a liberação de 5-HT de células bipolares 5-HT $^+$ de maneira dependente de Ca $^{+2}$. A liberação de 5-HT das células amácrinas, entretanto, mostrou ser largamente independente de Ca $^{+2}$. O efluxo de 5-HT das células bipolares 5-HT $^+$ em resposta ao cainato, bem como o padrão de ramificação de seus dendritos no estrato 1 da CPI indicaram que essas células provavelmente constituem células bipolares-OFF.

Adicionalmente, Schütte (1994) utilizando método imunocitoquímico evidenciou que a fonte primária de 5-HT “endógena” para as células bipolares na retina de *Xenopus* são as características células amácrinas 5-HT $^+$, que contêm os elementos celulares necessários da via de síntese do neurotransmissor.

O processamento da informação visual na retina está amplamente relacionado com o conjunto de neurotransmissores que são liberados em

contatos sinápticos. A identificação dessas moléculas e de suas inúmeras interações em neurônios específicos constitui objetivo permanente para muitos pesquisadores e novos conhecimentos surgem, buscando traduzir o verdadeiro significado funcional dessas estreitas relações nos diversos processos neuronais.

A retina como um componente integrante do SNC compartilha muito de suas características morfofuncionais, incluindo a predominância de glutamato como seu neurotransmissor excitatório, como reportam vários trabalhos (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Michaelis, 1998, para revisão). As ações do glutamato sobre os neurônios pós-sinápticos são excepcionalmente diversas, particularmente em razão de uma extensa família de receptores, agrupados em duas classes: os receptores ionotrópicos e os receptores metabotrópicos (Watkins & Jane, 2006). A contribuição dos receptores ionotrópicos de glutamato na regulação da liberação de neurotransmissores na retina de vertebrados é bem analisada na literatura, como já mencionado.

Os receptores ionotrópicos de glutamato são proteínas multiméricas formadoras de canais que exibem um comportamento fisiológico complexo ao serem ativados por glutamato e seus agonistas. Os receptores de cainato são formados por subunidades com propriedades farmacológicas acentuadamente distintas, ao contrário dos receptores AMPA, que apresentam sensibilidade farmacológica relativamente uniforme (Hollmann & Heinemann, 1994; Dingledine e cols., 1999)

Informações detalhadas sobre os sistemas serotoninérgicos da retina de várias espécies estudadas fundamentam a hipótese da 5-HT atuar como um neurotransmissor nesse tecido (Parkinson & Rando, 1981; Osborne, 1982;

Millar e cols., 1987; Wilhelm e cols., 1993), embora estudos anteriores tenham sugerido que uma indolamina intimamente relacionada a 5-HT fosse o verdadeiro transmissor retiniano (Florén & Hansson, 1980). A 5-HT presente na retina de aves possivelmente está envolvida com o processo de inibição lateral e o estabelecimento da modulação centro-periferia antagônica pelas células amácrinas (Brunken e cols., 1993, para revisão; Ríos e cols., 1997). Enquanto, a 5-HT acumulada em células bipolares e algumas células amácrinas que não exibem imunorreatividade a enzima TrOH, parece funcionar como um neuromodulador ou co-transmissor, e os neurotransmissores, glutamato e GABA, corresponderiam aos transmissores primários desses neurônios nas espécies investigadas, incluindo as aves (Wilhelm e cols., 1993).

Além de seu papel como neurotransmissor e neuromodulador na retina de aves, a 5-HT constitui um precursor para a síntese local do neurohormônio melatonina, uma vez que já foi identificado a TrOH como a enzima limitante da taxa de síntese de melatonina (Cahill & Besharse, 1990). No entanto, estudos na retina de galinha mostraram que a atividade circadiana da enzima TrOH e a síntese de melatonina ocorrem nos fotorreceptores e não nas células bipolares e amácrinas (Thomas e cols., 1993; Chong e cols., 1998).

A ativação de receptores do tipo cainato estimula a liberação de 5-HT na retina de pinto (P1). Essa ativação, provavelmente, dispara a abertura de canais de sódio, e o influxo de sódio despolariza a membrana neuronal. A despolarização da membrana promove um aumento na condutância dos canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem presentes na superfície neuronal. Um influxo de cálcio poderia, por conseguinte, resultar na liberação de 5-HT por processos vesiculares dependentes do íon.

Um passo importante na sequência desse estudo será a compreensão dos mecanismos intracelulares pelos quais os receptores de cainato ativados estimulam a liberação de 5-HT na retina de aves. O entendimento desses eventos moleculares nas sinapses serotoninérgicas permitirá traduzir o significado funcional dessa íntima interação, possivelmente, envolvida com o processamento da informação visual.

A transdução do sinal luminoso ocorre nos fotorreceptores e essa informação é transmitida através de vias radiais para as células bipolares, e a seguir, para as células ganglionares. Como referimos anteriormente, existem dois circuitos paralelos na via radial, conhecidos como circuitos ON e OFF, que constituem a base da percepção de contraste simultâneo da cor. As mudanças nos níveis de luz correspondem em ações recíprocas sobre esses dois circuitos, aumentando a atividade de um e diminuindo a atividade de outro (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Wässle & Boycott, 1991, para revisão; Kolb, 1994).

O neurotransmissor glutamato é continuamente liberado pelos fotorreceptores no escuro, despolarizando as células bipolares de centro-OFF pela abertura de receptores-canais do tipo não-NMDA (AMPA/KA) (Massey & Redburn, 1987, para revisão; Wässle & Boycott, 1991, para revisão). Vários estudos em diferentes espécies têm demonstrado que células bipolares transitoriamente expressam 5-HT durante o desenvolvimento (Weiler & Schütte, 1985b; Osborne, 1985). Na retina de répteis existem evidências que essas células parecem ser células bipolares de centro-OFF, devido ao seu padrão de arborização na CPI, bem como a acentuada redução na imunorreatividade dessas células à aplicação de cainato, que ao despolarizá-

las, promove a liberação de 5-HT (Weiler & Schütte, 1985a; Brunken e cols., 1993, para revisão). Esses resultados em répteis assemelham-se aos estudos realizados em *Xenopus* anteriormente relatados (Schütte & Witkovsky, 1990).

Nossos resultados sobre a regulação da liberação de 5-HT assinalam para a existência de prováveis interações entre dois sistemas de neurotransmissores presentes na retina de aves, o glutamato e a 5-HT. O papel dessas moléculas nas sinapses retinianas, bem como a identificação das estreitas relações entre os receptores de cainato ativados e o processo de liberação de 5-HT nas células visuais de pinto, motivam para o desenvolvimento de novos estudos, no sentido de procurar caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos nessas interações. Conseqüentemente, evidências poderão surgir em relação ao significado funcional do papel do glutamato sobre a liberação de 5-HT que certamente influencia o processamento da informação visual.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem inferir:

- A população específica de células amácrinas imunorreativas a 5-HT identificada na CNi da retina isolada de pinto (P1) apresenta soma grande e visivelmente marcado, com seus dendritos ramificando-se extensivamente na CPI. Enquanto, o subgrupo de células bipolares serotoninérgicas mostra uma imunomarcacão menos intensa e uma morfologia mais variada;
- A liberaçao de 5-HT na retina de pinto provavelmente não é regulada pela ativaçao de receptores de glutamato dos tipos NMDA e AMPA, já que não foi observada nenhuma reduçao no padrao de imunorreatividade das células a 5-HT após a estimulaçao com esses agonistas;
- Os receptores de glutamato do tipo cainato ao serem ativados induzem a liberaçao de 5-HT na retina de pinto, isso pode ser revelado pela evidente reduçao no padrao de 5-HT-IR do tecido retiniano tratado com o agonista;
- O efeito estimulatório do cainato sobre a liberaçao de 5-HT pode ser bloqueado pela presença do antagonista DNQX, tendo em vista a imunomarcacão notável das secções submetidas ao pré-tratamento;

