

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

TIAGO DE LIMA PEREIRA

**EFEITO MODULADOR DA GLUTATIONA NA LIBERAÇÃO DE
GABA INDUZIDA POR GLUTAMATO EM RETINAS DE EMBRIÃO
DE GALINHA.**

**BELÉM
2012**

TIAGO DE LIMA PEREIRA

**EFEITO MODULADOR DA GLUTATIONA NA LIBERAÇÃO DE
GABA INDUZIDA POR GLUTAMATO EM RETINAS DE EMBRIÃO
DE GALINHA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisição final à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular.

ORIENTADOR: Dr. ANDERSON MANOEL HERCULANO OLIVEIRA DA SILVA

BELÉM

2012

TIAGO DE LIMA PEREIRA

**EFEITO MODULADOR DA GLUTATIONA NA LIBERAÇÃO DE
GABA INDUZIDA POR GLUTAMATO EM RETINAS DE EMBRIÃO
DE GALINHA.**

Data de aprovação: ____/____/____

Conceito: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – Orientador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes - Examinador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof.^a Dra. Karen Renata Matos Oliveira - Examinador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista – Suplente
ICB - Universidade Federal do Pará

*À Deus, que é o responsável por tudo
que tenho e que sou, e à minha
família que é o alicerce da minha vida.*

.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por te me sustentado nesta incessante jornada, por me erguer nos momentos em que tudo parecia estar acabado ou sem solução, e que nunca me deixou desistir independente das circunstâncias. A Ti Senhor a minha gratidão!

Às minhas mães **Dalva** e **Delma**, que sempre sonharam os meus sonhos, viveram a minha vida, e nunca mediram esforços para cooperar, da forma mais amorosa possível, para o meu sucesso. Às minhas irmãs **Dauana** e **Silvana** que são presentes de Deus na minha vida. A estas mulheres, o meu amor!

Ao meu orientador **Anderson Herculano**, idealizador deste projeto, por confiar em mim à realização deste trabalho, pela amizade e pelas “brincadeiras e esculhambações” que de alguma forma surtiram efeito na minha vida. Valeu chefe!

Ao meu grande amigo-irmão **Edinaldo**, pela ajuda nos experimentos, pela consideração, parceria, sincera amizade e apoio em todos os momentos, durante todos estes anos. A toda a sua família que sempre me acolheu com muito afeto.

A todos os meus tios que são espelhos pra mim e que me têm como seus filhos: **Djalma, Hélio, Camilo, Hilda, Cleide, Deize, Dircy e Dilma**. Aos meus quase 100 primos (risos), pelas bagunças que tornaram os meus dias mais divertidos, em especial: **Jordânia, Leslie, Rafael, Jordão, Marcelo e Cíntia**.

Aos meus avós *in memoriam* **Geminiano, Lindalva e Palmira**, por participarem da minha criação e caráter, mesmo ausentes fisicamente, sempre estiveram presentes no meu coração.

Aos imensuráveis amigos que vivenciaram a minha história e que sempre me fazem rir, independentemente da situação. *G8 + Brasil*: **Andréa, Débora, Flávia, Jacqueline, Laura, Rosi e Valeska**. *Farmacotóxicos*: **Renata, Reinaldo, Aline, Inayane, Gerciane, Mariely, Karenn e Adriano**. *Euclidianos*: **Thyago, Matheus, Firmino, Dickson, Brenda, Mayara, Emanuel, Luciara, Lívia, Izabor, Anderson, Júnior, Silvinha, Carol, Igor e Leandro**. Além de

Tiago Luz, Aline Raiol, Hellen Oliveira e Glayci Gonçalves. A vocês, a minha sincera amizade!

À amiga **Aline Brasil** pela amizade e colaboração na confecção deste trabalho. Ao **Pr. Mauro**, por ser como um pai pra mim, amparando e aconselhando com sábias palavras nos momentos difíceis.

Aos membros da banca **Dra. Karen Renata e Dr. Bruno Gomes** pelas dicas e contribuições na elaboração deste estudo. Ao **Prof. Domingos** e a **Prof. Elena Crespo-López** pelo apoio oferecido neste projeto. Aos mestres **Luís Antônio e Alan Grisólia** pela ajuda durante a confecção deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Neuroendocrinologia pela convivência e ajuda experimental. Aos integrantes do Laboratório de Neuroquímica e do Laboratório de Farmacologia Molecular, especialmente **Rogério e Alan**, pela amizade e apoio neste trabalho.

A **CAPES/UFPA** pelo financiamento deste projeto.

A todos os que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste estudo.

RESUMO

O ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato são, respectivamente, os principais neurotransmissores inibitório e excitatório no Sistema Nervoso Central (SNC) e são fundamentais para o processamento visual. Estudos revelam que o glutamato induz liberação de GABA na retina. Trabalhos prévios também apontam que compostos tióis regulam a liberação de GABA, mas ainda não são totalmente esclarecidos os efeitos de tióis (-SH) sobre os níveis endógenos deste neurotransmissor na retina. Neste intermédio, a glutathiona (GSH) além de ser o mais importante dos compostos tióis, vem demonstrando exercer um papel neuromodulador na liberação de neurotransmissores. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar um possível efeito modulador de GSH sobre a liberação de GABA mediada por glutamato em retinas de embrião de galinha. Para isso, utilizamos como modelo experimental tecido retiniano íntegro de embrião de galinha, com sete ou oito dias de desenvolvimento. Nos ensaios de liberação de GABA, as retinas foram tratadas com GSH (100 e 500 μ M); glutamato (50 e 500 μ M) e Butionina Sulfoximina (BSO), inibidor da síntese de glutathiona, (50 μ M) por 15 minutos, e os níveis de GABA liberado para o meio extracelular foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Para experimentos de liberação de compostos tióis (-SH), as retinas foram incubadas com glutamato (100 μ M) com ou sem Na^+ por 15 minutos, e os seus níveis extracelulares foram determinados pela reação com DTNB e quantificados por espectrofotometria (412 nm). Os resultados revelam que o glutamato, assim como GSH, liberam GABA. Nossos dados também demonstram que BSO atenua a liberação de GABA promovida por glutamato. Além disso, demonstramos que glutamato induz liberação de compostos tióis independentemente de sódio. Sendo assim, é sabido que glutamato é capaz de liberar GABA e tióis; dentre estes, GSH é o mais abundante e responsável por também liberar GABA. Sabe-se também que uma vez inibida a síntese de GSH por BSO, a liberação de GABA induzida por glutamato é atenuada. Então, se sugere uma possível modulação de GSH na liberação de GABA induzida por glutamato, em retinas íntegras de embrião de galinha.

Palavras-chave: GABA; glutathiona; glutamato; liberação; retina.

ABSTRACT

The γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate are, respectively, major inhibitory and excitatory neurotransmitters in the central nervous system (CNS) and are essential to the visual processing. Studies show that glutamate induces the release of GABA in the retina, but the mechanisms involved in this release are not well elucidated. Previous work also showed that thiols compounds regulate GABA release, but are not well defined the effects of compounds containing sulfhydryl (-SH) on endogenous levels of this neurotransmitter in the retina. In this context, glutathione (GSH) besides being the most important thiols compounds, have demonstrated perform a neuromodulatory role in the release of neurotransmitters. Thus, the objective of this study was to evaluate a possible modulatory effect of GSH on the release of GABA mediated by glutamate in the retina of chick embryo. For this study, we used as experimental model, retinal tissue intact chick embryo, with seven or eight days of development. In tests of release of GABA, the retinas were treated with GSH (100 and 500 μ M), glutamate (50 and 500 μ M) and Buthionine Sulfoximine (BSO), an inhibitor of glutathione synthesis, (50 μ M) per 15 minutes, and GABA levels released into the extracellular medium were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For release experiments of thiols compounds, the retinas were incubated with glutamate 100 μ M (with or without Na⁺) per 15 minutes, and their extracellular levels were determined by reaction with DTNB and quantified by spectrophotometry (412 nm). The results show that glutamate, as well as GSH, release GABA. Our data also show that BSO attenuates the release of GABA promoted by glutamate. Furthermore, we demonstrate that glutamate induces release of thiol compounds regardless of sodium. Therefore, it is known that glutamate is able to release thiols and GABA, among them, GSH is most abundant and responsible for also release GABA. It is also known that once inhibited GSH synthesis by BSO, the release of GABA induced by glutamate is attenuated. Then, it is suggested a possible modulation of GSH in the release of GABA induced by glutamate in retina intact chicken embryo.

Keywords: GABA; glutathione; glutamate; release; retina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da organização estrutural da retina, evidenciando suas camadas e constituintes celulares (YANG, 2004).....	19
Figura 2: Estrutura química do tripeptídeo glutationa, mostrando seus aminoácidos constituintes e evidenciando o grupo sulfidríla (-SH). (http://www.marvial.oi.com.br/engqui/topicos/quimbiol11.html) Acessado em 21 de Outubro de 2011.....	20
Figura 3: Interconversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GPx), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR) (http://btdt.ufal.br/tde_busca/arquivo). Acessado em 22 de Outubro de 2011.....	22
Figura 4: Estrutura química do glutamato (http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Glutamato.php). Acessado em 22 de Outubro de 2011.....	26
Figura 5: Sinapse glutamatérgica, evidenciando seus receptores e transportadores (http://www.inecusp.org/cursos/cursoll/principais_neurotransmissores_excitatorios_inibitorios.htm). Acessado em 10 de Maio de 2012.....	27
Figura 6: Biossíntese do neurotransmissor GABA (Adaptado de http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Glutamato.php). Acessado em 22 de Outubro de 2011.....	30
Figura 7: Vias de transporte e metabolismo do GABA. (Adaptado de http://www.nature.com). Acessado em 30 de Outubro de 2011.....	31
Figura 8: Desenho esquemático da estrutura molecular de receptores de GABA (Adaptado de http://www.ualg.pt/dmdocuments/biomedicas/gabaergic_synapses.pdf). Acessado em 21 de Outubro de 2011.....	33
Figura 9: Esquema ilustrativo do Sistema de Perinfusão.....	39
Figura 10: Cromatograma evidenciando os tempos de retenção da homosserina (padrão interno) e GABA (analito de interesse).....	44
Figura 11: Níveis extracelulares de GABA sob estímulo de glutamato nas concentrações de 50 e 500 μ M, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA, teste Tukey).....	48
Figura 12: Curso temporal da liberação basal de compostos contendo sulfidríla, em unidades de absorbância, mensurado por espectrofotometria.....	50
Figura 13: Análise temporal da liberação de compostos com sulfidríla, em unidades de absorbância, mediada por glutamato em meio com sódio e sem	

sódio, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * p < 0,01 vs. controle (ANOVA, teste Tukey).....	50
Figura 14: Níveis extracelulares de GABA induzido por glutamato nas concentrações de 100 e 500 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * p < 0,01 vs. controle (ANOVA, teste Tukey).	51
Figura 15: Diminuição dos níveis extracelulares de GABA, provocada por BSO 50 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * p < 0,01 vs. controle (ANOVA, teste Tukey).....	53
Figura 16: Efeito inibitório do BSO 50 µM nos níveis extracelulares de GABA induzidos por glutamato 500 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * p < 0,01 vs. Controle; # p < 0,01 vs. Glutamato (ANOVA, teste Tukey).....	53
Figura 17: Níveis extracelulares de GABA após exposição à ascorbato nas concentrações de 100 e 500 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8)	54
Figura 18: Teste de viabilidade celular pelo método de LDH entre os grupos controle, glutamato 500 µM e BSO 50 µM + glutamato 500 µM em retinas de embrião de galinha (E7/E8) (ANOVA, teste Tukey).....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E RETINA	17
2.2 GLUTATIONA (GSH).....	20
2.3 GLUTAMATO.....	26
2.4 ÁCIDO GAMA AMINO BUTÍRICO (GABA).....	30
2.4.1 RECEPTORES E TRANSPORTADORES DE GABA	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 EXPLANTE DE RETINAS DE EMBRIÃO DE GALINHA.....	37
4.2 SISTEMA DE PERINFUSÃO	38
4.3 MEDIDA DOS NÍVEIS DE COMPOSTOS TIÓIS	40
4.4 ENSAIO COM GLUTAMATO E GLUTATIONA.....	41
4.5 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE GLUTATIONA	41
4.6 ENSAIO COM ASCORBATO	42
4.7 ENSAIO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	42
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GABA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE).....	43
4.8.1 CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS	44
4.8.2 DERIVATIZAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA	45
4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNA	46
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA EM RETINAS EXPOSTAS A GLUTAMATO.....	48
5.2 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS TIÓIS INDUZIDA POR GLUTAMATO	49
5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA EM RETINAS EXPOSTAS A GLUTATIONA	51
5.4 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE GABA INFLUENCIADA POR BSO.....	52
5.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GABA MEDIADA POR ASCORBATO..	54
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	55

6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, que age como um potente antioxidante a nível sistêmico, além de ser um excelente agente redox, participando de inúmeros fenômenos biológicos importantes (DICKINSON & FORMAN, 2002). Sua estrutura química dispõe do grupamento sulfidríla (-SH), presente na molécula da cisteína, o qual lhe confere intensa reatividade e instabilidade (AOYAMA *et al.*, 2008).

Dentre seus constituintes moleculares, destacam-se a cisteína e o glutamato, ambos por exercerem papéis fundamentais em eventos farmacológicos no SNC. Tais compostos são capazes de interferir em receptores e transportadores, já que o primeiro dispõe de receptores sensíveis a ele, e o segundo apresenta um radical instável, que pode se ligar a uma variedade de receptores e/ou carreadores, afetando assim os mecanismos de transporte celular (JANAKY *et al.*, 1994; OJA *et al.*, 2000).

Amato *et al.*, 1999 reportam estas propriedades supracitadas, quando relatam que o grupamento sulfidríla de alguns tióis como a glutathiona, é capaz de se ligar, através de uma ponte dissulfeto, com determinadas subunidades de receptores GABA_A, modulando então a atividade destes. GSH pode também modular a atividade dos transportadores GAT 1, onde, semelhantemente, há uma ligação do tipo ponte dissulfeto, capaz de provocar mudanças conformacionais na estrutura química do transportador, bloqueando assim sua atividade (ZOMOT & KANNER, 2003).

Além disso, glutathiona pode influenciar alguns receptores glutamatérgicos, pois em sua composição química, há constituintes que atuam em tais receptores, sugerindo que esta se comporte como um neuromodulador, podendo exercer algum efeito sobre a liberação de neurotransmissores (LEVY *et al.*, 1991; OJA *et al.*, 2000).

Neste contexto, é sabido que o glutamato promove efluxo de glutathiona via transportador glutamatérgico do tipo GLAST (GARCIA *et al.*, 2011), e que é descrito um outro transportador que pode atuar liberando glutamato e captando cistina, que é convertida a cisteína, a qual servirá para a síntese de glutathiona, denominado sistema trocador glutamato-cistina (X_{CG}-) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Estes mecanismos de transporte celular estão envolvidos com alterações nos níveis extracelulares de neurotransmissores, dos quais o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), são relatados, respectivamente, como os principais neurotransmissores excitatório e inibitório do SNC, além de estarem fortemente correlacionados, já que GABA é sintetizado a partir de glutamato (FONNUM, 1984; ROBERTS, 1986; QUINLAN *et al.*, 1999).

O GABA está diretamente ligado à manutenção da homeostase celular, e seu desequilíbrio no SNC, pode levar ao surgimento de alguns transtornos neurológicos, tais como, epilepsia e esquizofrenia, o que torna este neurotransmissor importante no controle das funções cognitivas (TREIMAN, 2001; CONTI *et al.*, 2011).

Além disso, tal composto pode ser encontrado muito precocemente no SNC, incluindo a retina, geralmente no terceiro dia embrionário (E3), ainda durante a neurogênese, participando assim de fenômenos relevantes, como sobrevivência, proliferação, diferenciação neuronal e sinaptogênese (DA COSTA CALAZA *et al.*, 2000; ANGULO *et al.*, 2008; FERREIRO-GALVE, 2008; LASSOVÁ *et al.*, 2010).

A retina, assim como outras áreas que contém neurônios GABAérgicos, como hipocampo, córtex e cerebelo (YANG, 2004; MATTHEWS JR *et al.*, 2009), é um excelente modelo para a avaliação da comunicação celular no que tange a mecanismos de transporte de neurotransmissores.

No referido tecido, vários mecanismos de comunicação celular relacionados com o GABA são expressos, sejam por via sinalização vertical, entre neurônios de camadas teciduais diferentes (EGGERS & LUKASIEWICZ, 2011), ou via sinalização lateral, onde há conexão entre neurônios da mesma camada tecidual (CHÁVEZ *et al.*, 2010), eventos estes que geralmente decorrem de despolarização da membrana e, conseqüente liberação de GABA (BOUHOURS *et al.*, 2011).

Por conseguinte, Chávez *et al.*, 2006 demonstraram que a liberação de GABA dependente de cálcio, pode ocorrer não apenas por despolarização, mas também por influxo de Ca^{2+} , através da ativação de receptores

glutamatérgicos do tipo AMPA, liberação esta que pode ser amplificada pelo fenômeno bioquímico de liberação de cálcio induzida por cálcio.

Tais eventos citados anteriormente, acontecem quase sempre em células amácrinas e horizontais, essencialmente GABAérgicas e abundantes na retina (O'BRIEN & DOWLING, 1985; YAZULLA, 1986), sendo que a primeira subpopulação é amplamente conhecida por desencadear mecanismos de liberação de GABA dependentes de cálcio e a segunda, de maneira independente de cálcio (SCHWARTZ, 1982; MOSINGER *et al.*, 1986).

