



NATIELLE FERREIRA RABELO

**INFLUÊNCIA DA GLUTATIONA (GSH) NOS REGISTROS
ELETORRETINOGRÁFICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

BELÉM
2014

NATIELLE FERREIRA RABELO

**INFLUÊNCIA DA GLUTATIONA (GSH) NOS REGISTROS
ELETORRETINOGRÁFICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará como requisito final
para obtenção do grau de Mestre em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Duarte
Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Fernando
Allan Farias Rocha

Belém
2014

NATIELLE FERREIRA RABELO

**INFLUÊNCIA DA GLUTATIONA (GSH) NOS REGISTROS
ELETORRETINOGRÁFICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Coorientador:

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha

Examinadores:

Prof. Dra Karen Renata Matos de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (membro titular)

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (membro titular)

Prof. Dr. Anderson Raiol Rodrigues

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (membro titular)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Bruno Duarte Gomes pela oportunidade, pela orientação e pela paciência. Por ensinar a importância da dedicação na realização desse trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha pela paciência, pela contribuição no trabalho e pelas observações sempre coerentes.

Ao Professor Dr. Anderson Manoel Herculano de Oliveira da Silva e aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia, pela prestatividade, pelas ideias e por cederem parte do material utilizado na realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica, por cederem parte do material utilizado na realização desse trabalho.

À Glenda Figueira Guimarães, parceira nessa jornada, pelo apoio e pela amizade.

À minha família, pelo apoio, mesmo à distância.

A UFPA pela estrutura para a realização do trabalho.

A Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

Nothing makes me more productive than the last minute.

Nada me faz mais produtivo do que o último minuto.

Autor desconhecido.

RESUMO

A glutathiona (GSH) é uma molécula que intervêm em diversos processos biológicos, conhecida principalmente pela sua ação antioxidante. Atualmente, esse tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina têm sido amplamente estudados pela sua possível ação como neurotransmissor e neuromodulador no CNS. No presente trabalho foi avaliada a ação dessa molécula através do eletrorretinograma, para avaliar a resposta em massa da retina, produzida após estimulação luminosa. Métodos: foram realizadas injeções intravítreas de GSH em diferentes concentrações (1, 5 e 10 mM) e de PBS (controle) em ratos *Wistar*. O protocolo de avaliação consistiu de 6 estímulos em diferentes condições de adaptação: resposta Escotópica de bastonetes e resposta Escotópica máxima, após adaptação ao escuro de pelo menos 12h; resposta Fotópica de cones, após 10 min de adaptação ao claro, com a utilização de filtros para a avaliação das subpopulações de cones UV e S; e a resposta ao estímulo de flicker em 12 Hz. Os principais parâmetros analisados foram as amplitudes das ondas -a e -b e seus respectivos tempos implícitos e a amplitude das ondas -b do flicker. RESULTADOS: os resultados mostram alterações nas respostas com a diminuição da amplitude da onda-b do ERG em todos os estímulos. Quando realizado o teste de múltiplas comparações, foram observadas diferenças entre os grupos controle e GSH 5mM e GSH 10mM. Alterações na amplitude da onda-a só foram observadas na resposta Escotópica máxima, com significativa diminuição da amplitude. Os tempos de latência das respostas não apresentaram alterações em nenhum grupo avaliado. DISCUSSÃO: as células de Muller na retina contém grande quantidade de GSH e podem atuar ativamente na modulação das respostas glutamatérgicas e glicinérgicas; além disso, já foi mostrado que a GSH induz a liberação de GABA na retina, o que pode explicar a diminuição das amplitudes observadas pela super-ativação de alguma via inibitória. CONCLUSÃO: o presente trabalho vem colaborar com a hipótese de que a GSH atue como neuromodulador no SNC, com significativas alterações inibitórias após sua administração na retina.

Palavras-chave: glutathiona, retina, eletrorretinograma, neuromodulação.