- O bloqueio do transportador de 5-HT (SERT) com o inibidor fluoxetina não influenciou a liberação estimulada do neurotransmissor, indicando que o efluxo de 5-HT das células 5-HT⁺ não ocorre por reversão do transportador;
- A liberação estimulada de 5-HT das células 5-HT⁺ da retina de pinto provavelmente é mediada por mecanismos exocitóticos dependentes de Ca⁺², pois a adição de cainato em um meio sem Ca⁺², não induziu a liberação de 5-HT;
- O padrão histológico das retinas tratadas com o agonista cainato não revelou alterações morfológicas que indicassem rompimento celular, portanto, a redução acentuada da imunorreatividade a 5-HT induzida por cainato na retina de pinto não resulta do extravasamento de 5-HT das células 5-HT⁺.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE da COSTA, B.L.S., DE MELLO, F.G., HOKOÇ, J.N. 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 Res.*, v. 863, p. 132-42, 2000.
- ANDRADE da COSTA, B.L.S., DE MELLO, F.G., HOKOÇ, J.N. Comparative study of glutamate mediated γ -aminobutyric acid release from nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase immunoreactive cells of the *Cebus apella* retina. *Neurosci. Letters*, v. 302, p. 21-24, 2001.
- BETTLER, B., MULLE, C. Review: Neurotransmitter Receptors II - AMPA and Kainate Receptors. *Neuropharmacology*, v. 34(2), p. 123-139, 1995.
- BLAKELY, R.D., BERSON, H.E., FREMEAU, R.T.J., CARON, M.G., PEEK, M.M., PRINCE, H.K., BRADLEY, C.C. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature*, v. 354, p. 66-70, 1991.
- BRANDSTÄTTER, J.H., KOULEN, P., WÄSSLE, H. Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.*, v. 38, p. 1385–1397, 1998.
- BRANDSTÄTTER, J.H., KOULEN, P., WÄSSLE, H. Selective Synaptic Distribution of Kainate Receptor Subunits in the Two Plexiform Layers of the Rat Retina. *J. Neurosci.*, v. 17(23), p. 9298–9307, 1997.
- BREDARIOL, A.S.S., HAMASSAKI-BRITTO, D.E. Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. *J. Comp. Neurol.*, v. 441, p. 58-70, 2001.
- BRUNKEN, W.J., JIN, X.T., PIS-LOPEZ, A.M. The properties of the serotonergic system in the retina. *Prog. Ret. Res.*, v. 12, p. 75-99, 1993.

- CAHILL, G.M., BESHARSE, J.C. Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: limitation by serotonin availability. *J. Neurochem.*, v. 54(2), p. 716-719, 1990.
- CALAZA, K.C., MELLO, F.G., GARDINO, P.F. GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells. *J. Neurocytol.*, v. 30, p. 181-193, 2001.
- CHANUT, E., NGUYEN-LEGROS, J., LABARTHE, B., TROUVIN, J-H., VERSAUX-BOTTERI, C. Serotonin synthesis and its light-dark variation in the rat retina. *J. Neurochem.*, v. 83(4), p. 863-869, 2002.
- CHONG, N.W., CASSONE, V.M., BERNARD, M., KLEIN, D.C., IUUVONE, P.M. Circadian expression of tryptophan hydroxylase mRNA in the chicken retina. *Mol. Brain Res.*, v. 61, p. 243-250, 1998.
- CIABARRA, A.M., SULLIVAN, J.M., GAHN, L.G., PECHT, G., HEINEMANN, S., SEVARINO, K.A. Cloning and Characterization of χ -1: A Developmentally Regulated Member of a Novel Class of the Ionotropic Glutamate Receptor Family. *J. Neurosci.*, v. 15(10), p. 6498-6508, 1995.
- COOPER, J.R., BLOOM, F.E., ROTH, R.H. Serotonin (5-hydroxytryptamine) and Histamine. In: _____. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 6^a ed. Oxford University Press, 1991. cap. 11, p. 338-380.
- DINGLELINE, R., McBAIN, C.J. Excitatory Amino Acid Transmitters. In: SIEGEL, G.J., AGRANOFF, B.W., ALBERS, R.W., FISHER, S.K., UHLER, M.D. *Basic Neurochemistry Molecular, Celular and Medical Aspects*. 6^a ed. Lippincott-Raven, 1999. cap. 15, p. 315-333.

- DO NASCIMENTO, J.L.M., DE MELLO, F.G. Induced release of γ -aminobutyric acid by a carrier-mediated, high-affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells. *J. Neurochem.*, v. 45, p. 1820-1827, 1985.
- DO NASCIMENTO, J.L.M., KUBRUSLY, R.C.C., REIS, R.A.M., DE MELLO, M.C.F., DE MELLO, F.G. Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 343, p. 103-110, 1998.
- DUARTE, C.B., FERREIRA, I.L., SANTOS, P.F., OLIVEIRA, C.R. CARVALHO, A.P. Glutamate increase the $[Ca^{+2}]_i$ but stimulates Ca^{+2} -independent release of GABA in cultured chick retina cells. *Brain Res.*, v. 611, p. 130-138, 1993.
- EHINGER, B. Neurotransmitter systems in the retina. *Retina*, v. 2, p. 305-21, 1982.
- FLORÉN, I., HANSSON, H.C. Investigations into whether 5-hydroxytryptamine is a neurotransmitter in the retina of rabbit and chicken. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 19(2), p.117-125, 1980.
- FOSSER, N.S., BRUSCO, A., RÍOS, H. Darkness induced neuroplastic changes in the serotonergic system of the chick retina. *Dev. Brain Res.*, v. 160, p. 211-218, 2005.
- FRAZER, A., HENSLER, J.G. Serotonin. In: SIEGEL, G.J, AGRANOFF, B.W, ALBERS, R.W., FISHER, S.K., UHLER, M.D. *Basic Neurochemistry Molecular, Celular and Medical Aspects*. 6^a ed. Lippincott-Raven, 1999. cap. 13, p. 263-292.

- GEORGE, A., SCHMID, K.L., POW, D.V. Retinal serotonin, eye growth and myopia development in chick. *Experimental Eye Research*, v. 81, p. 616–625, 2005.
- HACK, I., KOULEN, P., PEICHL, L., BRANDSTATTER, J.H. Development of glutamatergic synapses in the rat retina: the postnatal expression of ionotropic glutamate receptor subunits. *Vis. Neurosci.*, v. 19(1), p. 1-13, 2002.
- HAMASSAKI-BRITTO, D.E., HERMANS-BORGMEYER, I., HEINEMANN, S., HUGHES, T.E. Expression of glutamate receptor genes in the mammalian retina: the localization of GluR1 through GluR7 mRNAs. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 1888-1898, 1993.
- HOFFMAN, B.J., MEZEY, E., BROWNSTEIN, M.J. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science*, v. 254, p. 579-580, 1991.
- HOLLMANN, M., HEINEMANN, S. Cloned Glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 17, p. 31-108, 1994.
- HONORE, T., DAVIES, S.N., DREJER, J., FLECHER, E.J., JACOBSEN, P., LODGE, D., NIELSEN, F.E. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science*, v. 241, p. 701–703, 1988.
- JASKOLSKI, F., COUSSEN, F., MULLE, C. Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 26(1), p. 20-26, 2005.
- KATZ, B., MILEDI, R. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.*, v. 207, p. 789-801, 1970.
- KOLB, H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina (The Proctor Lecture). *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, v. 35, p. 2385-2402, 1994.