Diversos agentes podem promover a liberação deste neurotransmissor na retina, dentre estes, altas concentrações de K⁺ ou de aminoácidos excitatórios, promovendo despolarização da membrana (HOFMANN & MOCKEL, 1991), além de óxido nítrico e etanol via ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (MAGGESISSI *et al.*, 2009; POHL-GUIMARÃES *et al.*, 2010). Entretanto, destes agentes, o glutamato recebe destaque por participar de inúmeros eventos fisiológicos e farmacológicos no SNC.

Sabe-se que o glutamato induz liberação de GABA por uma via dependente de sódio e independente de cálcio, em culturas de retina de embrião de galinha, possivelmente por intermédio do transportador de GABA do tipo GAT 1 (DO NASCIMENTO *et al.*, 1998; CALAZA *et al.*, 2006). Todavia, o mais provável é que, como dito anteriormente, haja dois mecanismos de liberação de GABA induzida por glutamato, um dependente e outro independente de cálcio, e que tais mecanismos possam ocorrer simultaneamente.

Assim, o mecanismo independente de cálcio, porém dependente de sódio, ocorreria via GAT 1 como proposto por Do Nascimento *et al.*, 1998; e o mecanismo dependente de Ca²⁺, poderia ser decorrente de despolarização como previsto por Duarte *et al.*, 1992, ou via ativação de receptores glutamatérgicos, tanto do tipo AMPA, quanto do tipo NMDA (CHÁVEZ *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração todas as formas de comunicação celular e interações químicas citadas, a caracterização dos eventos farmacológicos e bioquímicos que envolvam a liberação do neurotransmissor GABA em neurônios, assim como, a análise da participação do glutamato e da glutatona neste sistema, se faz necessária uma compreensão da neuroquímica celular e

da elucidação dos mecanismos de transporte desenvolvidos pelos compostos em questão.

Desta forma, analisaremos neste estudo, a participação da glutathione na liberação de GABA induzida por glutamato, considerando o papel neuromodulador de GSH e a liberação de GABA induzida por glutamato, ambos relatados pela literatura, utilizando-se como ferramenta experimental a técnica de CLAE, e como modelo experimental, retinas íntegras de embrião de galinha.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E RETINA

O sistema nervoso central (SNC) é formado basicamente por dois tipos de células: os neurônios e as células da glia ou neuroglia. Cada neurônio do SNC é uma unidade sinalizadora capaz de gerar e conduzir eletricidade e possui morfologia adaptada para recepção, transmissão e processamento de sinais, já as células da glia estão associadas à sustentação, proteção e nutrição dos neurônios, participam também da recaptação de substâncias da fenda sináptica, além de servirem como preenchimento dos espaços entre os neurônios (BEAR *et al.*, 2008).

O SNC caracteriza-se por ser um aglomerado de estruturas, dispostas de forma bastante extensa e complexa, pelas quais as reações internas do indivíduo são correlacionadas e integradas, e através do qual são controlados seus ajustamentos ao meio ambiente (BERNE & LEVY, 2000).

As ligações entre as células são denominadas sinapses, as quais permitem a propagação do potencial de ação. Tais sinapses encontram-se principalmente no córtex cerebral e na retina, entre elas pode-se visualizar um espaço denominado fenda sináptica (BERNE & LEVY, 2000).

A retina se desenvolve a partir do ectoderma neural, que no embrião também originará as demais áreas cerebrais. Dentre todas as estruturas complexas do SNC, a retina é a que apresenta um maior número de vantagens para os estudos a cerca do desenvolvimento. Ela caracteriza-se por uma camada fina de tecido nervoso, localizada no fundo do globo ocular, capaz de converter energia luminosa em atividade neural. (RAMON Y CAJAL, 1892).

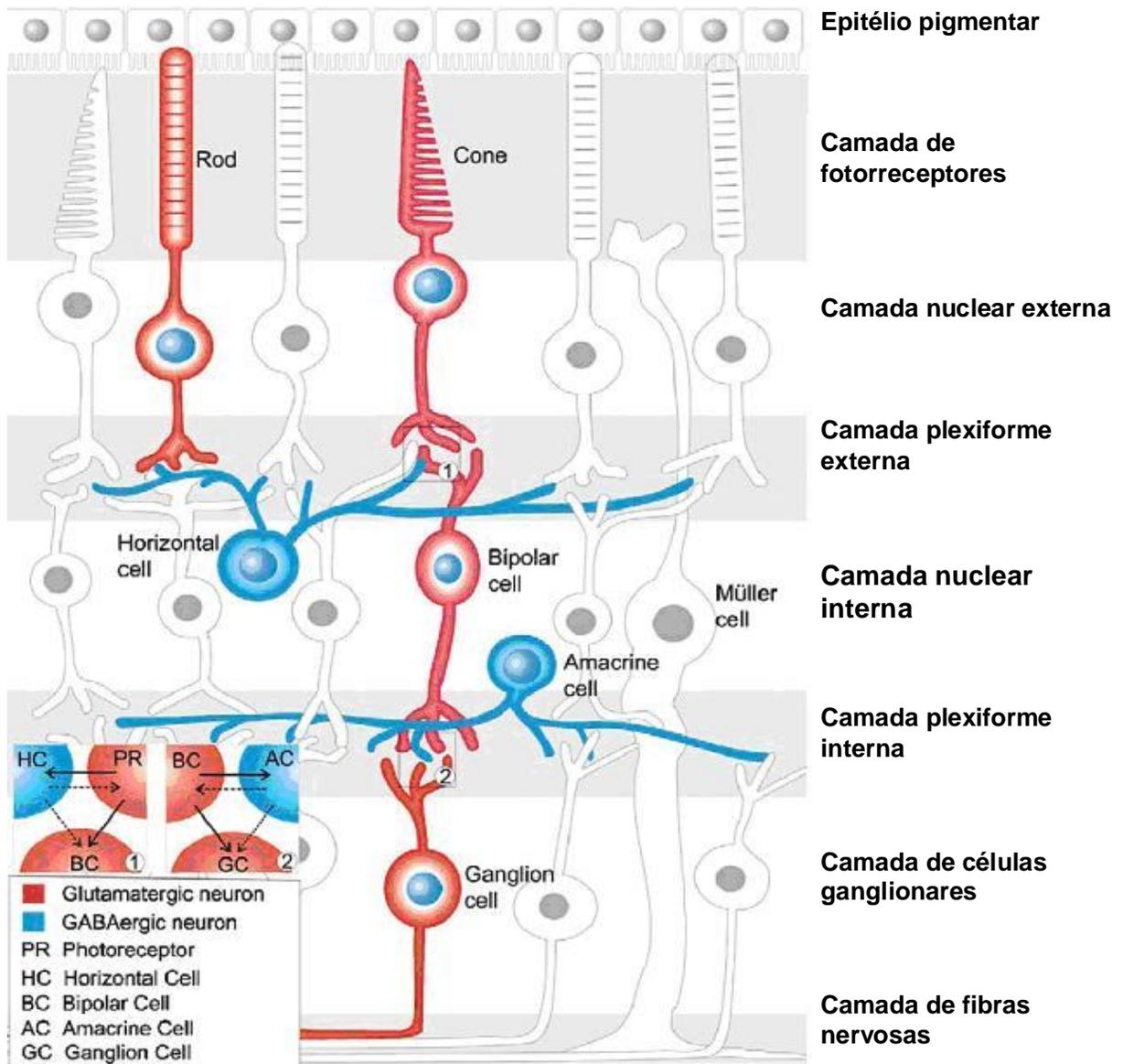
Como vantagens para este estudo, podemos citar sua localização periférica privilegiada permitindo fácil obtenção do tecido, livre de tecido conjuntivo adjacente e de outras populações neuronais e gliais. Esta característica, aliada a uma organização em camadas sinápticas e nucleares bastante semelhantes ao observado em outras estruturas do SNC, torna este

tecido um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e manutenção de células nervosas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ADLER, 1993; CEPKO, 1993; DOWLING, 1991).

Este modelo experimental é composto de aproximadamente 50 tipos de células neuronais diferentes, dos quais podemos citar células ganglionares, células bipolares, células amácrinas e células horizontais, sendo que uma única célula progenitora da retina pode originar qualquer um desses tipos celulares (DONOVAN & DYER, 2005).

A retina de vertebrados está organizada em cinco camadas principais, organizadas histologicamente da seguinte maneira: camada nuclear externa (CNE), onde encontramos os corpos celulares dos fotorreceptores: cones e bastonetes; camada plexiforme externa (CPE), na qual os prolongamentos de fotorreceptores, células bipolares e horizontais fazem conexões sinápticas entre si; camada nuclear interna (CNI), em que se encontram os corpos celulares de células bipolares, horizontais, amácrinas e de células ganglionares deslocadas; camada plexiforme interna (CPI), onde prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares fazem sinapse, e camada de células ganglionares (CCG), que além das células ganglionares, encontram-se os corpos de células amácrinas deslocadas (Figura 1) (DOWLING, 1991).

Embora tenha os mesmos tipos de elementos funcionais e neurotransmissores encontrados em outras áreas do SNC, especialmente o GABA, a retina compõe-se de apenas cinco classes neuronais, apresentando, de forma geral, apenas um tipo de célula glial: a célula de Müller, com exceção das retinas aviárias que dispõem também de astrócitos (NEWMAN & REICHENBACH, 1996).



Rod: Bastonetes; Cone: Cones; Horizontal cell: Células horizontais; Bipolar cell: Células bipolares; Amacrine cell: Células amácrinas; Müller cell: Células de Muller; Ganglion cell: Células ganglionares; Photoreceptor: Fotorreceptores; Glutamatergic neuron: Neurônio glutamatérgico; GABAergic neuron: Neurônio GABAérgico.

Figura 1: Desenho esquemático da organização estrutural da retina, evidenciando suas camadas e constituintes celulares (YANG, 2004).

2.2 GLUTATIONA (GSH)

A glutationa (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) ou GSH é um tiol de baixo peso molecular presente em células de mamíferos, numa concentração acima de 12 mM (KANNAN *et al.*, 1996; COOPER, 2006). É composta pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (Figura 02). Apresenta um grupamento sulfidríla (-SH) e uma ligação peptídica do tipo γ - glutamil entre o glutamato e a cisteína (AOYAMA *et al.*, 2008).

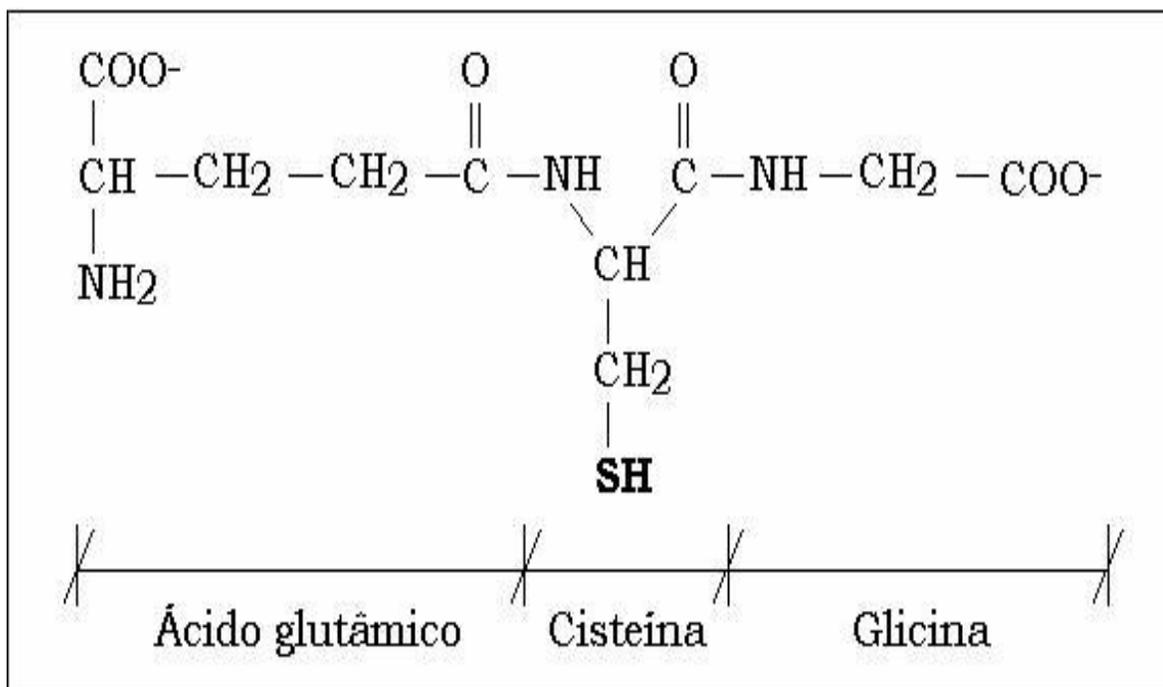


Figura 2: Estrutura química do tripeptídeo glutationa, mostrando seus aminoácidos constituintes e evidenciando o grupo sulfidríla (-SH).

(<http://www.marvial.oi.com.br/engqui/topicos/quimbiol11.html>).

Acessado em 21 de Outubro de 2011.

Este tripeptídeo é muito importante na defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ERO), e sua alta concentração intracelular protege contra as variedades de compostos oxidantes. Desta forma, GSH reage diretamente com radicais em reações não enzimáticas (SAEZ *et al.*, 1990; WINTERBOURN & METODIEWA, 1994).

Além disso, GSH atua como um doador de elétrons em reduções de peróxidos catalisados pela enzima glutathione peroxidase (GPx), a qual participa da reação de oxidação deste tripeptídeo, convertendo glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG), ação esta semelhante a da glutathione oxidase. Entretanto, este evento pode ser revertido pela glutathione redutase, com participação de NADPH como cofator, fenômeno conhecido como interconversão da glutathione (Figura 03) (CHANCE *et al.*, 1979).

Os danos herdados do metabolismo de GSH causam defeitos neurológicos severos, por isso ela é considerada um fator chave na defesa do organismo contra o peróxido de hidrogênio e outros metabólitos reativos (KANNAN *et al.*, 1996).

Esta propriedade reativa da glutathione é adquirida pelo resíduo – SH em sua estrutura, o qual lhe confere alta instabilidade química. Tal característica aliada com a localização central do grupamento tiol na estrutura química de GSH em reações bioquímicas e farmacológicas torna a glutathione um dos compostos mais participantes de fenômenos biológicos importantes (DICKINSON & FORMAN, 2002).

GSH é sintetizada em todas as células de mamíferos (MEISTER & TATE, 1976), tendo o fígado como local principal da sua biossíntese (DELEVE & KAPLOWITZ, 1991). Esta ocorre no citosol a partir de três aminoácidos precursores L-glutamato, L-cisteína e glicina (WANG & BALLATORI, 1998). Este processo se desenvolve pelas ações consecutivas de duas enzimas dependentes da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP): a γ -glutamylcisteína sintetase (GluCys sintetase) e a GSH sintetase (MEISTER & ANDERSON, 1983).

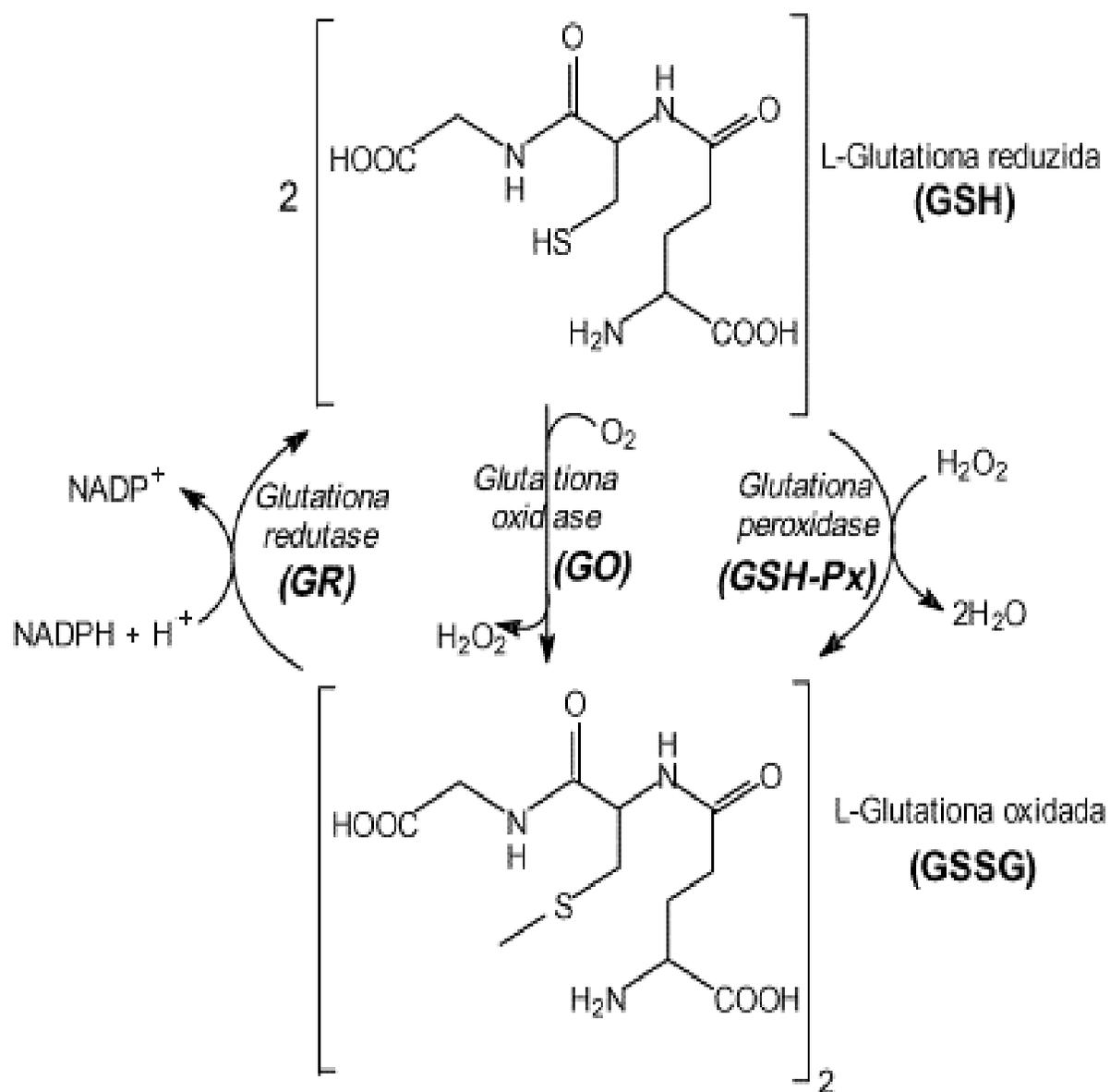


Figura 3: Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR) (http://bdtd.ufal.br/tde_busca/arquivo). Acessado em 22 de Outubro de 2011.