- KUBOTA, N., KIUCHI, Y., NEMOTO, M., OYAMADA, H., OHNO, M., FUNAHASHI, H., SHIODA, S., OGUCHI, K. Regulation of serotonin transporter gene expression in human glial cells by growth factors. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 417, p. 69-76, 2001.
- KUFFLER, S.W. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.*, v. 16, p. 37-68, 1953.
- LERMA, J., PATERNAIN, A.V., RODRÍGUEZ-MORENO, A., LÓPEZ-GARCÍA, J.C. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.*, v. 81, p. 971-998, 2001.
- LIMA, L., URBINA, M. Serotonergic projections to the retina of rat and goldfish. *Neurochem. Int.*, v. 32, p. 133-141, 1998.
- MAMMEN, A.L., KAMEYAMA, K., ROCHE, K.W., HUGANIR, R.L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 32528–32533, 1997.
- MARC, R.E., LIU, W-L.S., SCHOLZ, K., MULLER, J.F. Serotonergic and Serotonin-Accumulating Neurons in the Goldfish Retina. *J. Neurosci.*, v. 8(9): p. 3427-3450, 1988.
- MASLAND, R.H. Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 11, p.431-436, 2001.
- MASSEY, S.C., REDBURN, D.A. Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.*, v. 28, p. 55-96, 1987.
- MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 28, p. 197–276, 1987.

- MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.*, v. 54, p. 369-415, 1998.
- MILLAR, T.J., WINDER, C., ISHIMOTO, I., MORGAN, I.G. Putative serotonergic and amacrine cells in the chicken retina. *Brain Res.*, v. 439, p. 77-87, 1988.
- MITCHELL, C.K., REDBURN, D.A. Analysis of pre- and postsynaptic factors of the serotonin system in rabbit retina. *J. Cell Biol.*, v. 100, p. 64-73, 1985.
- MONAGHAN, D.H., BRIDGES, R.J., COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *A. Rev. Pharmac. Toxic.*, v. 29, p. 365-402, 1989.
- MORAN, J., PASANTES-MORALES, H. Effects of excitatory amino acids, and of their agonists and antagonists on the release of neurotransmitters from the chick retina. *J. Neurosci. Res.*, v. 10(3). p. 261-271, 1983.
- MORI, H., MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol.*, v. 34, p. 1219-1237, 1995.
- MÖSSNER, R., DANIEL, S., ALBERT, D., HEILS, A., OKLADNOVA, O., SCHMITT, A., LESCH, K-P. Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor (NGF). *Neurochemistry International*, v. 36, p. 197-202, 2000.
- NESTLER, E.J., STEVEN, E.H., MALENKA, R.C. Serotonin, Acetylcholine, and Histamine. In: _____. *Molecular Neuropharmacology*. International Edition, 2001. cap. 9, p. 191-211.

- NISHI, M., HINDS, H., LU, H.P., KAWATA, M., HAYASHI, Y. Motoneuron-Specific Expression of NR3B, a Novel NMDA-Type Glutamate Receptor Subunit That Works in a Dominant-Negative Manner. *J. Neurosci.*, v. 21 RC185, 2001.
- OSBORNE, N.N. Interplexiforme, horizontal and bipolar-like cells of the rabbit retina take up exogenous serotonin during early developmental stages. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 3, p. 643-646, 1985.
- OSBORNE, N.N. Uptake, localization and release of serotonin in the chick retina. *J. Physiol.*, v. 331, p. 469-479, 1982.
- OSBORNE, N.N., NESSELHUT, T., NICHOLAS, D.A., PATEL, S., CUELLO, A.C. Serotonin-Containing Neurones in Vertebrate Retinas. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 1519-1528, 1982.
- PARKINSON, D., RANDO, R.R. Evidence for a neurotransmitter role for 5-hydroxytryptamine in chick retina. *J. Neurosci.*, v. 1(11), p. 1212-1217, 1981.
- PASSOS, A.C.F. Captação e Liberação de Serotonina Regulada por Receptores de Glutamato em Células da Retina de Aves. Dissertação de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, 2003.
- PATERNAIN, A.V., MORALES, M., LERMA, J. Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron*, v. 14, p. 185-189, 1995.
- PEARSON, R. The Avian Eye and Vision. In: _____. *The Avian Brain*. Academic Press, 1972. cap. 9, p. 279-317.
- PENG, Y.-W., BLACKSTONE C.D., HUGANIR R.L., YAU, K.-W. Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience*, v. 66, p. 483-497, 1995.

- PEROUTKA, S.J., LEBOVITZ, R.M., SNYDER, S. H. Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions. *Science*, v. 212, p. 827-829, 1981.
- PEROUTKA, S.J., SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: Differential binding of [3H]5-Hydro-xytryptamine, [3H]lysergic acid and [3H]spiroperidol. *Molec. Pharmac.*, v. 16, p. 687-689, 1979.
- RAMAMOORTHY, S., BLAKELY, R.D. Phosphorilation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*, v. 285, p. 763-766, 1999.
- RAMÓN y CAJAL, S. La rétine des vertébrés. *La Célule*. v. 9, p.119-257, 1892.
- RÍOS, H., BRUSCO, A., PECCI SAAVEDRA, J. Development of serotonergic chick retinal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 15(6), p. 729-738, 1997.
- RODIECK, R.W. The Vertebrate Retina. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1998.
- SAITO, T. Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina. *Vision Res.*, v. 27, p. 135-142, 1987.
- SCHUETTE, E., CHAPPELL, R.L. Excitatory amino acids and serotonin uptake blockers reveal two physiologically distinct serotonin systems in the retina of the skate, *Raja erinacea*. *Int. J. Neurosci.*, v. 95(1-2), p. 115-132, 1998.
- SCHÜTTE, M. Serotonergic and serotonin-synthesizing cells of the *Xenopus* retina. *Int. J. Neurosci.*, v.78(1-2), p. 67-73, 1994.

- SCHÜTTE, M., WEILER, R. Morphometric Analysis of Serotonergic Bipolar Cells in the Retina and Its Implications for Retinal Image Processing. *J. Comp. Neurol.*, v. 260, p. 619-626, 1987.
- SCHÜTTE, M., WITKOVSKY, P. Serotonin-like immunoreactivity in the retina of the clawed frog *Xenopus laevis*. *J. Neurocytol.*, v.19(4), p. 504-518, 1990.
- SEEBURG, P.H. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.*, v. 16, p. 359-365, 1993.
- SILLMAN, A.J. Avian vision. In: FARNER, D.S., KING, J.R. Avian Biology. New York, Academic Press, 1973, p. 349-387.
- STEINBUSCH, H.W.M. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, v. 6, p. 557-618, 1981.
- SUCHER, N.J., AKBARIAN, S., CHI, C.L., LECLERC, C.L., AWOBULUYI, M., DEITCHER, D.L., WU, M.K., YUAN, J.P., JONES, E.G., LIPTON, S.A. Developmental and Regional Expression Pattern of a Novel NMDA Receptor-like Subunit (NMDAR-L) in the Rodent Brain. *J. Neurosci.*, v. 75(10), p. 6509-6520, 1995.
- SUCHER, N.J., KOHLER, K., TENNETI, L., WONG, H.K., GRÜNDER, T., FAUSER, S., WHEELER-SCHILLING, T., NAKANISHI, N., LIPTON, S.A., GUENTHER, E. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit NR3A in the Retina: Developmental Expression, Cellular Localization, and Functional Aspects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 44(10), p. 4451-4456, 2003.
- SUR, C., BETZ, H., SCHLOSS, P. Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neuroscience*, v. 73, p. 217-231, 1996.