A primeira reação de síntese da GSH consiste na formação de ligação peptídica entre o aminoácido cisteína e o aminoácido ácido glutâmico, que é catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase, e a segunda reação consiste na formação de ligação peptídica entre o dipeptídeo já formado e o aminoácido glicina, catalisada pela GSH sintetase, e em todas as etapas ocorre hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico (WANG & BALLATORI, 1998).

Após sua síntese, ela é distribuída para alguns compartimentos subcelulares como retículo endoplasmático, mitocôndria, cloroplasto e núcleo celular, porém, provas experimentais sobre mecanismo de transporte entre o citosol e as organelas celulares ainda não são comprovadas (ROUHIER *et al.*, 2007). Além disso, GSH também é liberada para o espaço extracelular, a exemplo do plasma sanguíneo, para utilização por outras células e tecidos (BALLATORI *et al.*, 2008).

A estrutura de GSH tem duas características importantes, sendo uma delas a ligação peptídica entre o grupamento γ -carboxi terminal do ácido glutâmico e o grupamento amino terminal da cisteína, feita através do carbono gama do ácido glutâmico e não pelo carbono alfa, como ocorre comumente. Esta ligação peptídica garante resistência a GSH de ser degradada dentro da célula, sendo esta ligação quebrada apenas pela enzima γ -glutamil transpeptidase na superfície externa de certas membranas celulares (WANG & BALLATORI, 1998).

A γ -glutamil transpeptidase tem alta atividade no rim, pulmão e intestino e baixa atividade no tecido hepático e no músculo esquelético, sendo estes tecidos importantes fontes de GSH para o plasma (KRETZSCHMAR, 1996). A outra característica importante é a presença da glicina na posição γ -carboxi terminal, que protege GSH da degradação intracelular pela enzima γ -glutamil ciclotransferase (WANG & BALLATORI, 1998).

Quanto à degradação, ocorre exclusivamente no espaço extracelular por ação da γ -glutamiltranspeptidase (γ -GT) e das dipeptidases. A ectoenzima γ -GT, sob condições fisiológicas, remove o γ -glutamil da GSH, transferindo para uma molécula aceptora formando o dipeptídeo CysGly (cistenilglicina). Este por sua vez é hidrolisado por ação das dipeptidases, liberando os aminoácidos cisteína e glicina. Sendo assim, o γ -glutamil originará o glutamato que juntamente com a cisteína e a glicina, liberados na hidrólise da

cisteinilglicina, poderão ser reabsorvidos para dentro da célula para reiniciar o ciclo de síntese da GSH (DRINGEN, 2000).

O metabolismo deste composto pode ser considerado um processo multiórgão, já que a sua síntese ocorre principalmente no fígado, local este onde a degradação é muito lenta devido à baixa atividade da γ -glutamil transpeptidase, sendo esta com atividade bastante eficaz no rim. Desta forma, adota-se a nomenclatura multiórgão, pois o anabolismo ocorre no fígado e o catabolismo no rim e em outros tecidos (SASTRE *et al.*, 2005).

Devido à instabilidade do tripeptídeo, GSH pode ligar-se a receptores ionotrópicos de glutamato através de seu resíduo glutamyl, similarmente ao agonista natural L – glutamato. O segundo resíduo, a cisteína, é responsável pela reatividade do composto em questão, devido à baixa estabilidade do grupamento sulfidrílico contido em sua estrutura molecular. GSH pode ainda, a concentrações milimolares, influenciar o estado redox de receptores de glutamato por meio de seu grupo tiol livre. O terceiro componente da glutatona, a glicina, é o principal neurotransmissor inibitório da medula espinhal, e comporta-se também como um agonista nos receptores NMDA. (LEVY *et al.*, 1991).

Além das funções gerais relacionadas com GSH citadas anteriormente, este tripeptídeo parece possuir algumas funções específicas no SNC. GSH tem sido considerada um neuro-hormônio baseado nos seguintes aspectos: sua presença extracelular no cérebro; sua liberação em cortes cerebrais após estímulo; ligação específica deste tripeptídeo em sítios de ligação extracelulares; estímulo de sinais de transdução em astrócitos e indução de correntes de sódio no córtex (LEVY *et al.*, 1991; GUO *et al.*, 1992).

GSH é responsável pelo armazenamento e transporte da cisteína, já que este aminoácido é um dos principais fatores da propriedade antioxidante de GSH, reagindo diretamente com espécies reativas de oxigênio (ERO). É cofator para a glutatona S-transferase (GST), e para a glutatona peroxidase. Junto com o fosfato de nucleotídeo nicotinamida e adenina (NADPH), ela participa de reações redox, na qual GSH ao reduzir um composto, fica oxidada (WANG & BALLATORI, 1998; DRINGEN, 2000).

Muitas funções da molécula de GSH se dão graças ao componente cisteinil que carrega o grupo tiol reativo, dentre estas funções podemos citar: a

manutenção da estrutura e função de proteínas, através da redução de suas ligações dissulfeto; regulação da síntese e degradação de proteínas; síntese correta de DNA; manutenção do sistema imunológico; detoxificação de compostos químicos reativos, como xenobióticos; atuação na biossíntese de ácidos mercaptúricos; modulação de processos microtubulares e até mesmo formação da bile; regulação da expressão gênica da apoptose e do ciclo celular; além de transporte de membrana de moléculas endógenas e exógenas (WANG & BALLATORI, 1998; BALLATORI *et al.*, 2008).

No SNC, é considerado o peptídeo mais abundante (ORLOWSKI & KARKOWSKY, 1976), e pode ser encontrada tanto na forma reduzida (GSH) como na oxidada (GSSG), sendo que a maior parte está na forma reduzida (SLIVKA *et al.*, 1987). Estão presentes em ambos os espaços intra e extracelulares e têm sido histoquimicamente localizadas no epitélio e em células gliais e neuronais (axônios e nervos terminais) (HJELLE *et al.*, 1998).

Essas duas formas de glutatona caracterizam-se como o par redox melhor conhecido do corpo, por mérito do grupo sulfidril da molécula de GSH, que intracelularmente elimina os radicais livres, a exemplo do peroxinitrito (HEALES *et al.*, 1999), protege a membrana celular contra estresse oxidativo, DNA contra radiação e luz ultravioleta e a célula inteira contra xenobióticos (MEISTER & ANDERSON, 1983); entretanto, os possíveis papéis da glutatona extracelular ainda não são bem esclarecidos.

Além disso, a glutatona foi também implicada no mecanismo de uma série de transtornos neurológicos como esquizofrenia e mal de Parkinson (SIAN *et al.*, 1998), além de haver uma forte possibilidade de que a glutatona se comporte como um neurotransmissor ou um neuromodulador no SNC (OJA *et al.*, 2000). Isto reforça o que foi observado por Werman *et al.*, 1971: GSH está envolvida em alguns aspectos da liberação de neurotransmissores em anfíbios.

Por conseguinte, glutatona é capaz de interferir ativamente em receptores de glutamato, especialmente NMDA, devido à alta afinidade apresentada por seus constituintes moleculares, já que glutamato é seu agonista natural e cisteína contem o grupamento sulfidril, altamente instável; propriedades estas que lhe remetem um papel neuromodulador (JANAKY *et al.*, 1994; OJA *et al.*, 2000).

2.3 GLUTAMATO

O glutamato ou ácido glutâmico (Figura 04) é um aminoácido sintetizado principalmente a partir da glicose no Ciclo de Krebs, seja por transaminação do α -cetoglutarato por uma transaminase, desaminação de α -cetoglutarato pela glutamato desidrogenase, e ainda pode ser formado diretamente a partir da glutamina (DEUTCH *et al.*, 1999).

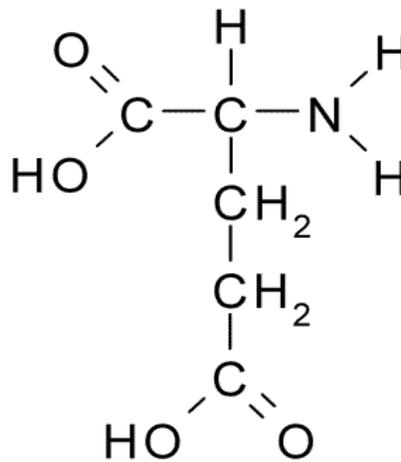


Figura 4: Estrutura química do glutamato
(http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Glutamato.php).
Acessado em 22 de Outubro de 2011

Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato pode se ligar a seus receptores no neurônio pós-sináptico; pode ser também recaptado pelo neurônio pré-sináptico; ou também captado pela glia num processo de alta afinidade que pode ser dependente ou não de sódio. Nas células gliais, o glutamato é transaminado pela glutamina sintetase para formar glutamina. A glutamina então é transportada para os terminais nervosos, sendo convertida em glutamato pela enzima glutaminase (Figura 05). Este ciclo é conhecido como “ciclo glutamato-glutamina” (SCHOUSBOE *et al.*; 1997).

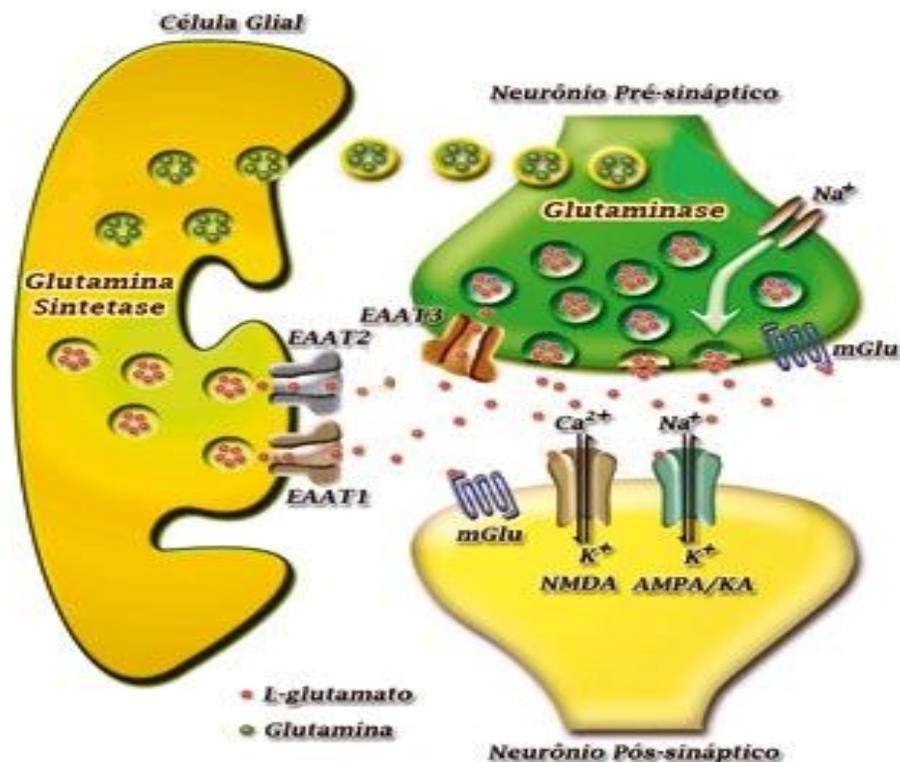


Figura 5: Sinapse glutamatérgica, evidenciando seus receptores e transportadores (http://www.inecusp.org/cursos/cursoll/principais_neurotransmissores_excitatorios_inibitorios.htm). Acessado em 10 de Maio de 2012.

Em condições normais, o glutamato localiza-se nos terminais pré-sinápticos, ficando estocado dentro de vesículas e sendo liberado na fenda sináptica após despolarização da célula, promovida por processos dependentes de cálcio, porém uma despolarização exacerbada leva a um acúmulo deste na fenda sináptica e, como consequência disto, a um quadro de excitotoxicidade (DANBOLT, 2001).

Este desequilíbrio no SNC acontece, pois altas concentrações de glutamato no ambiente neuronal podem induzir ativação excessiva dos seus receptores e desencadear processos mediados pelo cálcio, provocando assim a degeneração neuronal e morte celular. Sendo assim, os níveis extracelulares deste neurotransmissor são de suma importância para a manutenção da homeostase celular (GAGLIARDI, 2000).

O glutamato é continuamente liberado a partir de células nervosas após estímulo sináptico num processo dependente de cálcio e rapidamente é removido do meio extracelular (DANBOLT, 2001). Ao que parece, ainda não é sabido que exista alguma enzima extracelular que possa metabolizá-lo. Sendo assim, a única maneira rápida para retirar o glutamato do líquido extracelular circundante aos receptores é por captação (BALCAR & JOHNSTON, 1972; JOHNSTON, 1995).

No que diz respeito à sua participação em condições neuropatológicas, sabe-se que a toxicidade mediada pelo glutamato é potencialmente envolvida em casos agudos como isquemia e danos traumáticos cerebrais, além de casos crônicos, tais quais, esclerose amiotrófica lateral, mal de Parkinson e esquizofrenia (LIPTON & ROSENBERG, 1994); glaucoma, retinopatia diabética, mal de Alzheimer e doença de Huntington (SHELDON & ROBINSON, 2007).

Tal neurotransmissor está envolvido na homeostase celular, promovendo a excitabilidade neuronal, é responsável por grande parte do desenvolvimento visual na retina, é referido nos processos de envelhecimento, plasticidade, memória e aprendizado e ainda é apontado em condições de migração, diferenciação e morte celular (SHIGERI *et al.*, 2003).

As principais vias eferentes e aferentes corticais utilizam o glutamato como neurotransmissor, assim como os numerosos circuitos excitatórios locais no córtex, hipocampo, cerebelo e retina (SHELDON & ROBINSON, 2007).

Ele apresenta receptores tanto do tipo ionotrópicos, os quais modulam o fluxo de Na^+ , K^+ , Ca^{++} e Cl^- , diretamente pela membrana plasmática, como NMDA, AMPA e Cainato; ou metabotrópicos, que se encontram acoplados à proteína G para assim modular a atividade celular via segundo mensageiro, os quais são denominados mGluRs, e que apresentam 8 subtipos mGluR1 - 8 (MELDRUM, 2000; DANBOLT, 2001). Recentemente, o mGlu4 foi relatado, juntamente com GABA_A , por participar de um mecanismo de sinalização celular que modula a liberação de glutamato em axônios cerebelares (ANTFLICK & HAMPSON, 2012).

Quanto a transportadores, o glutamato faz uso dos EAAT (transportadores de aminoácidos excitatórios), os quais se subdividem em EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 e EAAT5. Estes

dispõem de localização celular distinta, assim como diferentes características farmacológicas e moleculares (SEAL & AMARA, 1999). Em geral, este transporte é acoplado ao dos íons Na^+ e K^+ de forma que a entrada deste neurotransmissor é concomitante à de três íons Na^+ e a saída de um íon K^+ (NEDERGAARD *et al.*, 2002).

Destes transportadores citados, o GLAST é um transportador específico para L-glutamato e L-aspartato, desempenhando um papel importante na neurotransmissão em sinapses excitatórias. Ele é encontrado em diversas células distribuídas no SNC, como astrócitos e células de Müller (FURUTA *et al.*, 1997), e é predominante nas células gliais de Bergmann (LEHRE & DANBOLT, 1998).

O transportador EAAT2, é predominante nas células da glia, apresentando distribuição uniforme e abundante por todo o sistema nervoso central. EAAT3 e EAAT4 são encontrados nos neurônios, sendo que o primeiro encontra-se expresso por todo o sistema nervoso central, principalmente no córtex e no hipocampo e o segundo também é expresso no córtex e hipocampo, além do cerebelo e tronco encefálico. Já O EAAT5 é expresso principalmente na retina e é exclusivo dos neurônios, presente nas células fotorreceptoras e bipolares da retina. (FURUTA *et al.*, 1997).

Outro tipo de transporte de glutamato crucial no SNC, e primordial na retina é o sistema trocador cistina - glutamato (sistema X_{CG}^-) (OLIVEIRA *et al.*, 2010). O X_{CG}^- é um antiporte que normalmente regula a captação de cistina em troca com a liberação de glutamato. A cistina captada é convertida a cisteína e usada para a síntese de glutathiona (BRINGMANN *et al.*, 2009).

Tais receptores e transportadores estão envolvidos nos mecanismos de liberação de neurotransmissores, dos quais o GABA recebe destaque. Sabe-se que o glutamato induz liberação de GABA por uma via dependente de sódio e independente de cálcio, em culturas de retina de embrião de galinha (DO NASCIMENTO *et al.*, 1998; CALAZA *et al.*, 2006).

Além disso, outro mecanismo de liberação de GABA é descrito, entretanto de forma dependente de Ca^{2+} , o qual pode ser decorrente de despolarização da membrana, como previsto por Duarte *et al.*, 1992, ou via ativação de receptores glutamatérgicos, tanto do tipo AMPA, quanto do tipo NMDA (CHÁVEZ *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2008).

2.4 ÁCIDO GAMA AMINO BUTÍRICO (GABA)

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Encontra-se distribuído por todo encéfalo, desempenhando atividade inibitória sobre os neurônios (GOLAN *et al.*, 2009). Contudo, no desenvolvimento do sistema nervoso, o GABA pode atuar como um neurotransmissor excitatório, onde está presente no início de seu desenvolvimento embrionário (E3), quando não há quase nenhuma atividade de sua enzima sintetizante ácido glutâmico descarboxilase (GAD) (YAMASHITA & FUKUDA, 1993; DA COSTA CALAZA *et al.*, 2000).

Apresenta em sua estrutura química, um radical amino, um grupamento carboxil, e uma cadeia com quatro moléculas de carbono, o que determina a sua nomenclatura. Ele exerce um papel fundamental no equilíbrio entre excitação e inibição neuronal, participando também da codificação de informações sensoriais na retina de vertebrados. Além disso, pode mediar ações inibitórias nos interneurônios encefálicos e promover a inibição pré-sináptica na medula espinhal (FERREIRO-GALVE *et al.*, 2008).

A síntese deste, quase sempre se dá a partir do glutamato, através da ação da enzima ácido glutâmico descarboxilase, ou glutamato descarboxilase (Figura 6), a qual está em atividade na retina no estágio embrionário entre E6/E9 (HOKOC *et al.*, 1990; DA COSTA CALAZA *et al.*, 2000). No entanto, o GABA pode adotar uma rota sintética alternativa, independente do glutamato, esta via deriva da monoacetilação da putrescina (ANGULO *et al.*, 2008).

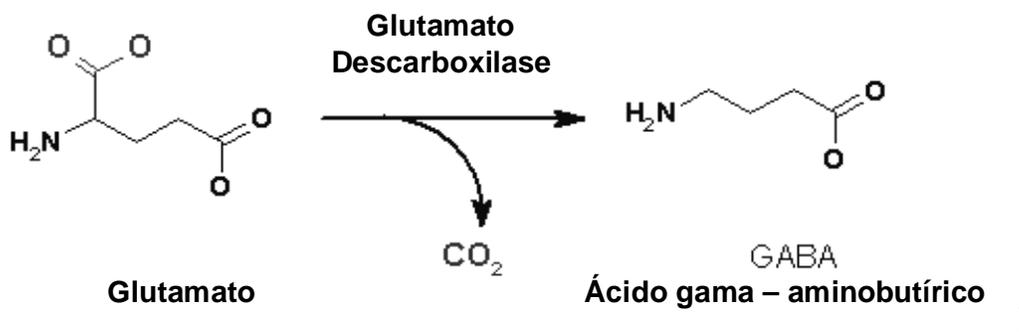
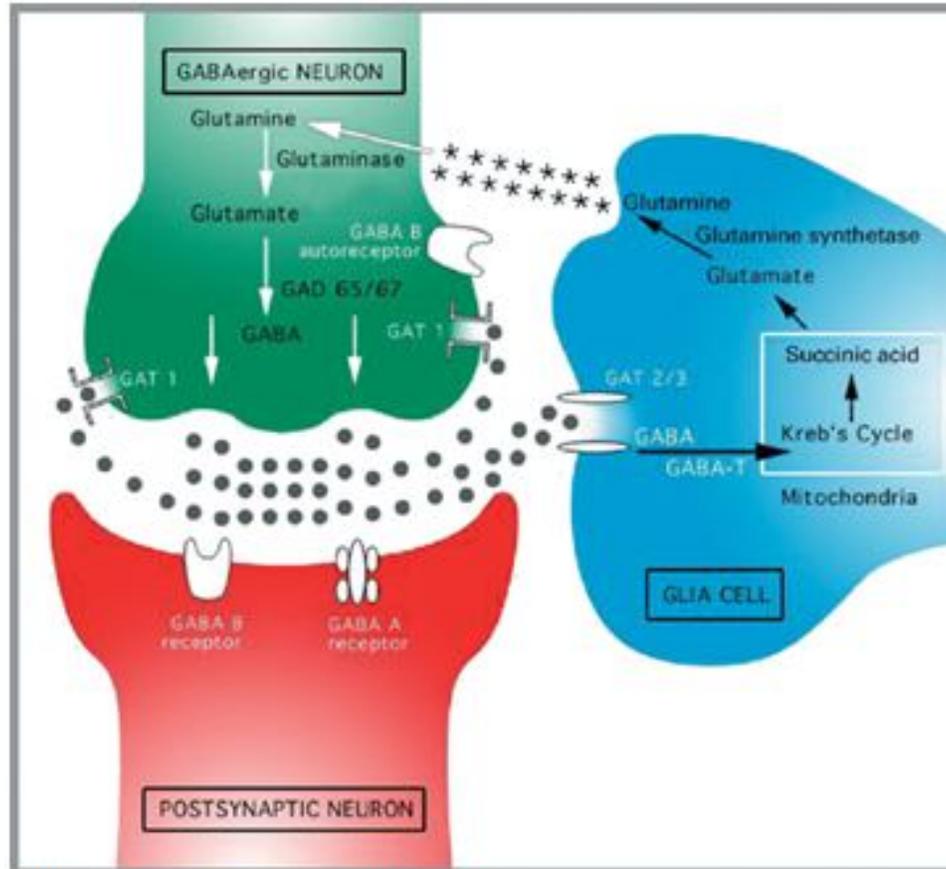


Figura 6: Biossíntese do neurotransmissor GABA (Adaptado de http://www.explicatorium.com/quimica/Aminoacido_Glutamato.php). Acessado em 22 de Outubro de 2011.



GABAergic Neuron: Neurônio GABAérgico.

Postsynaptic Neuron: Neurônio pós-sináptico.

Glia cell: Célula glial.

Glutamine: Glutamina.

Glutamate: Glutamato.

GABA B e GABA A receptor: Receptor GABA B e GABA A

GABA B autoreceptor: Auto-receptor de GABA B

Glutamine Synthetase: Glutamina sintetase.

Mitochondria: Mitocôndria

Kreb's cycle: Ciclo de Krebs

Succinic acid: Acido succinico

Figura 7: Vias de transporte e metabolismo do GABA. (Adaptado de <http://www.nature.com>). Acessado em 30 de Outubro de 2011.

Em linhas gerais, a formação de GABA via glutamatérgica inicia-se pela catálise da enzima GAD, utilizando como cofator o fosfato de piridoxal, enzima limitante na biossíntese que controla a concentração deste neurotransmissor no citosol. O produto desta reação é catalisado pela enzima GABA-oxoglutarato transaminase (GABA T), que o converte em aldeído semi-succínico, o qual é oxidado a succinato por intermédio de uma desidrogenase (BEAR *et al.*, 2008) (Figura 7).

Após a sua síntese, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas através de transportadores presentes neste compartimento celular. Quando a célula pré-sináptica é estimulada, ele é liberado (BORDEN, 1996), por dois mecanismos: um vesicular, dependente de Ca^{2+} , e outro via transportador, dependente de Na^+ (DUARTE *et al.*, 1992; DO NASCIMENTO *et al.*, 1998).

Como a expressão de GABA pelos neurônios ocorre ainda durante o desenvolvimento, vários papéis lhe estão sendo atribuídos, tais como sobrevivência, proliferação, diferenciação neuronal e influência na sinaptogênese, além de ser precursor metabólico para o metabolismo energético dos neurônios indiferenciados. Além disso, o GABA pode exercer ação regulatória sobre sua própria síntese por meio da inibição da GAD num processo denominado retroalimentação negativa (YAMASAKI *et al.*, 1999; CALAZA *et al.*, 2000).

Na retina, este neurotransmissor envolve-se na organização dos campos receptores de células ganglionares e tem sido localizado em células amácrinas, na camada plexiforme interna e em uma subpopulação de células ganglionares (FAMIGLIETTI, 1981).

Distúrbios neurológicos, tais como epilepsia, danos ansiogênicos, esquizofrenia, dor neuropática e toxicodependência são relacionados a uma alteração no sistema GABAérgico, sendo assim de fundamental importância o controle da homeostase de GABA, principalmente no que diz respeito aos mecanismos de transporte desencadeados pela ativação de seus receptores, assim como, de seus transportadores (TREIMAN, 2001, CONTI *et al.*, 2011).

2.4.1 RECEPTORES E TRANSPORTADORES DE GABA

Os efeitos inibitórios do GABA são mediados por receptores de membrana, classificados em três tipos: GABA_A, GABA_B e GABA_C (OKUMICHI *et al.*, 2008) (Figura 8). O GABA_A é o mais abundante receptor deste aminoácido. Ele faz parte de uma família de canais iônicos dependentes de ligantes, denominados de receptores ionotrópicos, sendo este permeável aos íons cloreto (Cl⁻) (DAEMEN *et al.*, 2008).

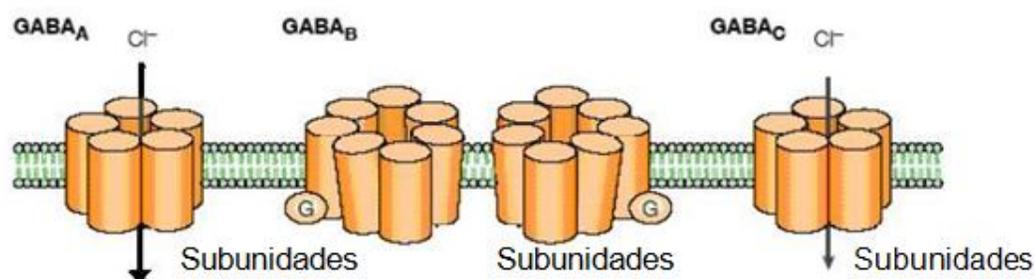


Figura 8: Desenho esquemático da estrutura molecular de receptores de GABA (Adaptado de http://www.ualg.pt/dmdocuments/biomedicas/gabaergic_synapses.pdf). Acessado em 21 de Outubro de 2011.

Os membros desta superfamília de canais iônicos são caracterizados por apresentarem um conjunto de cinco subunidades protéicas. Para o receptor GABA_A foram descritas 16 diferentes subunidades. A combinação de diferentes subunidades de receptores GABA_A dá origem a diferentes subtipos destes receptores, que irão apresentar propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas diferenciadas (DAEMEN *et al.*, 2008).

Estes receptores são expressos em todos os tipos de neurônios da retina de vertebrados (YANG, 2004), além de estarem igualmente presentes em células precursoras retinianas (SUN *et al.*, 2002). Já os receptores GABA_B, são do tipo metabotrópico, ligados a proteínas G, e o GABA_C também é do tipo ionotrópico (YANG, 2004; GOLAN *et al.*, 2009).

Após qualquer neurotransmissão com ativação e/ou bloqueio de receptores da membrana celular, o neurotransmissor em questão deve ser removido da fenda sináptica. Esse processo é facilitado pelos transportadores ou carreadores, que são proteínas integrais de membrana expressos em neurônios e em células da glia, localizados próximos às regiões onde ocorrem as sinapses (BECKMAN *et al.*, 1998; GADEA & LOPEZ-COLOME, 2001).

Esses transportadores acoplam-se e captam os neurotransmissores da fenda sináptica através do cotransporte de íons. Além dos carreadores de membrana, temos também os vesiculares, que são proteínas dependentes de prótons (H^+), responsáveis por armazenar os neurotransmissores (AMARA & KUCHAR, 1993; LESCH *et al.*, 1996).

A atividade do GABA em sinapses é terminada pela rápida recaptação através dos transportadores específicos dependentes da afinidade Na^+/Cl^- , os quais são localizados nas terminações nervosas pré-sinápticas e nas células gliais, principalmente astrócitos, na justaposição próxima a sinapse (GADEA & LOPEZ-COLOME, 2001; CASINI *et al.*, 2006).

Os transportadores específicos do GABA são chamados de GAT, os quais realizam a captação do neurotransmissor através de um sistema de captação dependente de sódio. Quatro transportadores distintos de GABA já foram identificados em mamíferos: o GAT 1, GAT 2, GAT 3 e GAT 4 (CONTI *et al.*, 2004).

Estes transportadores apresentam diferentes propriedades farmacológicas e distribuição tecidual: O GAT 1 está localizado nas terminações axonais e nos astrócitos, o GAT 2 é expresso nas células endimárias, o GAT 3 é predominantemente encontrado nos astrócitos e o GAT 4 especialmente no tronco encefálico (CONTI *et al.*, 2004; CHIU *et al.*, 2005).

Qualquer anormalidade que porventura suceda na estrutura molecular ou na fisiologia destes transportadores, está diretamente relacionada com certos tipos de distúrbios cerebrais, especialmente a epilepsia (CASINI, *et al.*, 2006; SMITH, *et al.*, 2007).

O GAT 1 é a isoforma mais predominante no SNC, sendo mais abundante em áreas essencialmente GABAérgicas, tais como, hipocampo, córtex, cerebelo e retina (MATTHEWS JR *et al.*, 2009).

O transporte ativo de GABA pelo GAT 1 é impulsionado eletroquimicamente pelo gradiente de concentração dos íons cotransportados através da membrana celular, onde geralmente a captação é acompanhada pelo cotransporte de dois íons sódio (Na^+) e um íon cloreto (Cl^-) (TAMURA *et al.*, 1995; JENSEN *et al.*, 2003; CASINI *et al.*, 2006; BRINGMANN *et al.*, 2009).

No tecido retiniano é responsável por cerca de 95% da liberação de GABA por vias independentes de Ca^{2+} e dependentes de Na^+ (DUARTE *et al.*, 1992; DO NASCIMENTO *et al.*, 1998).

Estudos farmacológicos para GAT 2 mostram que ele é abundante na glia, em especial nas células de Müller, podendo também ser encontrado em grande parte do encéfalo, bem como no rim e no fígado. O GAT 3 é mais frequente no fígado, rim, e também no encéfalo de ratos neonatos, sugerindo-se que ele possa estar envolvido em processos de modulação do desenvolvimento do SNC destes animais (LIU *et al.*, 1993).

O GAT 4, assim como o GAT 1, é predominante no SNC, sendo encontrado principalmente no encéfalo e, mais raramente, na medula espinhal. Sua alta especificidade ao GABA (oito vezes maior que GAT 1), sugere a ele um importante papel na terminação da transmissão sináptica (LIU *et al.*, 1993).

Além disso, GAT 1 e GAT 3 são expressos abundantemente em todo o SNC de ratos, camundongos e humanos e escassos no sistema nervoso periférico (BORDEN *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1993), e assim estes dois subtipos atraíram a atenção considerável como alvos potenciais de drogas utilizadas em terapias contra neuropatologias (BOHME & LÜDDENS, 2001; DALBY, 2003). Por conseguinte, qualquer mudança na atividade de GAT, pode ser relevante em diversas condições que envolvam patologias (ALLEN *et al.*, 2004).

Sendo assim, é notável que substâncias como glutatona e glutamato sejam capazes de alterar os níveis extracelulares de GABA, uma vez que podem associar-se a receptores e/ou transportadores específicos de tal neurotransmissor, influenciando assim no seu transporte e, conseqüentemente, na homeostase celular do SNC (CONTI *et al.*, 2004; BRINGMANN *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito modulador da glutathiona na liberação de GABA induzida por glutamato em retinas de embrião de galinha.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito do glutamato na liberação de GABA em retinas de embrião de galinha com idade embrionária (E7/E8);
- Verificar a influência do glutamato na liberação de compostos tióis em retinas de embrião de galinha;
- Avaliar o efeito da glutathiona na liberação de GABA em retinas de embrião de galinha;
- Analisar o efeito do bloqueio da síntese de glutathiona na liberação de GABA induzida por glutamato;
- Averiguar o efeito de agentes redox na liberação de GABA em retinas de embrião de galinha.

4 METODOLOGIA

4.1 EXPLANTE DE RETINAS DE EMBRIÃO DE GALINHA

Para o procedimento experimental explante de retina, foram utilizados embriões de galinha fornecidos pela empresa Makarú Ltda, em estágio de desenvolvimento de sete ou oito dias (E7 ou E8), datados de acordo com Hamburger & Hamilton (1951). Os embriões foram sacrificados e, posteriormente, seus globos oculares removidos e postos em placa de Petri contendo solução salina livre de cálcio.

Os globos oculares sofreram uma incisão na região anterior, possibilitando assim a prévia retirada do cristalino e do humor vítreo. Em seguida, as retinas foram cuidadosamente dissecadas com o auxílio de pinças apropriadas, e transferidas de forma íntegra para uma placa de cultura, na condição de uma retina por poço.

4.2 SISTEMA DE PERINFUSÃO

O sistema de perinfusão consiste num tipo de microdiálise, adaptada ao monitoramento e quantificação das concentrações de fármacos, substâncias endógenas e metabólitos em fluidos biológicos, baseando-se na difusão passiva de substâncias através de um gradiente de concentração.