- SWANSON, G.T., GREEN, T., SAKAI, R., CONTRACTOR, A., CHE, W., KAMIYA, H., HEINEMANN, S. Differential Activation of Individual Subunits in Heteromeric Kainate Receptors. *Neuron*, v. 34, p. 589–598, 2002.
- TAPIA, R., ARIAS, C. Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 1169-1178, 1982.
- TARNAWA, I., BERZSENYI, P., ANDRÁSI, F., BOTKA, P., HÁMORI, T., LING, I., KÖRÖSI, J. Structure-activity relationships of 2,3-benzodiazepine compounds with glutamate antagonistic action. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, v. 3(1), p. 99-104, 1993.
- THOMAS, K.B., TIGGES, M., IUVONE, P.M. Melatonin synthesis and circadian tryptophan hydroxylase activity in chicken retina following destruction of serotonin immunoreactive amacrine and bipolar cells by kainic acid. *Brain Res.*, v. 601, p. 303-307, 1993.
- THORESON, W.B., WITKOVSKY, P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Ret. Eye Res.*, v. 18(16), p. 765-810, 1999.
- VICENTIC, A., BATTAGLIA, G., CARROLL, F.I., KUCHAR, M.J. Serotonin transporter production and degradation rates: studies with RTI-76. *Brain Res.*, v. 841, p. 1-10, 1999.
- VILLAR, M.J., VITALE, M.L., PARISI, M.N. Dorsal raphe serotonergic projection to the retina. A combined peroxidase tracing neurochemical/high performance liquid chromatography study in the rat. *Neuroscience*, v. 22, p. 681-686, 1987.
- WÄSSLE, H., BOYCOTT, B.B. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.*, v. 71, p. 447-480, 1991.

- WATKINS, J.C., JANE, D.E. The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p. S100–S108, 2006.
- WATT, C.B., WILSON, E.A. Synaptic organization of serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina. *Neuroscience*, v. 35, p. 715-723, 1990.
- WEAKLY, J.N. The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. *J. Physiol.*, v. 234, p. 597-612, 1973.
- WEILER, R., SCHÜTTE, M. Kainic acid-induced release of serotonin from OFF-bipolar cells in the turtle retina. *Brain Res.*, v. 360(1-2), p. 379-383, 1985a.
- WEILER, R., SCHUTTE, M. Morphological and pharmacological analysis of putative serotonergic bipolar and amacrine cells in the retina of a turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *Cel Tissue Res.*, v. 241, p. 373-382, 1985b.
- WILHELM, M., ZHU, B., GÁBRIEL R., STRAZNICKY, C. Immunocytochemical identification of serotonin-synthesizing neurons in the vertebrate retina: A comparative study. *Exp. Eye Res.*, v. 56(2), p. 231-240, 1993.
- WITKOWSKY, P., ELDRED, W., KARTEN, H.J. Catecholamine and indoleamine-containing neurons in the turtle retina. *J. Comp. Neurol.*, v. 228, p. 217-225, 1984.
- WORRALL, D.M., WILLIAMS, D.C. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochem. J.*, v. 297, p. 425-436, 1994.

ANEXOS

ANEXO (Figura A)

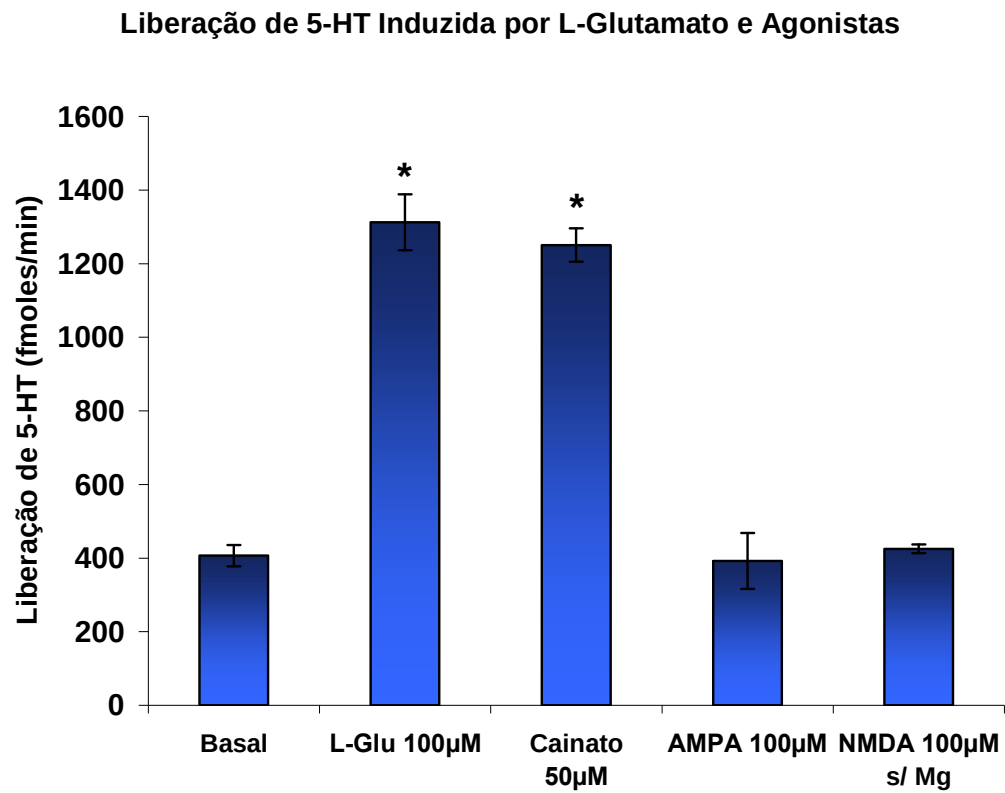


Figura A. Aumento na liberação [^3H]5-HT induzido por L-glutamato e agonistas em culturas celulares de retina de embriões de galinha (ANOVA, $*p < 0.01$ em relação à liberação basal).

ANEXO (Figura B)

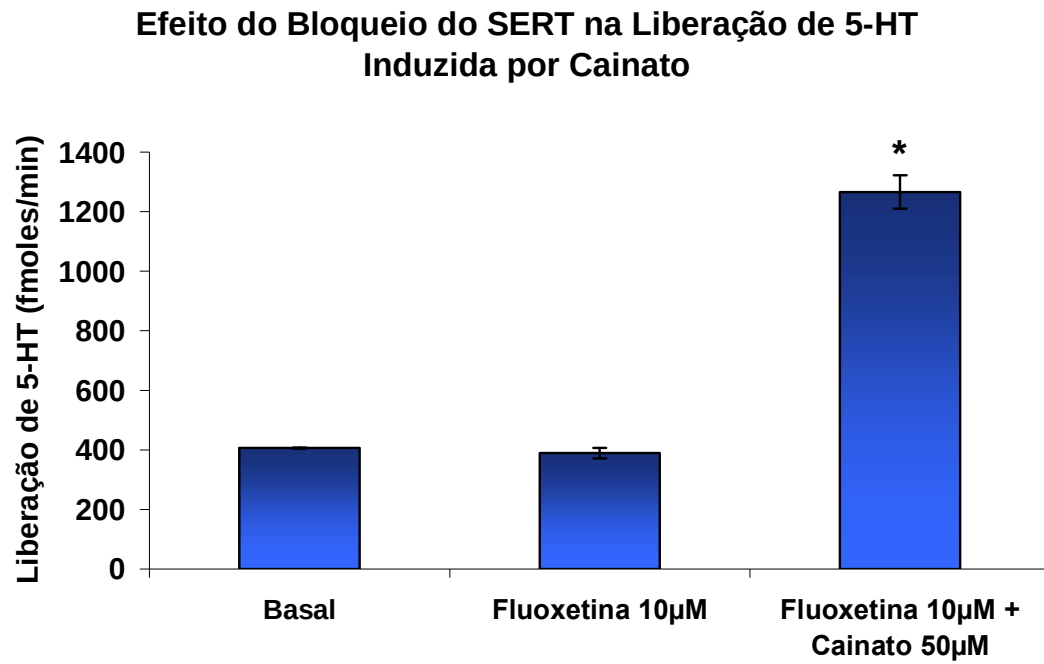
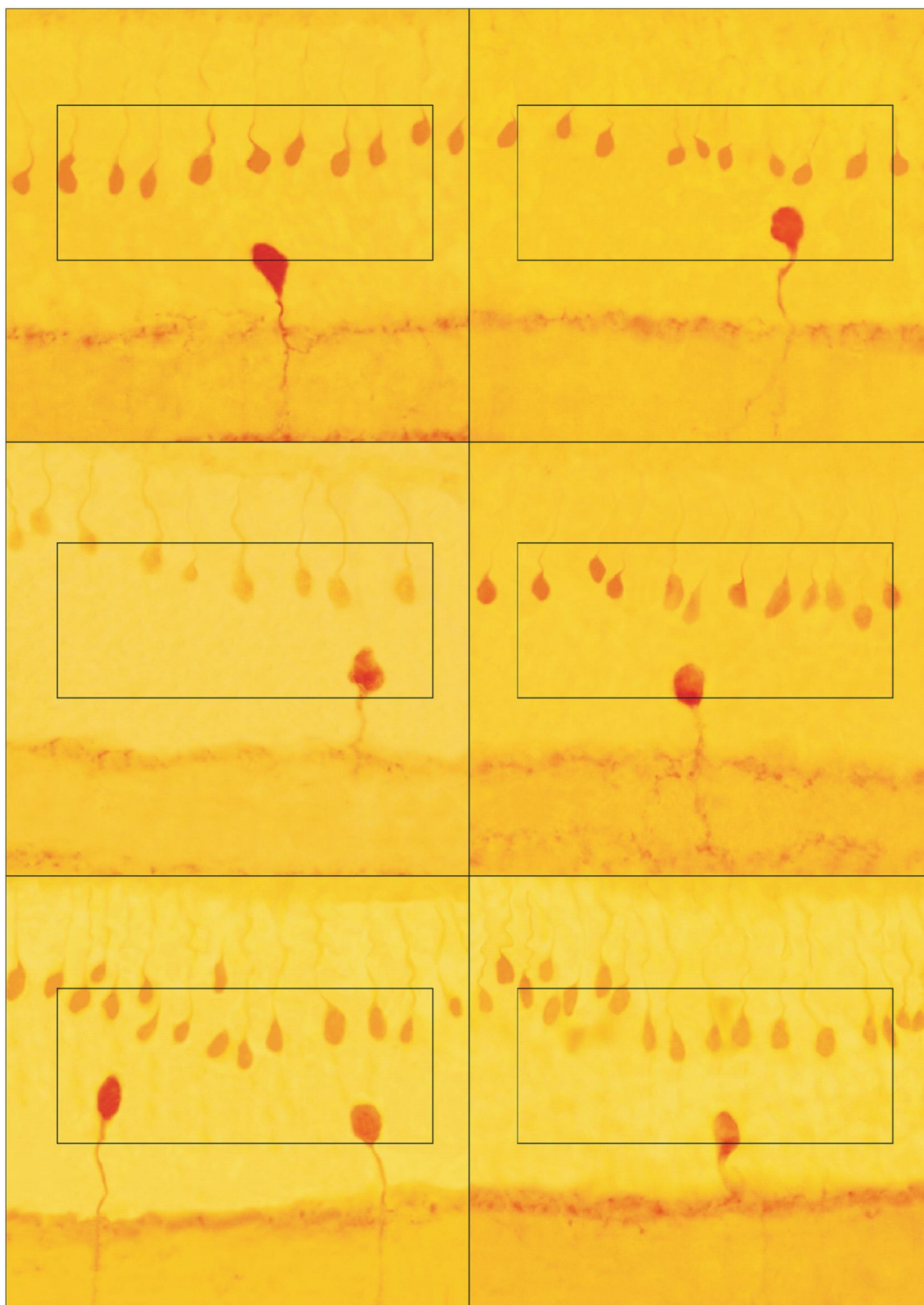