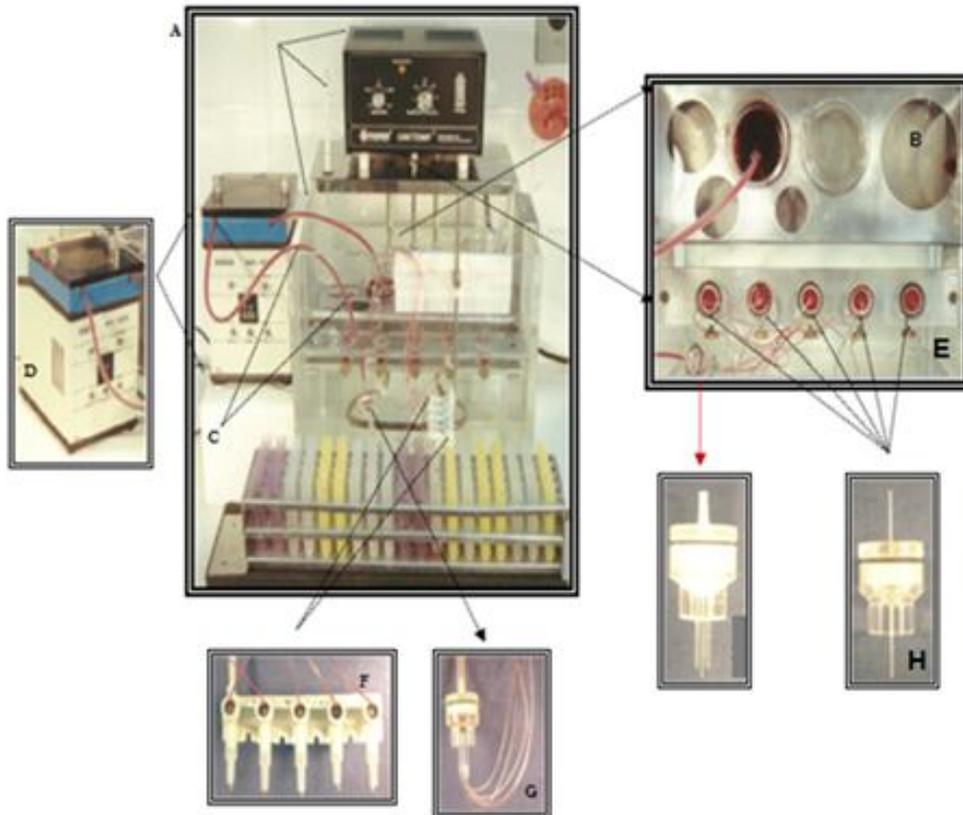
O equipamento é composto de um banho-maria contendo água destilada com temperatura em torno de 37°C, distribuidor de fluxo de um para cinco canais, cinco câmaras de acrílico forradas com filtro, para acomodar a retina e permitir que apenas a solução que banha o tecido seja difusa por capilares. Estes capilares estão conectados nas câmaras, e interligados a uma bomba de microinfusão, que perfunde o líquido a fluxo constante. A solução de estímulo fica num béquer suspenso por uma estante adaptada ao banho-maria (Figura 9).

Desta forma, a bomba promove sucção da solução de estímulo contida no béquer, perpassa pelos capilares, banha o tecido nas câmaras por um tempo de dez minutos e fluxo de 0,2 mL/min, então o líquido de incubação da retina é armazenado num tubo coletor e mensurado por espectrofotometria (PICANÇO-DINIZ, *et al.*, 1992).

O volume de água do banho-maria deve estar no nível da câmara contendo o tecido e do béquer contendo a solução de estímulo, porém não deve cobrir a retina e sim apenas manter a temperatura de 37°C, mimetizando a temperatura corpórea do embrião.

Quando a solução de estímulo for trocada, apenas será substituído o béquer por outro contendo a nova solução, espera-se a solução antiga ser difundida e põe-se a nova solução no sistema, iniciando então um novo tratamento.

Tal sistema foi previamente calibrado com uma análise temporal de aproximadamente sessenta minutos, medindo-se cada fluxo da bomba e a respectiva vazão proporcionada por ele, verificando-se então o fluxo ótimo para os experimentos.



A: Equipamento completo do Sistema de Perinfusão; **B:** Estante com o béquer contendo a soluço de tratamento; **C:** Banho-maria; **D:** Bomba de suc o; **E:** Estante com câmaras de acomodac o do tecido; **F:** Filtro com tubo coletor; **G:** Distribuidor de fluxo; **H:** Câmara contendo o tecido.

Figura 9: Esquema ilustrativo do Sistema de Perinfusão.

4.3 MEDIDA DOS NÍVEIS DE COMPOSTOS TIÓIS

Para a mensuração dos níveis extracelulares de compostos contendo sulfidrina (tióis), foi utilizado o aparato do sistema de perinfusão descrito acima, onde a retina íntegra foi lavada por dez minutos com solução de glutamato 500 μ M, e este líquido de incubação então coletado, passando a ser a matriz biológica para a medição dos níveis de tióis. Os experimentos foram realizados em meio com sódio e sem sódio, sendo que para o experimento sem sódio, ocorreu a substituição equimolar do sódio pelo lítio na solução de Hank.

O líquido de incubação da retina íntegra foi exposto ao DTNB (ácido ditionitrobenzóico), que é uma substância reativa a grupos tióis expressando coloração amarelada. A reação baseia-se na redução de DTNB a TNB (ácido tionitrobenzóico), resultado da ligação do composto ao grupamento - SH, formando uma ligação protéica e um resíduo de TNB. As amostras passaram por análise espectrofotométrica com comprimento de onda 412 nm, e foram expressas em densidade óptica (OWENS & BELCHER, 1965).

Para isso, primeiramente, construiu-se uma curva-padrão com concentrações ascendentes de um composto tiol, que pode ser glutathiona ou cisteína, a qual serviu de base de cálculo para os experimentos. Em seguida, o líquido de incubação da retina foi centrifugado por cinco minutos a 5000 rpm; adicionou-se 100 μ L deste lavado em tubos contendo 800 μ L de PBS/EDTA 1 mM e 100 μ L de DTNB 5 mM. Feito isso, aguardou-se cinco minutos de reação, e então as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e calculadas de acordo com a equação da reta dada pela curva-padrão.

4.4 ENSAIO COM GLUTAMATO E GLUTATIONA

Após o procedimento de dissecação da retina descrito anteriormente, as retinas foram submetidas à incubação em placa de cultura com solução de glutamato (50 e 500 μM) e glutatona (100 e 500 μM) em experimentos separados, objetivando observar alguma alteração nos níveis de GABA extracelular. Após a submersão da retina com a solução de tratamento referida, as retinas sofreram incubação por dez minutos em placa de cultura mantida em estufa a 37 °C e 5% CO_2 , e então os níveis extracelulares de GABA foram mensurados no líquido de incubação da retina. Os experimentos foram realizados em triplicata, ambos comparados ao grupo controle, no qual o tecido foi banhado com solução de Hank.

4.5 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE GLUTATIONA

Uma avaliação importante realizada foi a inibição da síntese de glutatona, com o objetivo de saber se uma vez diminuído os níveis de GSH no meio, ocorreria alteração dos níveis extracelulares de GABA, hipotetizando que realmente tal liberação de GABA seria decorrente da presença de glutatona no sistema. Para isso, utilizou-se o BSO (Butionina Sulfoximina) que é responsável por inibir a enzima glutamato-cisteína ligase, impedindo assim a síntese do tripeptídeo.

Este procedimento foi realizado por meio de incubação com BSO a 50 μM por dez minutos, o qual foi adicionado em todos os poços contendo a retina íntegra, exceto controle. Após isso, verificaram-se os níveis de GABA liberados para o líquido de incubação da retina de todos os grupos.

Outro procedimento realizado utilizando BSO; consistiu em três grupos experimentais: controle, glutamato 500 μM e pré-tratamento com BSO 50 μM por trinta minutos, seguido de estímulo com glutamato 500 μM . Todos foram incubados por dez minutos e os níveis de GABA quantificados, semelhantemente aos demais experimentos. Os experimentos supracitados foram dispostos em triplicata.

4.6 ENSAIO COM ASCORBATO

Sabe-se que o glutamato é capaz de liberar ascorbato (PORTUGAL *et al.*, 2009). Então, para verificar se tal fenômeno de liberação de GABA não está ligado a seu estado redox, tornou-se necessário a realização de experimentos de liberação de GABA sob estímulo de ascorbato, para que seja sanada qualquer dúvida quanto à liberação de tióis por glutamato. Foram realizados experimentos de liberação de GABA por ascorbato a 100 μM e 500 μM e dosados por CLAE, seguindo as mesmas especificações do item anterior. Tais experimentos foram feitos em triplicata.

4.7 ENSAIO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A lactato desidrogenase é uma enzima citosólica que uma vez presente no meio extracelular, indica ruptura da membrana celular. Dosou-se então o LDH nas amostras tratadas com BSO com o intuito de analisar se o GABA presente extracelularmente não é consequência de rompimento da membrana provocado por concentrações tóxicas de BSO nas amostras analisadas. Utilizou-se para o procedimento o kit comercial *LDH-Citotoxicity Assay Kit*. Fez-se a dosagem em leitor de microplaca com comprimento de onda 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores calculados na forma LDH extracelular / LDH total e expressos em porcentagem do controle.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE GABA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE)

O método utilizado para a determinação da liberação de GABA foi CLAE com detecção por fluorescência. A técnica é muito utilizada em Bioquímica e Química Analítica e tem por função identificar, separar e determinar compostos. O equipamento é composto por uma coluna contendo a sílica (fase estacionária) que prende a amostra a ser analisada; uma bomba que promove sucção de duas soluções, concomitantemente: fase A e fase B, denominadas de fase móvel; e um detector fluorescente, o qual detecta o analito de interesse que se encontra ligado a um composto fluorescente. Ele ainda converte a concentração do analito para uma escala de milivolt (mV), que foi expresso na forma de cromatograma com pico de concentração (Figura 10).

O equipamento dispõe de um comunicador que se conecta ao computador, onde está contido um software que permite a visualização e controle dos tempos de retenção de cada constituinte da amostra, variando dependendo das interações entre a fase estacionária, do composto a ser analisado e do solvente utilizado. Desta forma, analisou-se o efeito causado pelos estímulos no tecido retiniano, de maneira a quantificar uma possível alteração na liberação de GABA na retina.

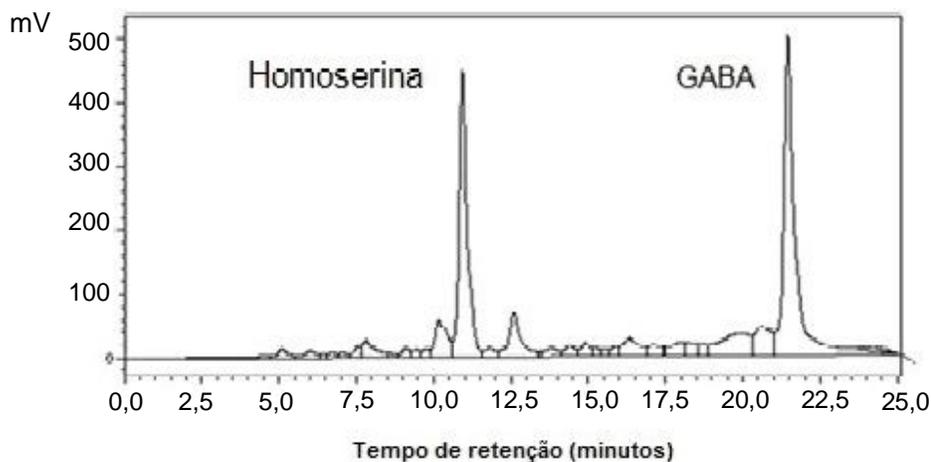


Figura 10: Cromatograma evidenciando os tempos de retenção da homoserina (padrão interno) e GABA (analito de interesse).

4.8.1 CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficácia Shimadzu, composto por bomba, modelo LC20-AT, detector de fluorescência, modelo RF-10AXL, degaseificador, modelo DGA-20A5, módulo comunicador, modelo CBM-20A, injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 μL , coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS 5 μm , dimensão 250 x 4,6 mm.

As amostras obtidas foram injetadas em um sistema de CLAE, apresentando fase móvel com eluição gradiente composta por fase A: tampão acetato de sódio 95% e metanol 5%, suplementado com isopropanol, e pH ajustado com ácido etanóico para 5,67; e fase B: metanol 70 %.

A fase A, ainda é filtrada com membrana 0,2 μm x 47 mm pelo método de filtração com bomba a vácuo. A eluição segue um gradiente curso-temporal: 0,01 minutos, 100% fase A; 10 minutos, 70% fase A e 30 % fase B; 20 minutos, 50% fase A e 50 % fase B; e 25 minutos, 100% fase A.

Tabela 1: Características experimentais da quantificação de GABA por CLAE.

Característica	Especificação
Analito de interesse	GABA
Tempo de retenção	22 minutos
Tempo de eluição	25 minutos
Fluxo	1,2 mL/min
Comprimento de onda detector	340 nm excitação / 460 nm emissão
Método de calibração	Padrão interno e externo
Padrão interno	Homosserina
Agente derivatizante	OPA

4.8.2 DERIVATIZAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA

A derivatização é um processo que ocorre geralmente com aminoácidos, no qual um composto fluorescente é adicionado na amostra para se ligar ao analito de interesse e então ser mensurado pelo detector. Para este procedimento, preparou-se uma primeira solução, denominada solução de OPA, onde 16,3 mg de N-acetil-cisteína e 13 mg de o-ftalaldeído (OPA), o composto fluorescente, foram diluídos em 300 μ L de metanol, conforme descrito por LENDA & SVENNEBY, 1980.

O líquido de incubação da retina obtido pelo procedimento de explante e, posteriormente incubado com as soluções de tratamento específicas de cada experimento, foi então pré-tratado antes da injeção no equipamento cromatográfico. Para isso, coletou-se 500 μ L deste líquido e adicionou-se 20 μ L de TCA (ácido tricloroacético) 1%, com o objetivo de precipitar proteínas, já que estas são de alto peso molecular e podem obstruir a coluna cromatográfica.

Após isso, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos. 300 μ L do sobrenadante foram retirados e neste adicionou-se 20 μ L de homosserina a 100 μ g/mL, aminoácido sintético ausente no organismo animal que serviu como padrão interno.

Então após isso, as amostras sofreram agitação com vortex para melhor solubilização, e assim, a injeção foi preparada para introdução na coluna cromatográfica. Tal injeção conteve 60 μ L desta referida amostra pré-tratada, 40 μ L de tampão borato e 10 μ L da solução de OPA.

4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNA

O método de Bradford, foi o método de escolha para a determinação de proteínas. Este método baseia-se na ligação do azul brilhante de Coomassie com um grupamento protéico. Após isso, essa ligação é comparada com diferentes concentrações de uma proteína padrão, geralmente albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 0,1 mg/mL. Os valores de liberação de GABA foram corrigidos pelos valores de proteína em cada retina de cada experimento descrito anteriormente.

Para cada experimento, separou-se em tubos, 100 μ L de cada amostra para a dosagem de proteína, nas quais foram acrescentados 100 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e 300 μ L de água destilada. Estes tubos foram refrigerados por 24 horas para a posterior leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda 595 nm.

Para analisar as amostras armazenadas, uma alíquota foi retirada, diluída em água destilada e, após isso, adicionou-se 2 mL do reativo e deixou-se reagir por dois minutos. De três em três tubos, fez-se a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Os resultados de cada experimento foram divididos pelos valores de proteína respectivos.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os experimentos de CLAE, foi feita uma razão entre a altura do pico do analito de interesse e a altura do pico do padrão interno. Para a avaliação estatística, todos os resultados foram previamente plotados com o auxílio do programa Excel, tendo como base de cálculo uma curva experimental específica para cada tipo de experimento e, posteriormente, submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey do programa BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA EM RETINAS EXPOSTAS A GLUTAMATO

Nossos resultados mostram um aumento significativo na liberação de GABA na presença de glutamato (50 μ M e 500 μ M). Quantitativamente, os níveis extracelulares de GABA aumentaram consideravelmente em iguais proporções, evidenciando que o fenômeno ocorreu independentemente das concentrações analisadas (Figura 11).

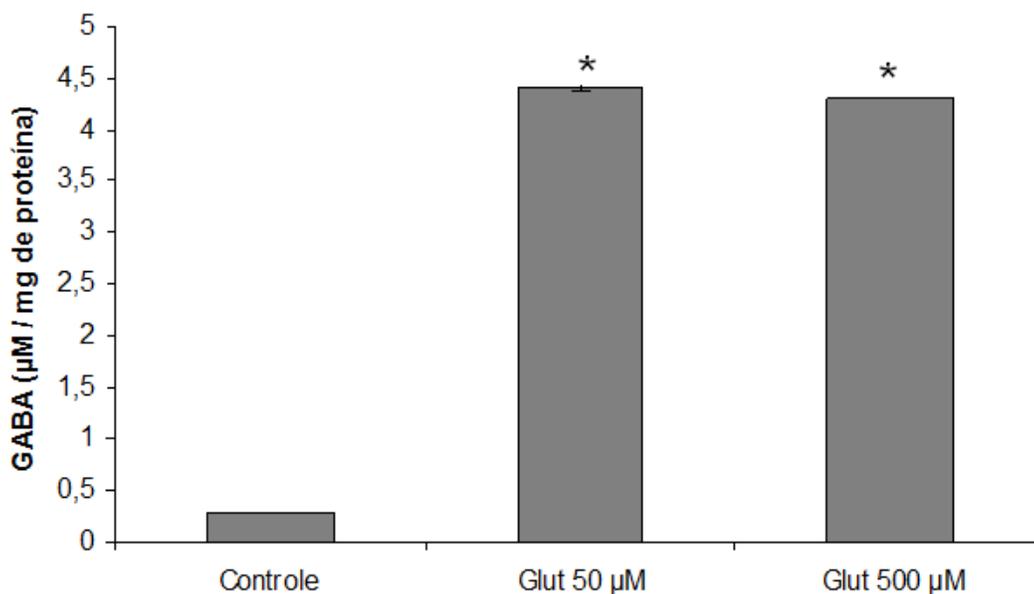


Figura 11: Níveis extracelulares de GABA sob estímulo de glutamato nas concentrações de 50 e 500 μ M, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA, teste Tukey).

5.2 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS TIÓIS INDUZIDA POR GLUTAMATO

Os resultados destes experimentos revelam um considerável aumento na liberação de compostos tióis. Primeiramente, fizemos uma quantificação de compostos com sulfidrila, liberados em condições basais, ou seja, apenas com solução salina, por meio de uma curva temporal, que serve como controle para os experimentos seguintes. Em tal curva, observa-se uma linearidade desta liberação no decorrer de sessenta minutos com sucessivas coletas em intervalos de cinco em cinco minutos (Figura 12).