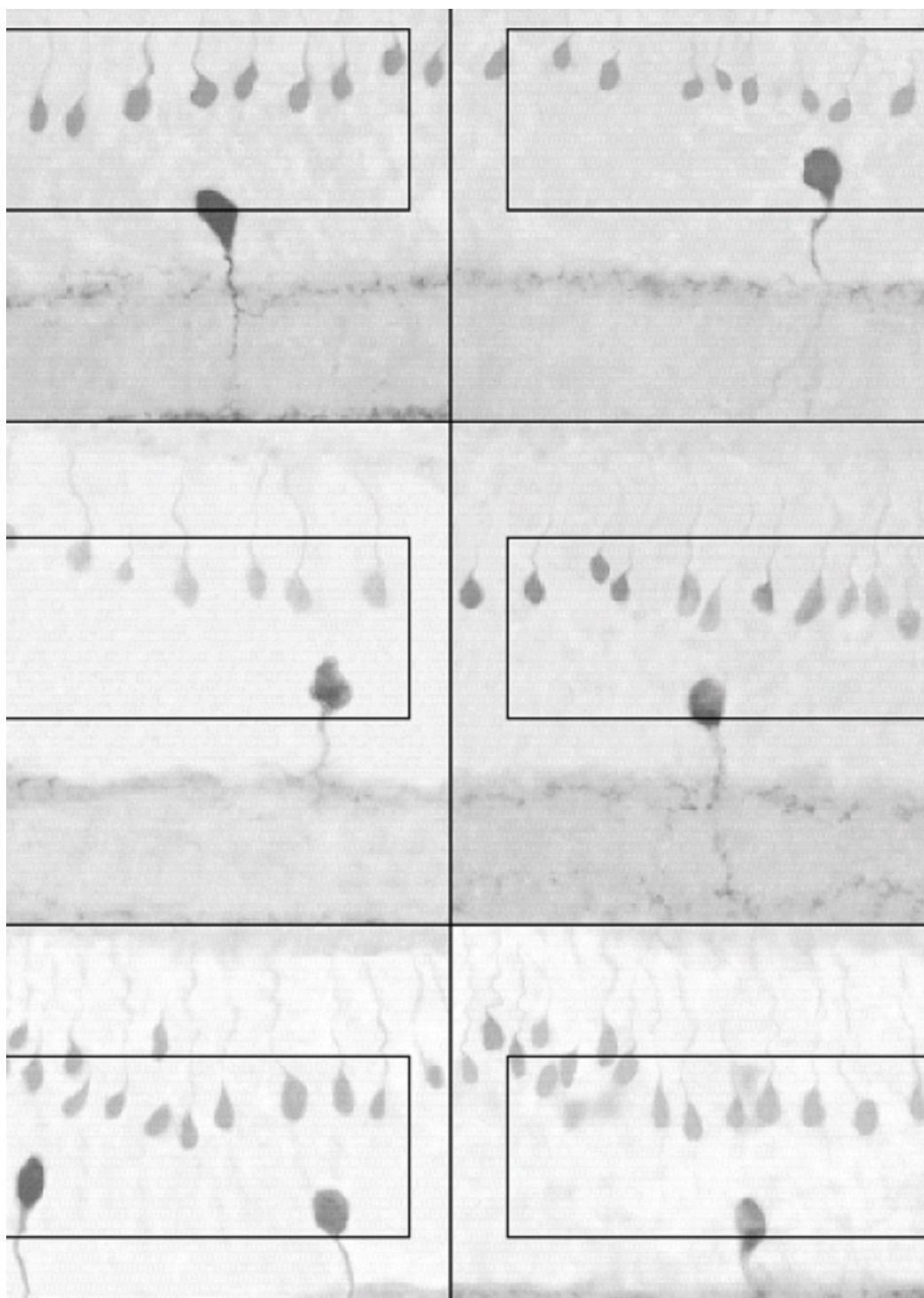
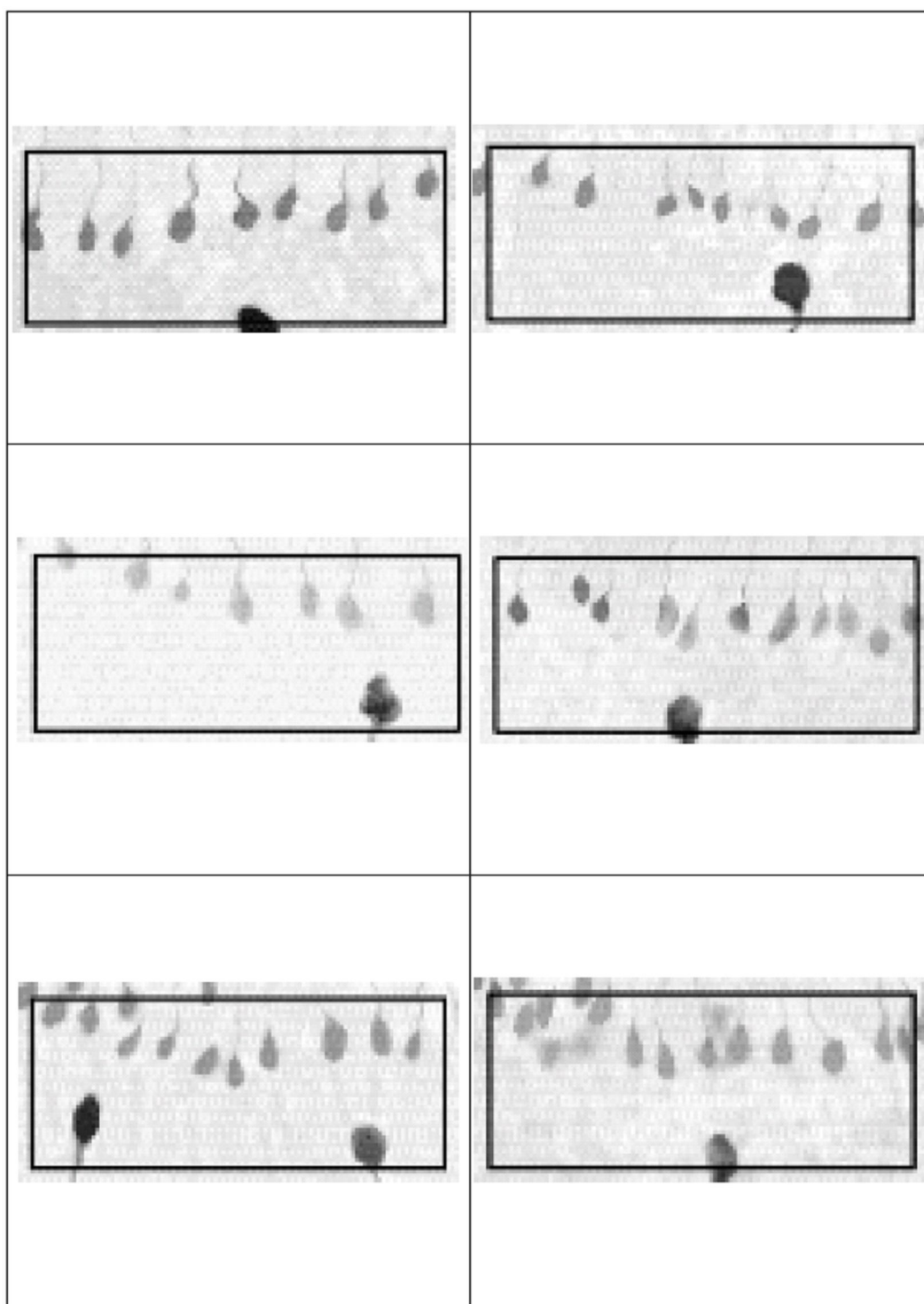


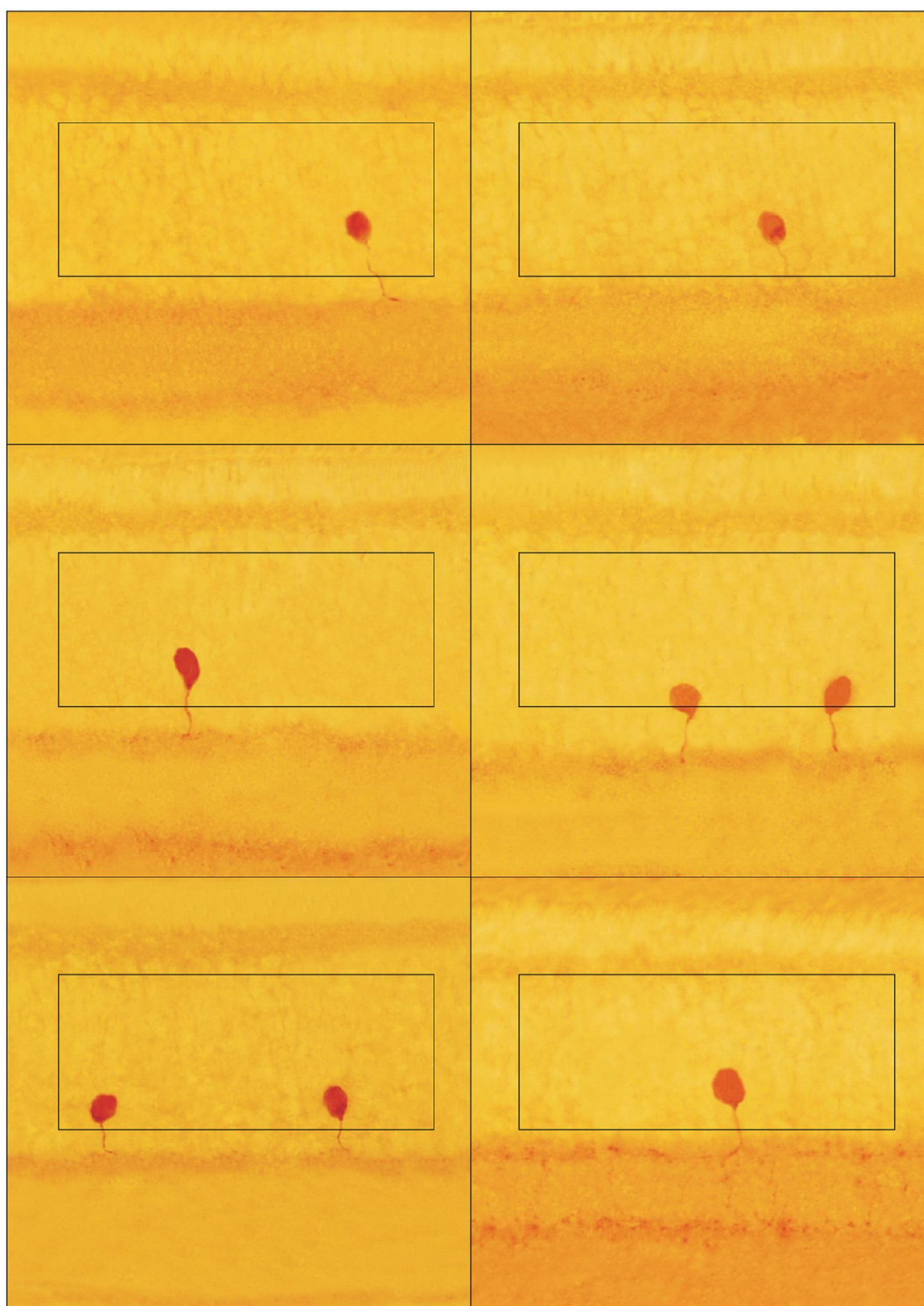
Figura B. Efeito da fluoxetina sobre a liberação de [3 H]5-HT induzida por cainato em culturas celulares de retina (ANOVA, * $p < 0.01$ em relação à liberação basal).