Feito isso, avaliamos o efeito do glutamato na liberação de compostos contendo sulfidrila, em que se lavou o tecido em questão com solução salina, e em substituição do íon sódio por lítio, de forma equimolar. Com isso, sugere-se que a liberação destes compostos mediada por glutamato é independente de sódio, já que em ambas as situações houve esta liberação em termos percentuais equiparados (Figura 13).

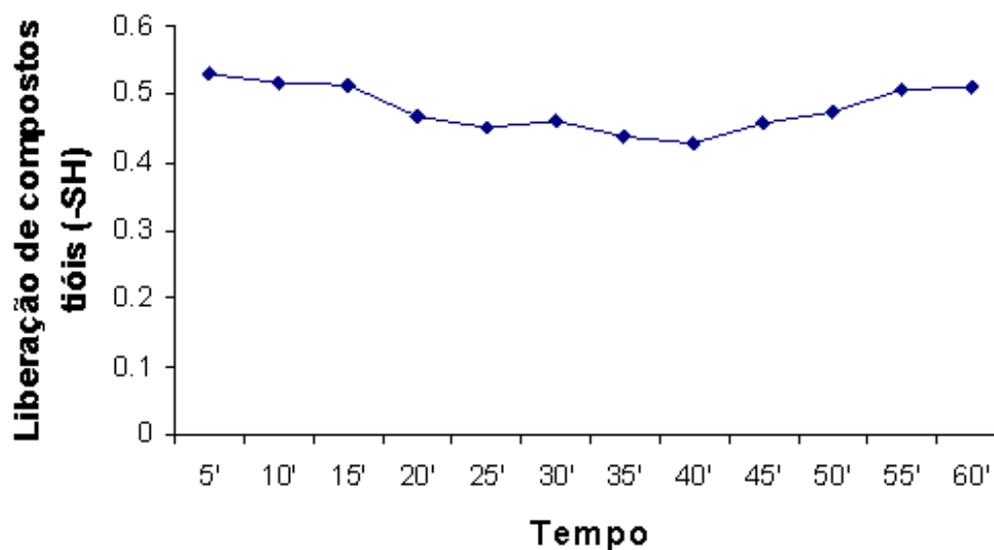


Figura 12: Curso temporal da liberação basal de compostos contendo sulfidril, em unidades de absorbância, mensurado por espectrofotometria, em retinas de embrião de galinha (E7/E8).

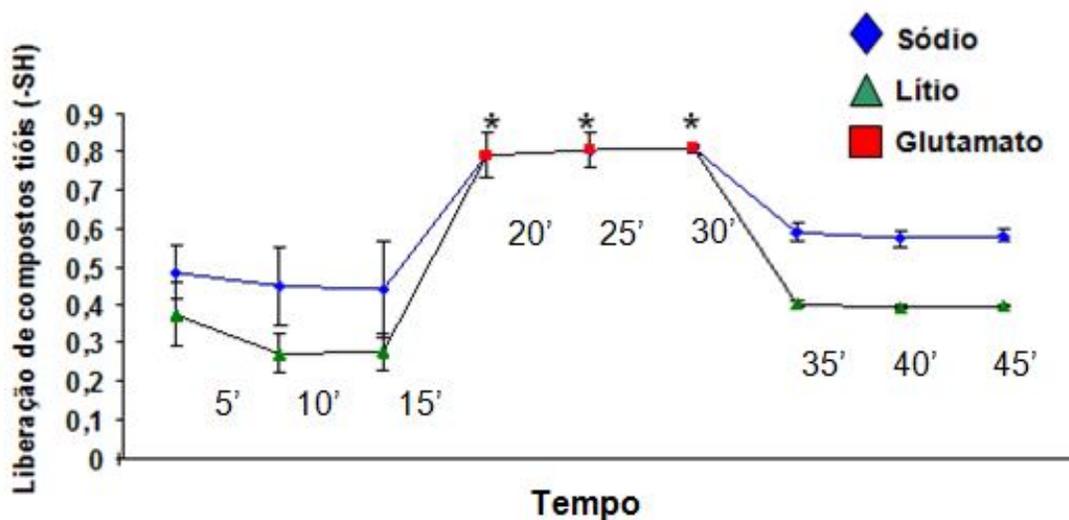


Figura 13: Análise temporal da liberação de compostos com sulfidril, em unidades de absorbância, mediada por glutamato em meio com sódio e sem sódio, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA, teste Tukey).

5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA EM RETINAS EXPOSTAS A GLUTATIONA

Semelhantemente aos dados de liberação de GABA por glutamato, constatou-se uma elevação progressiva no transporte de GABA para o meio extracelular em situações de exposição à glutathiona nas concentrações de 100 e 500 μM , mostrando, neste caso, que GSH induz esta liberação de forma dependente das concentrações analisadas (Figura 14).

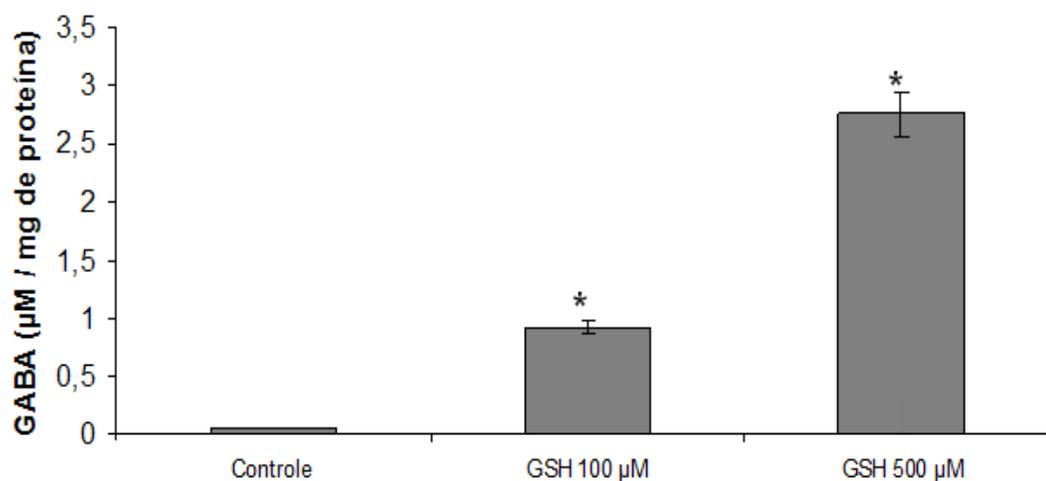


Figura 14: Níveis extracelulares de GABA induzido por glutathiona nas concentrações de 100 e 500 μM , em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA, teste Tukey).

5.4 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE GABA INFLUENCIADA POR BSO

Visando esclarecer se realmente a liberação de GABA pode ser potencializada por GSH, como descrito nos resultados, as amostras foram expostas ao BSO, uma vez que este composto bloqueia a síntese de glutathiona e nos dá parâmetros de que GSH está participando da liberação de GABA.

Realizou-se então, um tratamento com BSO a 50 μM por trinta minutos. Os resultados demonstram o efeito deste composto no sistema, onde se percebe que ele atua diminuindo significativamente os níveis extracelulares de GABA em relação ao controle (Figura 15).

Além disso, julgou-se necessário proceder com um novo experimento com BSO, porém usando-o como um pré-tratamento nas mesmas condições de tempo e concentração descritas anteriormente. Nossos dados revelam que o glutamato a 500 μM , promove uma significativa liberação de GABA quando comparada ao controle, além disso, o pré-tratamento com BSO 50 μM por trinta minutos ameniza o efeito gerado pelo glutamato no que diz respeito a níveis extracelulares de GABA (Figura 16).

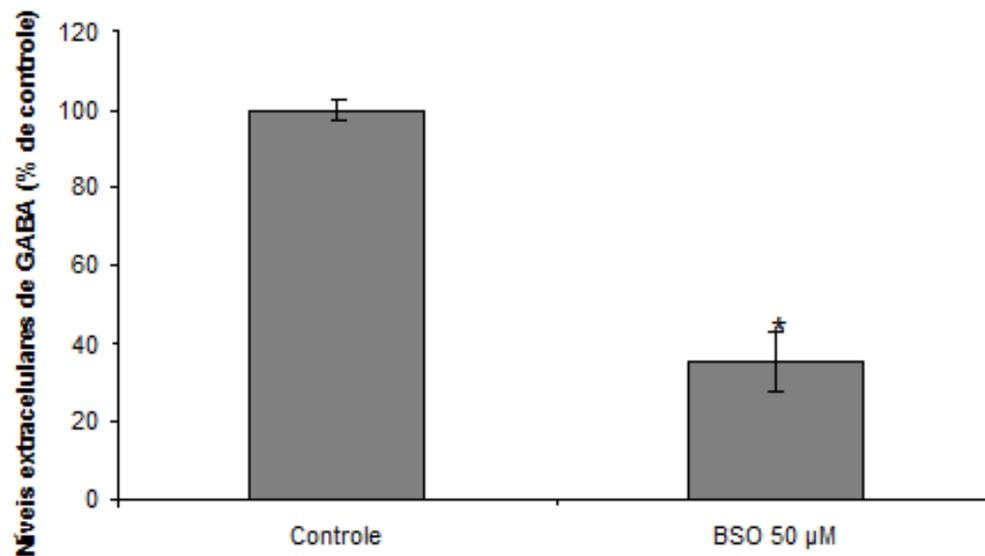


Figura 15: Diminuição dos níveis extracelulares de GABA, provocada por BSO 50 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. controle (ANOVA, teste Tukey).

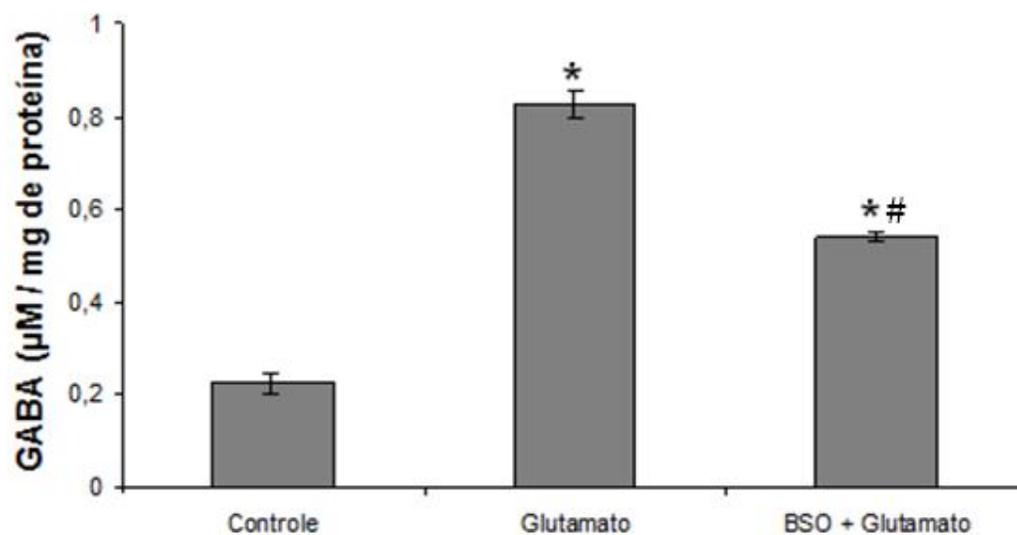


Figura 16: Efeito inibitório do BSO 50 µM nos níveis extracelulares de GABA induzidos por glutamato 500 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) * $p < 0,01$ vs. Controle; # $p < 0,01$ vs. Glutamato (ANOVA, Teste Tukey).

5.5 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GABA MEDIADA POR ASCORBATO

A fim de avaliarmos se a liberação de GABA induzida por GSH estava associada a alterações no estado redox da célula, o líquido de incubação das retinas foi exposto a ascorbato como descrito nos métodos. Nossos resultados demonstram que o ascorbato não interfere na liberação de GABA como mostrado na Figura 17.

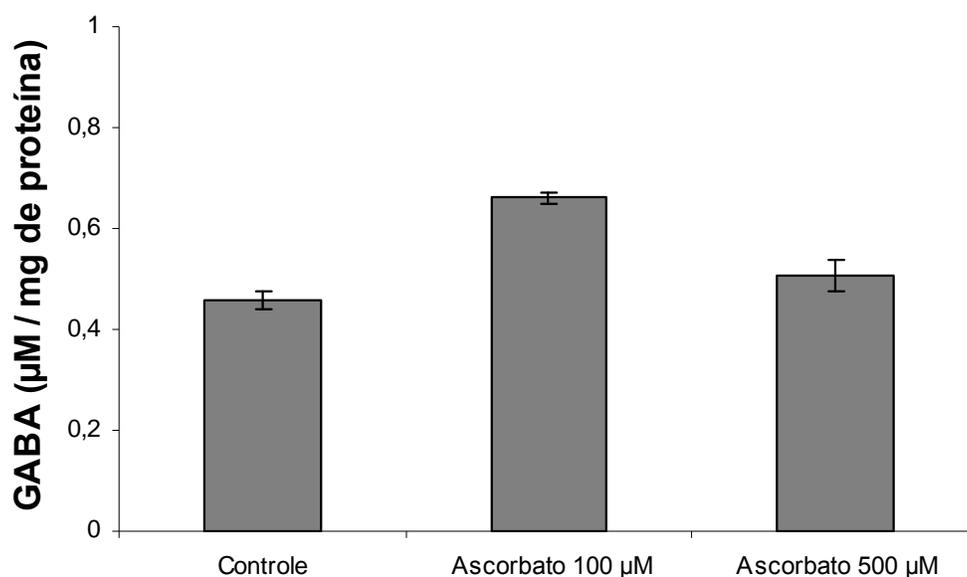


Figura 17: Níveis extracelulares de GABA após exposição à ascorbato nas concentrações de 100 e 500 µM, em retinas de embrião de galinha (E7/E8) (ANOVA, teste Tukey).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A título de análise de viabilidade celular, foram realizados ensaios de LDH, para identificar uma possível morte celular por ruptura de membrana provocada pelo BSO. Com base na Figura 18, é possível visualizar que tanto o tratamento com glutamato, quanto o grupo pré-tratado com BSO e, posteriormente, incubado com glutamato, não apresentaram índices de ruptura de membrana significativos, quando comparados ao grupo controle.

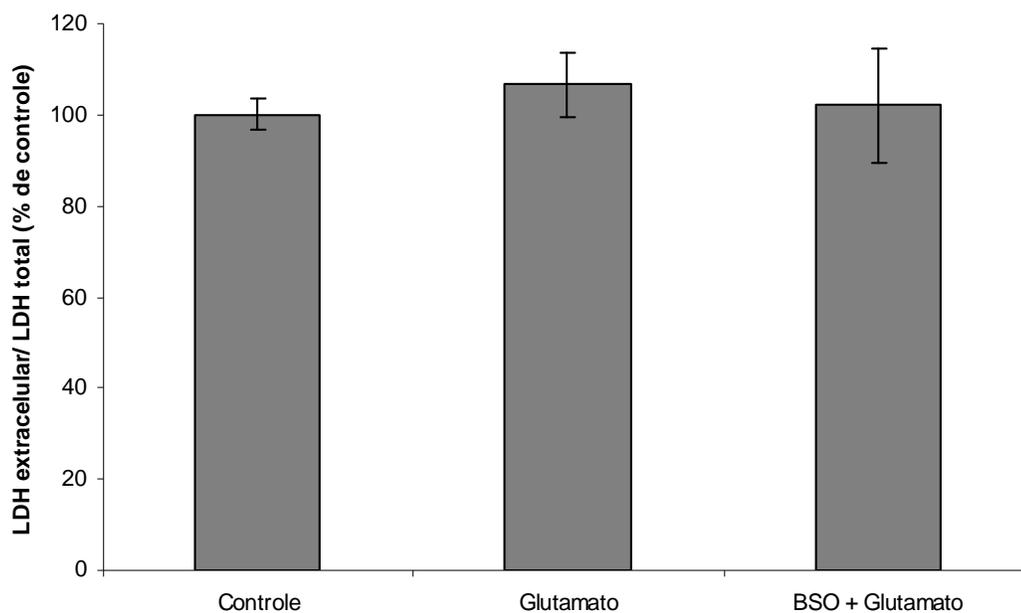


Figura 18: Teste de viabilidade celular pelo método de LDH entre os grupos controle, glutamato 500 μM e BSO 50 μM + glutamato 500 μM em retinas de embrião de galinha (E7/E8) (ANOVA, teste Tukey).

6 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos demonstram que o glutamato é capaz de liberar GABA no tecido retiniano por dois mecanismos: um dependente de Ca^{2+} , o qual requer despolarização da membrana e entrada deste íon para o ambiente intracelular, resultando num processo de excitose; e outro independente de Ca^{2+} e dependente de Na^+ , em resposta à despolarização da membrana (NELSON & BLAUSTEIN, 1982; BERNATH & ZIGMOND, 1988; SANTOS *et al.*, 1991).

Do Nascimento & De Mello, 1985 também reportam que em culturas retinianas de embrião de galinha, glutamato induz liberação de GABA de maneira independente de cálcio, porém dependente de sódio, sugerindo que haja a participação de um cotransportador GABA/ Na^+ no referido sistema; fenômeno este que foi reforçado por Do Nascimento *et al.*, 1998, sugerindo que o transportador GAT 1 participe de tal liberação de GABA mediada por glutamato.

Tendo em vista o fato de não existirem relatos na literatura sobre o suposto mecanismo de liberação de GABA com participação de glutatona, tais dados mencionados estimularam nossos questionamentos sobre a modulação do sistema GABA-Glutamato, pois supomos que a glutatona atue de forma a modular a liberação de GABA induzida por glutamato, como mostrado em nossos resultados.