ANEXO (Figura C)**Densitometria****CONTROLE**

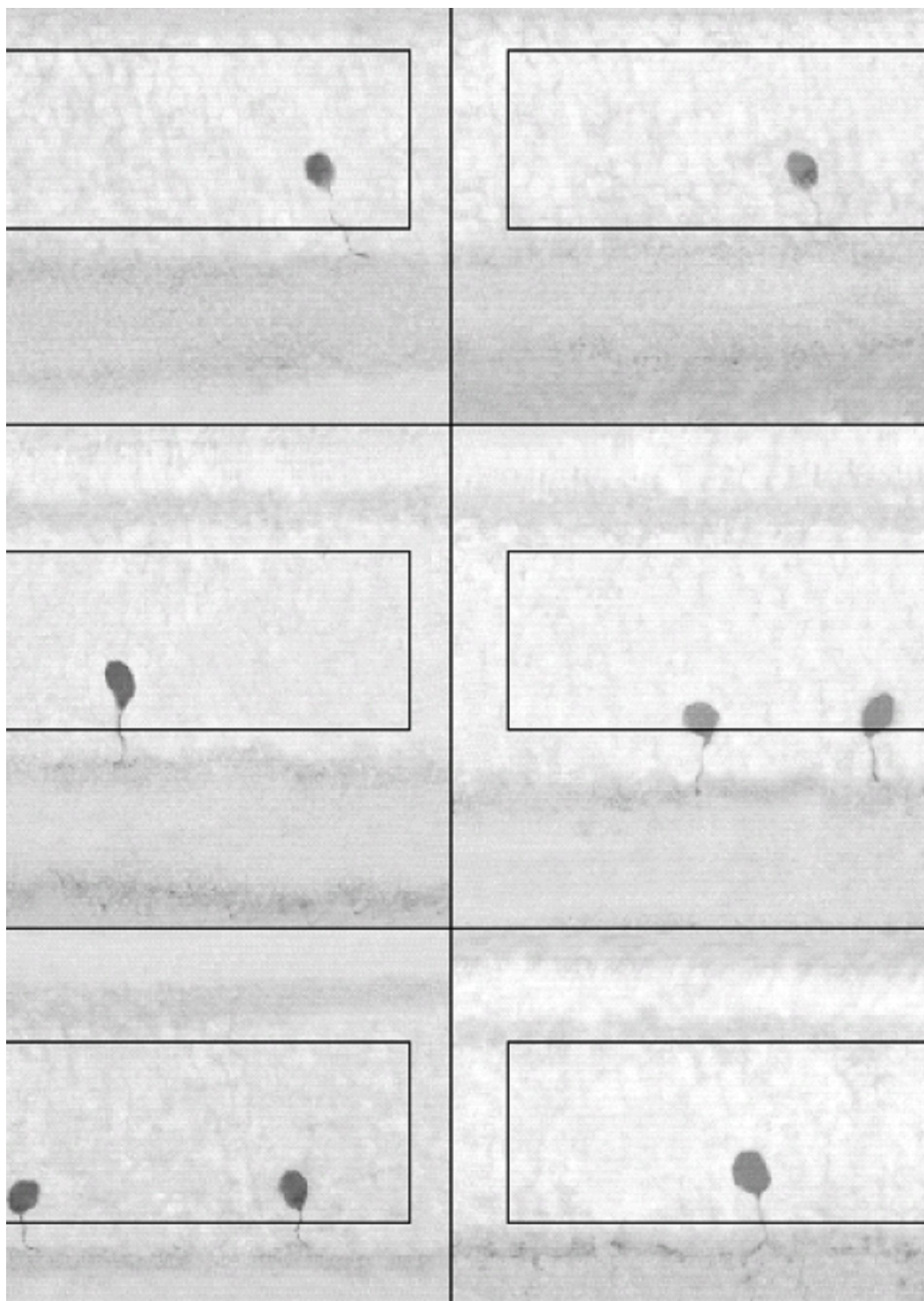
**CONTROLE**



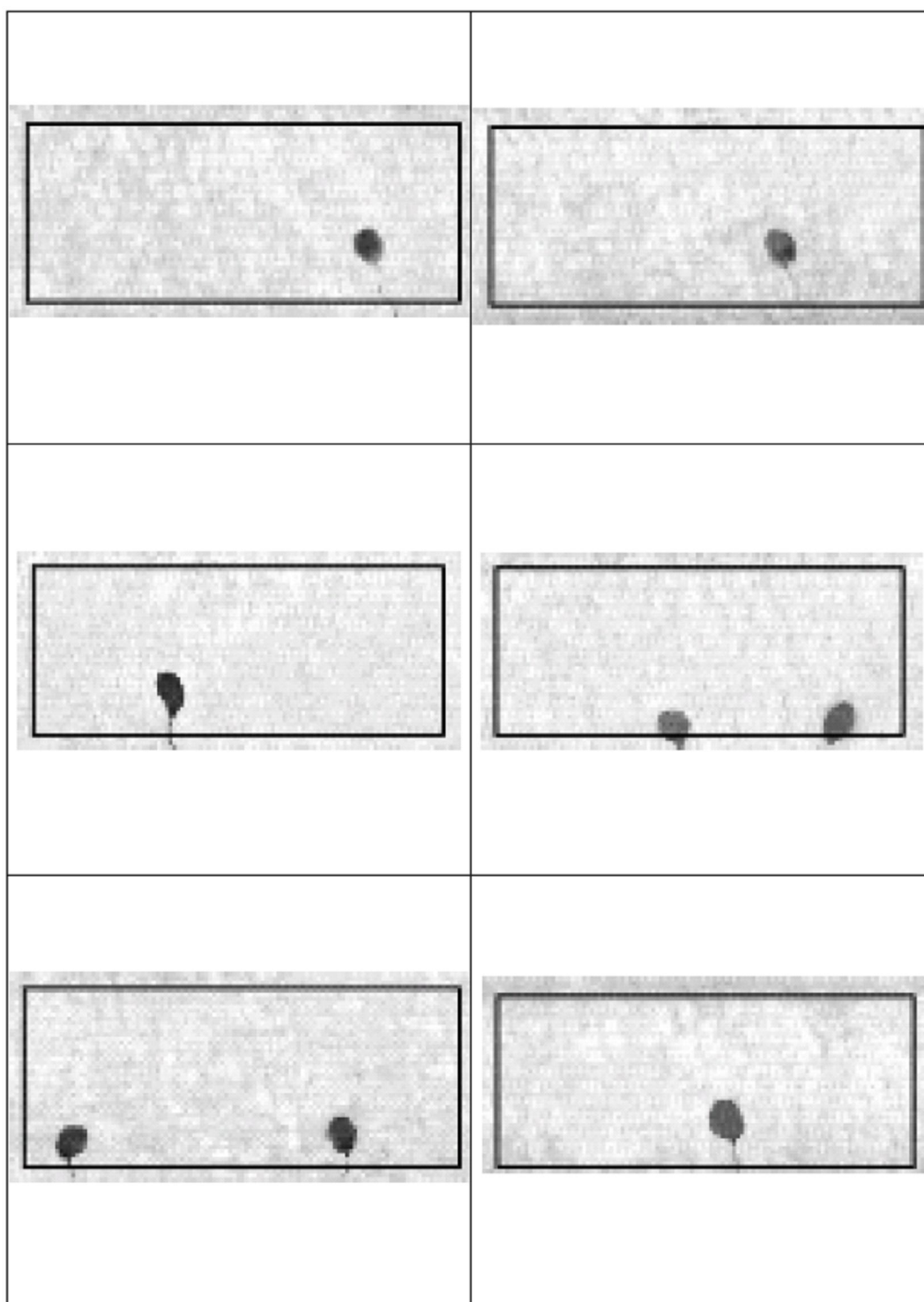
CONTROLE



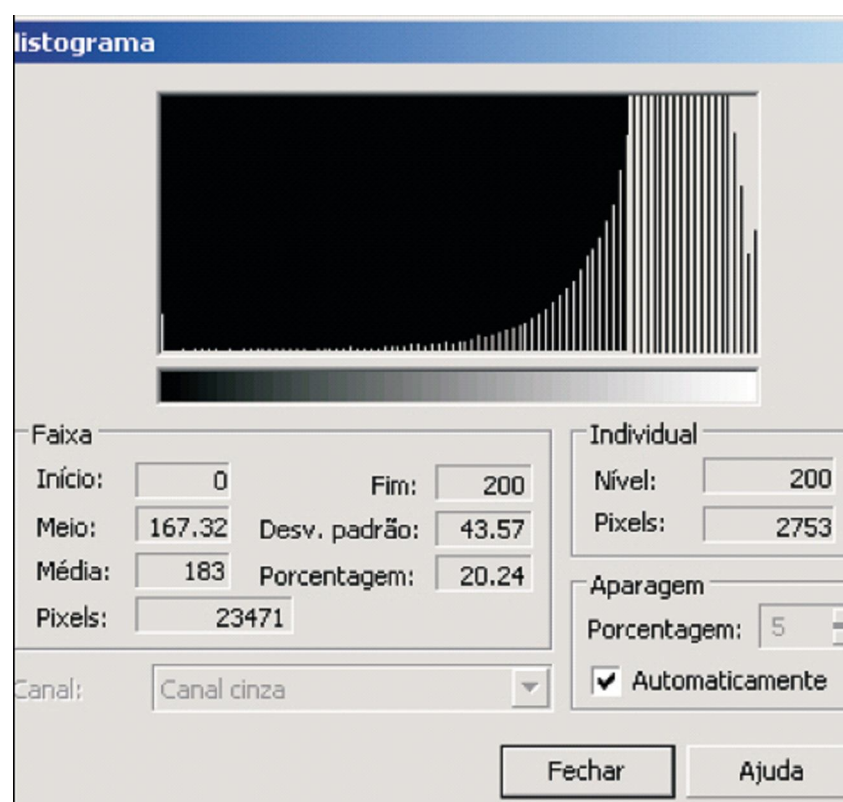
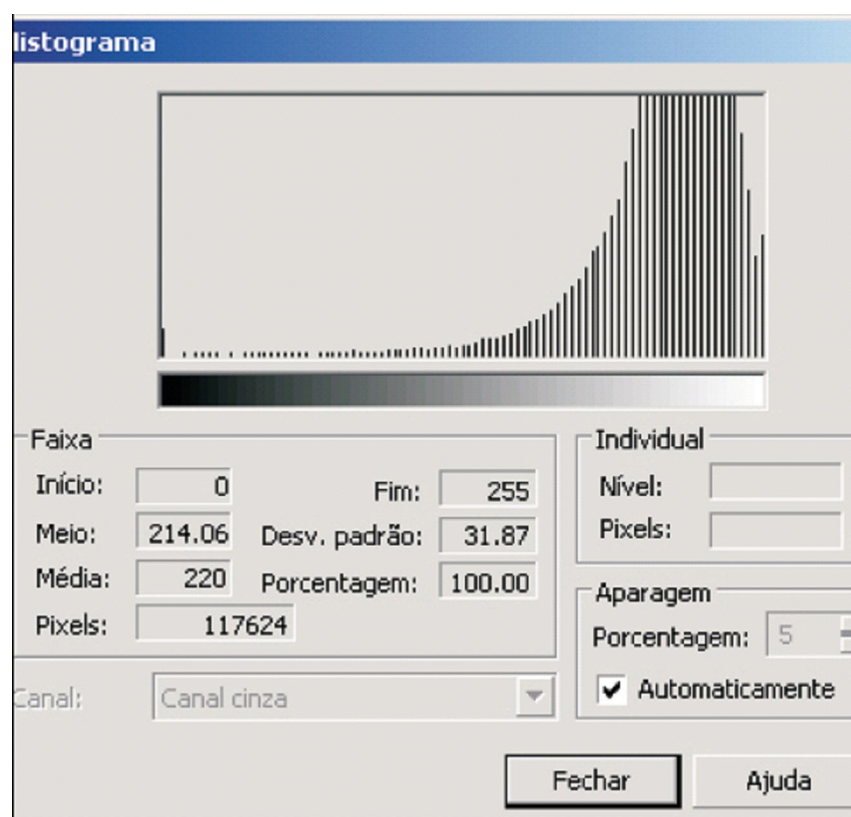
KA 10 μ M



KA 10 μ M



KA 10 μ M



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](#)