Nós observamos que houve uma elevação significativa dos níveis de liberação de GABA, de forma independente de concentração, quando a retina foi exposta à glutamato na concentração de 50 μM ; o mesmo foi observado quando o tratamento foi realizado com 500 μM de glutamato, onde tais valores de liberação perpassaram a faixa de 4 μM , valores estes considerados bastante relevantes, uma vez que os níveis basais aproximaram-se de 500 nM, equiparando-se aos resultados de liberação de GABA induzida por glutamato, propostos por Do Nascimento & De Mello, 1985 e Bernath & Zigmond, 1988.

Paralelamente a isso, julgamos importante verificar a influência do glutamato na liberação de compostos tióis, dentre os quais, a glutatona é o

mais abundante, já que Frade *et al.*, 2008 demonstraram que o glutamato é capaz de liberar glutathione em culturas de astrócitos de ratos; dados estes corroborados com os de Garcia *et al.*, 2011, os quais mostraram que há um efluxo de glutathione provocado por glutamato em culturas retinianas de embrião de galinha, e que tal liberação é mediada pelo transportador de glutamato GLAST, acontecendo de forma dependente de sódio.

Nossos resultados assemelham-se aos acima citados, pois nos tratamentos com glutamato, os níveis de compostos tióis liberados para o meio extracelular foram duplicados quando comparados ao grupo controle, e que tal forma de liberação de tióis segue um mecanismo independente de sódio, uma vez que em substituição equimolar de sódio por lítio, os níveis de liberação de tais compostos não tiveram alterações significativas. Porém, em todas as situações os valores de liberação de compostos com sulfidril foram significativos em relação aos níveis basais, ratificando o que antes fora proposto por Frade *et al.*, 2008 e Garcia *et al.*, 2011.

Os mecanismos do referido transporte ainda não foram esclarecidos, entretanto pode-se supor que seja por intermédio do sistema trocador X_{CG}^- , o qual realiza um antiporte com glutamato e cistina ou cisteína, obedecendo a um gradiente de concentração, já que este mecanismo de transporte está relacionado a uma neuroproteção em quadros de excitotoxicidade promovida pelo excesso de glutamato no espaço extracelular. Sendo assim, o transportador em questão, poderia estar captando o glutamato para o ambiente intracelular e liberando o composto tiol para fora da célula, conforme descrito por Oliveira *et al.*, 2010.

Sabendo-se dos efeitos provocados por glutamato nos níveis de GABA, assim como, de glutathione e de tióis no geral, e de tais interligações, verificamos se GSH poderia estar participando de forma moduladora na liberação de GABA mediada por glutamato, pois ela já é referida por causar mudanças conformacionais na estrutura química de transportadores GAT 1, abundantemente encontrados na retina, graças à instabilidade do grupamento sulfidril presente em sua molécula, o qual se liga na superfície extracelular do transportador por uma ligação ponte dissulfeto, bloqueando assim sua atividade (ZOMOT & KANNER, 2003; ROSENBERG & KANNER, 2008).

Esta característica ratifica sua capacidade moduladora em eventos neuroquímicos, propriedade esta primordialmente reportada por Oja *et al.*, 2000, que sugere interferência ativa de GSH na função de receptores glutamatérgicos, pois sua composição química é repleta de constituintes com propriedades reativas em tais receptores.

Nossos dados remetem uma elevação progressiva nos níveis extracelulares de GABA, quando as retinas foram expostas a concentrações de glutatona. A 100 μM de GSH, os valores de liberação de GABA, atingiram a faixa de 1 μM . Tendo em vista que a liberação basal é cerca de 0,1 μM , pode-se inferir que houve um aumento de aproximadamente 90% em tais valores liberados para o espaço extracelular, confirmando as suspeitas de que GSH interfere na liberação de GABA, provavelmente por sua característica moduladora previamente mencionada por Oja *et al.*, 2000.

Por conseguinte, na concentração de 500 μM de GSH, estes níveis de GABA extracelular foram acrescidos substancialmente, chegando a quase 3 μM , o que delibera mais de 100% de aumento desta liberação, nos mostrando que o fenômeno é dependente de concentração e que os dados reportados por Oja *et al.*, 2000 e Zomot & Kanner, 2003, a respeito da capacidade moduladora de GSH são pertinentes, e que tal fenômeno bioquímico é importante, a ponto de influenciar os níveis de liberação de GABA.

O mecanismo pelo qual o transporte acima descrito venha ocorrer ainda não foi elucidado completamente, entretanto, diversas hipóteses se levantam com o intuito de explicar o presente fato, dentre as quais, a já mencionada interação de grupamentos sulfidrilas com a superfície extracelular do transportador GAT 1, devido haver oxidação da molécula pela formação de ligações do tipo ponte dissulfeto (ZOMOT & KANNER, 2003).

Além disso, outro mecanismo provável é baseado na modulação exercida por agentes redox em receptores GABA_A, modulação esta que depende da subunidade do receptor expressa no tecido estudado. Neste evento, também há uma interação do grupamento -SH com a referida subunidade no sentido de formar uma ponte dissulfeto (AMATO *et al.*, 1999), porém para a caracterização exata do mecanismo de transporte envolvido neste fenômeno, experimentos futuros que englobem bloqueio farmacológico de receptores e transportadores de GABA se farão necessários.

Tais hipóteses salientam uma interação direta entre GSH e GABA, seja via receptor ou via transportador. Porém, mesmo que o mecanismo pelo qual este evento aconteça venha a ser um dos citados anteriormente, o presente estudo sugere que tal mecanismo possa não ocorrer de forma isolada, mas que simultaneamente, possa haver uma participação efetiva de GSH, no sentido de modular a liberação de GABA induzida por glutamato, potencializando este evento, tendo em vista a forte influência que a glutathione promove em receptores glutamatérgicos (LEVY *et al.*, 1991; OJA *et al.*, 2000) .

É sabido que os três constituintes moleculares de GSH atuam em receptores glutamatérgicos, pois o glutamato é agonista natural de seus receptores; cisteína apresenta elevada instabilidade química podendo ligar-se efetivamente com estes receptores; e glicina é um agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LEVY *et al.*, 1991), ressaltando assim a hipótese da modulação de GSH em receptores de glutamato, no sentido de alterar os níveis extracelulares de GABA.

Todavia não se descarta a possibilidade de dois ou mais mecanismos atuarem em conjunto ou independentemente para a realização deste transporte celular, uma vez que tanto glutamato, quanto GSH alteram os níveis extracelulares de GABA, como já descrito em nossos resultados.

Além da glutathione, outro antioxidante importante no organismo e abundante no SNC, é o ascorbato, ambos apresentam tal propriedade em virtude de suas características reativas e instáveis do ponto de vista molecular, as quais lhes conferem atributos de agentes redox (REBEC & PIERCE 1994; RICE 2000).

Portugal *et al.*, 2009 demonstram que glutamato é capaz de liberar ascorbato por mecanismos que dependem de Ca^{2+} , via ativação de receptores ionotrópicos de glutamato, seja do tipo NMDA ou AMPA/cainato, evento este que pode ser correlacionado com os dados de Rice, 2000 que reportam o ascorbato como um neuromodulador, e corroborados com os de Garcia *et al.*, 2011 que mostram a liberação de glutathione por glutamato, porém via transportador GLAST.

Estas condições nos remetem a uma possível associação de glutamato com a liberação de agentes redox, a exemplo de GSH e ascorbato, nos induzindo a hipotetizar que não seria GSH propriamente dita, a responsável

pela modulação da liberação de GABA induzida por glutamato, e sim qualquer composto redox, como o ascorbato, levando-se em consideração os relatos de Rebec & Pierce 1994 e Rice, 2000.

Sendo assim, tornou-se necessário uma avaliação de uma possível liberação de GABA induzida por ascorbato. Os resultados nos mostram que não há liberação de GABA significativa quando as retinas foram expostas a tratamentos com ascorbato nas devidas concentrações mencionadas acima; reforçando então a ideia de que seja de fato a glutathione, a responsável por esta modulação da liberação de GABA mediada por glutamato, e não qualquer agente redox, hipótese esta levantada a partir dos dados proferidos por Portugal *et al.*, 2000.

Considerando este dado, julgou-se necessário caracterizar efetivamente o envolvimento de GSH neste sistema. Partimos do pressuposto de que se fosse inibida a síntese deste tripeptídeo, seria possível averiguar se a presença dele no ambiente celular era crucial para o evento de liberação de GABA, pois, Bernardo *et al.*, 2004 nos mostram que a depleção de GSH no SNC pode desencadear morte celular. Então, uma vez inibida sua síntese, e ainda assim houvesse uma permanência nos níveis de GABA liberados para o espaço extracelular, implicaria dizer que outra substância estaria atuando no fenômeno em questão.

Vale ressaltar que sua síntese pode ser inibida por Butionina sulfoximina (BSO) que bloqueia a ação da enzima γ -glutamylcisteína sintetase, a qual catalisa a ligação do glutamato com a cisteína para a formação de glutamylcisteína, primeira etapa da síntese de glutathione, diminuindo assim os níveis intracelulares de GSH (YAO *et al.*, 1993).

Roh *et al.*, 2007 revelam que BSO é capaz de inibir os níveis de GSH intracelular e, conseqüentemente, afetar alguns eventos celulares protagonizados por este tripeptídeo, por isso, foram avaliados os efeitos causados por BSO a 50 μ M, na liberação de GABA. Nossos dados revelam uma perceptível inibição desta liberação, a qual alcançou níveis aproximados de 60%, quando comparados ao controle, tratado com solução de Hank. Isto nos mostra que, uma vez inibida a síntese de GSH, os valores de liberação de GABA são reduzidos em relação aos basais, sugerindo assim que GSH tenha participação no fenômeno de liberação de GABA.

Todavia, era preciso conciliar esta hipótese de inibição de GSH com a liberação de GABA evocada por glutamato, já que Roh *et al.*, 2007 revelaram alterações em eventos celulares quando o tecido era tratado com BSO. Então se realizou um experimento semelhante ao anterior, porém utilizando glutamato e BSO. Neste procedimento, foi feita uma pré-incubação da retina com BSO 50 μ M por trinta minutos, objetivando a inibição da síntese de GSH e, passado este tempo, tratou-se este tecido com glutamato.

Estes resultados reportam que glutamato libera GABA e que em situações de ausência de GSH no sistema, devido inibição de sua síntese, a liberação de GABA induzida por glutamato é amenizada em torno de 30%, consolidando assim a teoria de que GSH é capaz de modular a liberação de GABA mediada por glutamato. Entretanto, tal inibição enzimática provocada pelo BSO pode gerar morte celular como mencionado por Bernardo *et al.*, 2004.

Então se tornou necessário avaliar uma possível morte celular induzida pelo bloqueador da síntese de GSH, pois se sabe que uma exposição de trinta minutos com BSO ao tecido pode ser tóxica. Por isso, decidimos realizar um teste de viabilidade celular para esclarecer se tal substância não estava provocando morte celular, e assim afetando os referidos níveis de liberação, uma vez que Treichel *et al.*, 2004 mostraram aumento dos níveis de LDH em situações de longa exposição a agentes químicos.

Visando avaliar esta possível consequência experimental, foram realizados ensaios de dosagem de lactato desidrogenase, enzima citosólica a qual presente no espaço extracelular remete ruptura da membrana e, conseqüentemente, morte celular, pois de acordo com Treichel *et al.*, 2004, a exposição a BSO pode promover depleção de ATP e aumento dos níveis extracelulares de LDH.

Entretanto, os valores de dosagem desta enzima revelaram que não houve morte celular significativa, nos levando a reafirmar que a diminuição da liberação de GABA induzida por glutamato em tecido pré-tratado com BSO, foi oriunda da inibição da síntese de glutatona e não reflexo de morte celular, sugerindo que este tripeptídeo é responsável por modular os valores de liberação de GABA induzida por glutamato.

Deste modo, o presente trabalho infere uma participação moduladora de GSH na liberação de GABA induzida por glutamato em retinas de embrião de galinha, entretanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não pode ser totalmente demonstrado, já que diversas vias que envolvam receptores e transportadores de GABA podem protagonizar tal evento e, para que sejam elucidadas, necessitam da aplicação de fármacos que atuem por bloquear estas estruturas celulares.

7 CONCLUSÕES

- O glutamato induz liberação de GABA em células retinianas de embrião de galinha;
- O glutamato promove efluxo de compostos tióis em retinas de embrião de galinha, fenômeno este independente de sódio;
- A glutathiona aumenta os níveis extracelulares de GABA em retinas de embrião de galinha;
- BSO, inibidor da síntese de glutathiona, ameniza a liberação de GABA mediada por glutamato, em retinas de embrião de galinha;
- O ascorbato não interfere na liberação de GABA em retinas de embrião de galinha;
- GSH modula a liberação de GABA induzida por glutamato.

REFERÊNCIAS

- ADLER, R. Determination of cellular types in the retina. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 34: 1677 - 1682.1993.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula.** Porto Alegre. 4ªedição. Artmed, 2004.
- ALLEN, N.J.; KÁRADÓTTIR, R.; ATTWELL, D. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. **Eur J Physiol** 449: 132–142. 2004.
- AMARA, S. G. & KUHAR, M. J. Neurotransmitter Transporters: recent progress. **An. Rev. Neurosci.** 16:73 - 93. 1993.
- AMATO, A.; CONNOLLY, C.N; MOSS, S.J.; SMART, T.G. Modulation of neuronal and recombinant GABA A receptors byredox reagents. **Journal of Physiology** 517. 35—50. 1999.
- ANGULO, M.C.; LE MEUR, K.; KOZLOV, A.S.; CHARPAK, S.; AUDINAT, E. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol.* 86(3): 297-303. 2008.
- ANTFLICK, J.E. & HAMPSON, D.R. Modulation of release glutamate from parallel fibers by mGlu4 and pre-synaptic GABA_A receptors. **Journal of Neurochemistry** 120. 552–563. 2012.
- AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of Neuronal Glutathione Syntesis. **J. Pharmacol Sci.** 10.1254. 2008.
- BACKONJA, M.M. Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. *Neurology.* 10:59.14-7. 2002.
- BALCAR, V.J.; JOHNSTON, G.A.R. The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. **J. Neurochem.** 19: 2657–2666. 1972.
- BALLATORI, N.; KRANCE, S.N.; MARCHAN, R.; HAMMOND, C.L. Plasma membrabe glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. **Molecular Aspects of Medicine.**10.1016. 2008.
- BEAR, M. F. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso.** Porto Alegre. 3ª edição. Artmed, 2008.
- BECKMAN, M.L.; BERNSTEIN, E.M.; QUICK, M.W. Protein Kinase C Regulates the Interaction between a GABA Transporter and Syntaxin 1. **The Journal of Neuroscience.**18(16):6103–6112.1998.

BERNATH, S. & ZIGMOND, M.S. Characterization of [³H]GABA release from striatal slice: evidence of calcium-independent process via the GABA uptake system. **Neuroscience**. 27:563-570. 1988.

BERNARDO, S.; CANALS, S.; CASAREJOS, M.J.; SOLANO, R.M.; MENENDEZ, J.; MENA, M.A. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures, **J. Neurochem**. 91 667–682. 2004.

BERNE, R.B & LEVY, M.N. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. 4ª edição. Guanabara Koogan. 2000.

BOHME, I.; LÜDDENS, H. The inhibitory neural circuitry as target of antiepileptic drugs. *Curr Med Chem*. 8(11):1257-74. 2001.

BORDEN, L. A. GABA Transporter Heterogeneity: pharmacology and cellular localization. **Neurochem**, 29: 335 – 356. 1996.

BORDEN, L.; SMITH, K.; HARTIG, P.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R. Molecular Heterogeneity of the γ - Aminobutyric Acid (GABA) Transport System. **The Journal of Biological Chemistry**. 267: 21098 – 21104.1992.

BOUHOURS, B.; TRIGO, F.T.; MARTY, A. Somatic Depolarization Enhances GABA Release in Cerebellar Interneurons via a Calcium/Protein Kinase C Pathway. **The Journal of Neuroscience**. 31(15):5804 –5815. 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** .1016/0003-2697. 1976.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M.; IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J.; REICHENBACH, A. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. **Neurochem Int**. 54(3-4):143-60.2009.

CALAZA, K.C.; HOKOC, J.N.; GARDINO, P.F. Neurogenesis of GABAergic cells in the chick retina. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 18: 721 – 726. 2000.

CALAZA, K.C.; GARDINO, P.F.; DE MELLO, F.G. Transporter mediated GABA release in the retina: Role of excitatory amino acids and dopamine. **Neurochemistry International** 49: 769–777. 2006.

CAROBREZ, A.P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Rev Bras Psiquiatr** 25:52-8. 2003.

CASINI, G.; RICKMAN, D.W.; BRECHA N.C.; Expression of the gamma-aminobutyric acid (GABA) plasma membrane transporter-1 in monkey and human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.47(4):1682-90. 2006.

- CEPKO, C. L. Retinal cell fate determination. **Prog.Retinal Res.** 1-12. 1993.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.** 59(3):527-605. 1979.
- CHÁVEZ, A.E.; SINGER, J.H.; DIAMOND, J.S. Fast neurotransmitter release triggered by Ca influx through AMPA-type glutamate receptors. **Nature Letters.** 443:12. 2006.
- CHÁVEZ, A.E.; GRIMES, W.N.; DIAMOND, J.S. Mechanisms Underlying Lateral GABAergic Feedback onto Rod Bipolar Cells in Rat Retina. **The Journal of Neuroscience**, 30(6):2330 –2339. 2010.
- CHEN, A. & LUNTE, C.E. Microdialysis sampling coupled on-line to fast microbore liquid chromatography. **J Chromatogr A** 691:29–35. 1995.
- CHIU, C.S.; BRICKLEY, S.; JENSEN, K.; SOUTHWELL, A.; MCKINNEY, S.; CULL-CANDY, S.; MODY, I.; LESTER, H.A. GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. **J Neurosci.** 25(12):3234-45. 2005.
- CONTI, F.; MINELLI, A.; MELONE, M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. **Brain Res Rev.**45(3):196-212. 2004.
- CONTI, L; PALMA, E; ROSETI, C; LAURO, C; DEGROOT, R. M; ARONICA, E. LIMATOLA, C. Anomalous levels of Cl transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. **Epilepsia**, 1–10, 2011.
- COOPER, G. **A Célula, uma abordagem molecular.** Porto Alegre. Artmed, 2006.
- DA COSTA CALAZA, K.; HOKOC, J.N.; GARDINO, P.F. Neurogenesis of GABAergic cells in the chick retina. **Int. J. Dev. Neurosci.** 18 (8), 721–726. 2000.
- DAEMEN, M.A.; HOOGLAND, G.; CIJNTJE, J.M.; SPINCEMAILLE, G.H. Upregulation of the GABA-transporter GAT-1 in the spinal cord contributes to pain behaviour in experimental neuropathy. **Neurosci Lett.**444(1):112-5.2008.
- DALBY, N. O. Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. **European Journal Pharmacology.** 479:127-137. 2003.
- DANBOLT, C.N. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol** 65(1):1–105. 2001
- DELEVE, L. D. & KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol Ther.** 52: 287 - 305. 1991.

DE MELLO, M. C. F.; KLEIN, W. L.; DE MELLO, F.G. L-Glutamate evoked release of GABA from cultured avian retina cells does not require glutamate receptor activation. **Brain Research**, 443: 166 - 172.1987.

DEUTCH, A. Y.; ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. Neurotransmitter. **Fundamental neuroscience**.445: 174 – 182. 1999.

DICKINSON, D. A. & FORMAN, H.J. Cellular Glutathione and thiois metabolism. **Biochemical Pharmacology**. 64: 1019 - 1026.2002.

DO NASCIMENTO, J.L.M.; VENTURA, A.L.; DE CARVALHO, R. P. Veratridine- and glutamate-induced release of H⁻GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. **Brain Research**. 798: 217 - 222. 1998.

DO NASCIMENTO, J.L.M.; VENTURA, A.L.M.; DE CARVALHO, R. P. Evidence for two independent mechanisms of GABA release induced by veratridine and glutamate in monolayer cultures of chick embryo retinal cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 25: 379 – 383. 1992.

DO NASCIMENTO, J.L. & DE MELLO, F.G. Induced release of the gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated, high affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells. **J. Neurochem.** 45. 1820-1827. 1985.

DONOVAN, S. L. & DYER, M.A. Regulation of proliferation during central nervous systems development. **Developmental Biology**. 16: 407 – 421. 2005.

DOWLING, J. E. Retina. **Enc.Human Biol.** 612: 56 – 82.1991.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**. 62: 649 – 671. 2000.

DUARTE, C. B.; FERREIRA, I. L.; SANTOS, P. F.; OLIVEIRA, C. R.; CARVALHO, A. P. Ca²⁺-Dependent Release of ³[H]-GABA in Culture Chick Retina Cells. **Brain Research**, 591: 27 - 32. 1992.

EGGERS, E. & LUKASIEWICZ, P. Multiple pathways of inhibition shape bipolar cell responses in the retina. **Visual Neuroscience**. 28, 95–108. 2011.

FAMIGLIETTI, E.V. Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. **Vision research**. 21: 1559 – 1563. 1981.

FERREIRO-GALVE, S.; CANDAL, E.; CARRERA, I.; ANADÓN, R.; RODRÍGUEZ-MOLDES, I. Early development of GABAergic cells of the retina in sharks: an immunohistochemical study with GABA and GAD antibodies. **J Chem Neuroanat.** 36(1):6-16. 2008.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem.** 42: 1–11. 1984.

FRADE, J.; POPE, S.; SCHMIDT, M. Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes: a possible neuroprotective mechanism? **J Neurochem** 105:1144–1152. 2008.

FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. **J Neurosci** 17(21):8363-75. 1997.

GADEA, A. & LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. **J Neurosci Res.**15;63(6):461-8. 2001.

GAGLIARDI, R.J. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. **Arquivos de Neuro-Psiquitria.** 58:583–8. 2000.

GARCIA, T. B; OLIVEIRA, K.R.M; DO NASCIMENTO, J.L.M; CRESPO-LÓPEZ, M.E; PICANÇO-DINIZ, D.L.W; MOTA, T.C; HERCULANO, A.M. Glutamate Induces Glutathione Efflux Mediated by Glutamate / Aspartate Transporter in Retinal Cell Cultures. **Neurochem Res.** 36:412–418. 2011.

GOLAN, M.H.; MANE, R.; MOLCZADZKI, G.; ZUCKERMAN, M.; KAPLAN-LOUSON, V.; HULEIHEL, M.; PEREZ-POLO, J.R. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. **Neuropharmacology.**57(5-6):511-22.2009.

GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro, 11ª edição. Editora McGraw Hill, 2010.

GUO, N.; MCINTOSH, C.; SHAW, C. Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. **Neuroscience** 51: 835 - 842. 1992.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro, 11ª edição. Editora Elsevier, 2006.

HAMBURGUER, V. & HAMILTON, H. L. A Series of the Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. **J. Morpholol.** 88: 49 - 92. 1951.

HEALES, S.J.; BOLANOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1410: 215-228. 1999.

HJELLE, O.P.; RINVIK, E.; HUSTER, D.; REICHEL, W.; OTTERSEN, O.P. Antibodies to glutathione: production, characterization and immunocytochemical application to the central nervous system. Shaw, C.A (Ed.) *Glutathione in the Nervous System* Taylor & Francis, pp. 63 - 88. 1998.

HOFMANN, H.D; MOCKEL, V. Release of gamma-aminobutyric acid from cultured amacrine-like neurons mediated by different excitatory amino acid receptors, **J. Neurochem.** 56. 923–932. 1991.

HOKOC, J.N.; VENTURA, A.L.; GARDINO, P.F.; DE MELLO, F.G. Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. **Brain Res.** 532, 197–202. 1990.

HUBER, P.C. & ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, 31:5, 1170–1179, 2008.

JANAKY, R.; VARGA, V.; OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Release of ³[H]-GABA evoked by glutamate agonists from hippocampal slices: effects of dithiothreitol and glutathione. **Neurochemistry International** 24: 575-582. 1994.

JENSEN, K.; CHIU, C.; SOKOLOVA, I.; LESTER, H.A.; MODY, I. GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABA A versus GABA B receptors in the hippocampus. **J Neurophysiol** 90:2690-2701. 2003.

JIANG, X.; WANG, X.; SUN, Y.; GONG, H. ; LIANG, P. NMDA modulation of GABA transporter current in carp retinal horizontal cells. **Brain Research** 1240: 105 –110. 2008.

JOHNSTON, M.V. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. **Brain Dev.** 17: 301–306. 1995.

KANNAN, R.; YI, J.R.; TANG, D.; LI, Y.; ZLOKOVICI, B.V.; KAPLOWITZ, N. Evidence for the Existence of a Sodium-dependent Glutathione (GSH) Transporter. **The Journal of Biological Chemistry.** 271: 9754 – 9758. 1996.

KANNER, B. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. **J. Exp. Biol.** 196: 237–249. 1994.

KORPI, E.R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA A receptors. **Progress in Neurobiology** 67:113–159. 2002.

KRETZSCHMAR M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp Toxicol Pathol.** 48(5):439-46. 1996.

LASSOVÁ, L.; FINA, M.; SULAIMAN, P.; VARDI, N. Immunocytochemical evidence that monkey rod bipolar cells use GABA. **European Journal of Neuroscience**, Vol. 31, pp. 685–696, 2010.

LEHRE, K.P., DANBOLT, N.C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **J. Neurosci.** 18, 8751–8757. 1998.

LENDI K. & SVENNEBY, G. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in synaptosomal extracts. **J Chromatogr.** 24;198(4):516-9. 1980.

LESCH, K. P.; HELLS, A.; RIEDERER, P. The Role of Neurotransporters in Neurotoxicity, Neuronal Cell Death, Other Neurodegenerative Processes. **J. Mol. Med.** 74: 365 - 378. 1996.

LEVY, D.I.; SUCHER, N.J.; LIPTON, L. Glutathione prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. **Neuroreport.** 345 - 347. 1991.

LIPTON, S.A. & ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med.** 3;330(9):613-22. 1994.

LIU, Q.R.; CORCUERAL, B.L.; MANDIYAN, S.; NELSON, H.; NELSONS, N. Molecular Characterization of Four Pharmacologically Distinct γ - Aminobutyric Acid Transporters in Mouse Brain. **The Journal of Biological Chemistry.** 268: 2106 – 2112. 1993.

LUKASIEWICZ, P.D. GABA_C receptor-mediated inhibition in the retina. **Vision Research.** 44: 3289–3296. 2004.

MAGGESISSI, R.S.; GARDINO, P.F.; GUIMARÃES-SOUZA, E.M.; PAES-DE-CARVALHO, R.; SILVA, R.B.; CALAZA, K.C. Modulation of GABA release by nitric oxide in the chick retina: Different effects of nitric oxide depending on the cell population. **Vision Research** 49.2494–2502. 2009.

MATTHEWS JR., E.; RAHNAMA-VAGHEF, A.; ESKANDARI, S. Inhibitors of the g-aminobutyric acid transporter 1 (GAT1) do not reveal a channel mode of conduction. **Neurochemistry International.** 10.1016. 2009.

MEISTER, A. & ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 711 - 760. 1983.

MEISTER, A. & TATE, S.S. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. **Annu. Rev. Biochem.** 45: 559 - 604. 1976.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr.**1007S-1015S. 2000.

MOSINGER, J.L.; YAZULLA, S.; STUDHOLME, K.M. GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison, **Exp. Eye Res.** 42. 631–644. 1986.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Rev. Neurosci.** 3: 748-755, 2002.

NELSON, M.T. & BLAUSTEIN, M.P. GABA efflux from synaptosomes: effect of membrane potential and external GABA. **J. Membr. Biol.** 69. 213-223. 1982.

NEWMAN, E. & REICHENBACH, A. The Müller cell: a functional element of the retina. **Trends in Neuroscience:**10.1016/ 0166 - 2236. 1996.

O'BRIEN, D.; DOWLING, J.E. Dopaminergic regulation of GABA release from the intact goldfish retina, **Brain Res.** 360. 41–50. 1985.

OJA, S.S.; JANÁKY, R.; VARGA, V.; SARANSAARI, P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. **Neurochemistry International.** 37: 299 – 306. 2000.

OKUMICHI, H.; MIZUKAMI, M.; KIUCHI, Y; KANAMOTO, T. GABA A receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress. **Experimental Eye Research.** 10.1016. 2008.

OLIVEIRA, K.R.M.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International.** 10.1016. 2010.

ORLOWSKI, M. & KARKOWSKY, A. Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system International. **Review of Neurobiology** 19: 75 - 121. 1976.

OWENS, C.W.I; BELCHER, R.V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochem. J.** 94: 705-711. 1965.

PICANÇO-DINIZ D.L.W.; VALENÇA, M.M.; FAVARETTO, A.L.V.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Dipyridamole amplifies the effects of adenosine on gonadotropin and prolactin release from the rat anterior pituitary gland. **Medical Science Research,** 20: 783-785. 1992.

POHL-GUIMARÃES, F.; DA COSTA CALAZA, K.; YAMASAKI, E.; KUBRUSLY, R.C.; DE MELO REIS, R.A. Ethanol increases GABA release in the embryonic avian retina. **Int. J. Devl Neuroscience** 28. 189–194. 2010.

PORTUGAL, C.C.; MIYA, V.S.; DA COSTA CALAZA, K.; SANTOS, R.A.M.; PAES-DE-CARVALHO, R. Glutamate receptors modulate sodium-dependent and calcium-independent vitamin C bidirectional transport in cultured avian retinal cells. **Journal of Neurochemistry.** 108 507–520. 2009.

QUINLAN, E.M.; PHILPOT, B.D.; HUGANIR, R.L.; BEAR, M.F. Rapid experience dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. **Nat. Neurosci.** 2, 352–357.1999.

RAMÓN y CAJAL, S. La retiné des vertébrés. **La Célule.** V.9, p. 119-257. 1892.

REBEC, G.V. & PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Prog. Neurobiol.** 43,537–565. 1994.

RICE, M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends Neurosci.** 23, 209–216. 2000.

ROBERTS, E. What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. **Exp. Neurol.** 93:279-290. 1986.

ROH, Y.; MOON, C.; KIM, S.Y; PARK, M.H.; BAE, Y.C.; CHUN, M.; MOON, J. Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, in vivo. **Neuroscience Letters** 417. 266–270. 2007.

ROSENBERG, A. & KANNER, B. The Substrates of the γ - Aminobutyric Acid Transporter GAT-1 Induce Structural Rearrangements around the Interface of Transmembrane Domains 1 and 6. **The Journal of Biological Chemistry.** 283: 14376 - 14383. 2008.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S.D.; JACQOUT, J. The role of glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathiolation. **Annual Review Plant Biol.** 59: 143 – 66. 2007.

SAEZ, G.; BANNISTER, W.; BANNISTER J. Free radicals and thiol compounds ñ the role of glutathione against free radical toxicity, in Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. **Journal of Neurochemistry.** 237 – 254. 1990.

SANTOS, M.S; GONÇALVES, P.P.; CARVALHO, A.P. Release of γ - ^3H Aminobutyric Acid from synaptosomes: effect of external cations and of ouabain. **Brain Research** 547. 135-141. 1991.

SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; VINA, J. Glutathione. **The Handbook of Environmental Chemistry.** 2: 91-108.2005.

SCHOUSBOE, A.; SONNEWAL, D.U.; CIVENNI, G.; GEGELASHVILI, G. Role of astrocytes in glutamate homeostasis. Implications for excitotoxicity. **Adv Exp Med Biol.**429:195-206. 1997.

SCHWARTZ, E.A. Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, **J. Physiol.** 323. 211–227. 1982.

350-355

SEAL, R.P. & AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**39:431–56. 1999.

SHELDON, A.L. & ROBINSON, M.B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochem. Int.** 51, 333–355. 2007.

SHIGERI, Y.; SEAL, R.P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **European Journal of Pharmacology** 479: 237-247.2003.

SIAN, J.; GERLACH, M.; RIEDERER, P. The role of altered glutathione status in development of Parkinson's disease. **Glutathione in the Nervous System,** Ed. Ch.A.Shaw, Taylor & Francis, 12: 287 – 304. 1998.

SILVA, D.M.F.; FERRAZ, V.P.; RIBEIRO, A.M. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. **Journal of Neuroscience Methods**.177: 289–293.2009.

SLIVKA, A.; SPINA, M.B.; COHEN, G. Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. **Neuroscience Letters** 74. 112 - 118. 1987.

SMITH, C.G.S.; BOWERY, N.G.; WHITEHEAD, K.J. GABA transporter type 1 (GAT-1) uptake inhibition reduces stimulated aspartate and glutamate release in the dorsal spinal cord in vivo via different GABAergic mechanisms. **Neuropharmacology** 53. 975-981. 2007.

SUN, W.; SEIGEL, G.M.; SALVI, R.J. Retinal precursor cells express functional ionotropic glutamate and GABA receptors. **Neuroreport** 13: 2421 – 2424. 2002.

TAMURA, S.; NELSON, H.; TAMURA, A.; NELSON, N. Short External Loops as Potential Substrate Binding Site of g-Aminobutyric Acid Transporters. **The journal of Biological Chemistry**. 270.48:28712–28715. 1995.

TREICHEL, J.L.; HENRY, M.M.; SKUMATZ, C.M.; EELLS, J.T.;BURKE, J.M. Antioxidants and ocular cell type differences in cytoprotection from formic acid toxicity *in vitro*. **Toxicological sciences**. 82: 183–192. 2004.

TREIMAN, D.M. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia**. 3: 8 - 12. 2001.

WALDMEIER, P.C.; KAUPMANN, K.; URWYLER, S. Roles of GABAB receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release. **J Neural Transm**. 115(10):1401-11.2008.

WANG, W. & BALLATORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacological Reviews**. 50: 0031 – 6997. 1998.

WERMAN, R.; CARLEN, P.L.; KOSOWER, E.M. Effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on acetylcholine release at the frog endplate. **Nat. New Biol**. 233: 120 – 121. 1971.

WINTERBOURN, C. & METODIEWA, D. The reactions of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys**. 314: 284 – 290. 1994.

YAMASAKI, E. N.; BARBOSA, V. D.; DE MELLO, F. G.; HOKOC, J. N. GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. **Int. J. Des. Neurosci**: 17, 201–213. 1999.

YAMASHITA, M. & FUKUDA Y. Calcium channels and GABA receptors in the early embryonic chick retina. **Journal of neurobiology**. 24: 1600 - 1614. 1993.

YANG, X.L. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Prog. Neurobiol.** 73: 127 – 150. 2004.

YAO, K.; GODWIN, A.K.; OZOLS, R.F.; HAMILTON, T.C.; O'DWYER, P.J. Variable baseline gamma-glutamylcysteine synthetase messenger RNA expression in peripheral mononuclear cells of cancer patients, and its induction by buthionine sulfoximine treatment. **Cancer Res.** 53. 3662–3666. 1993.

YAZULLA, S. GABAergic mechanisms in the retina, **Prog. Retinal Res.** 5. 1–12. 1986.

ZOMOT, E. & KANNER, B. The Interaction of the γ - Aminobutyric Acid Transporter GAT-1 with the Neurotransmitter Is Selectively Impaired by Sulfhydryl Modification of a Conformationally Sensitive Cysteine Residue Engineered into Extracellular Loop IV. **The Journal of Biological Chemistry.** 278: 42950 – 42958. 2003.