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is a molecule involved in many biological processes, known primarily for its antioxidant. Currently, this tripeptide composed of glutamate, cysteine and glycine has been widely studied for its possible action as a neurotransmitter in the CNS and neuromodulator. The present study evaluated the action of this molecule through the electroretinogram, to evaluate the mass response of the retina, produced after light stimulation. Methods: GSH intravitreal injections were performed at different concentrations (1, 5 and 10 mM) and PBS (control) in *Wistar* rats. The assessment protocol consisted of 6 stimuli in different conditions of adaptation: Scotopic response of rods and Scotopic maximal response after dark adaptation of at least 12h; photopic cone response after 10 min of adaptation to the course, with the use of filters subpopulations for the evaluation of UV and S cones, and the response to the stimulus flicker at 12 Hz. The main parameters were the amplitudes of the waves -a and -b and their implicit time, and b-wave amplitude of the flicker. RESULTS: The results show changes in response, with decrease in b-wave amplitude of the ERG in all stimuli. When done the test of multiple comparisons, differences were observed between the control group and 5 mM GSH and 10 mM GSH. Changes in the amplitude of a-wave only observed in Scotopic maximal response, with a significant decrease in the amplitude. The latency time of the responses showed no changes in any individual group. DISCUSSION: The retinal Muller cells contains a large amount of GSH and may act actively in the modulation of glutamate and glycinergic responses, also has been shown that GSH induces the release of GABA in the retina, which may explain the decrease of the amplitudes observed by over-activation of an inhibitory pathway. CONCLUSION: The present work supporting the hypothesis that GSH acts as a neuromodulator in the CNS, with significant inhibitory changes in the retina after administration.

Keywords: glutathione, retina, electroretinogram, neuromodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glutathione (1): γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine.....	4
Figura 2. Diferenças estruturais entre cones e bastonetes. Embora, similares em estrutura, bastonetes (A) e cones (B) diferem em tamanho e forma, bem como na organização dos discos membranosos em seus segmentos externos.	9
Figura 3. Organização das células da retina em camadas.	11
Figura 4. Curva de sensibilidade espectral dos cones UV e M.....	14
Figura 5. Componentes básicos da onda do ERG.	16
Figura 6. Esquema identificando os componentes que ERG que melhor avaliam as populações neuronais específicas dentro da retina dos roedores. Abreviações para células marcadas no esquema da retina (painel da esquerda): a: amácrina, b: bipolar, c: cone; g: ganglionar; i: interplexiforme; m: Muller, r: bastonete e EPR: epitélio pigmentar da retina.....	21
Figura 7. Eletrodos utilizados no registro eletrorretinográfico: (A) terra, (B) referência e (C) ativo.	23
Figura 8. Desenho esquemático dos equipamentos utilizados nos registros eletrorretinográficos. 1. Fotoestimulador; 2. Gaiola de Faraday; 3. Amplificador; 4. Conversor análogo/digital; 5. Computador para armazenagem e processamento dos registros. Notar os três eletrodos posicionados no animal. Fonte: da autora.	23
Figura 9. Ordem cronológica dos estímulos.....	25
Figura 10. Padrão de resposta obtido no ERG as com linhas para medições dos principais parâmetros do registro: amplitude e tempo implícito da onda-a e onda-b. E: início do estímulo, L: Latência.....	27
Figura 11. Modelo de análise do Flicker de 12 Hz.	27
Figura 12. Modelo de análise dos potenciais oscilatórios. A seta vermelha indica a amplitude de PO3: potencial oscilatório 3.	28
Figura 13. À esquerda, resposta escotópica máxima de um rato <i>Wistar</i> , à direita a mesma resposta filtrada com filtro passa-baixa de 100 Hz.	28
Figura 14. Respostas obtidas no ERG de ratos <i>Wistar</i> usados como controle. Fonte: da autora.....	31
Figura 15. Resposta escotópica de bastonetes. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.	34
Figura 16. Resposta escotópica de bastonetes. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle ...	35

Figura 17. Resposta escotópica de máxima. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.	346
Figura 18. Resposta escotópica de máxima. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle .	357
Figura 19. Resposta de cones. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.	348
Figura 20. Resposta de cones. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle	359
Figura 21. Resposta de cones UV. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.	40
Figura 22. Resposta de cones UV. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle	41
Figura 23. Resposta de cones S. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.	42
Figura 24. Resposta de cones S. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle	43
Figura 26. Comparação das subpopulações de cones UV e S com a utilização de filtros azul e verde, respectivamente. Valores expressos em média +- desvio-padrão. A diferença na intensidade das cores é apenas ilustrativa.	46
Figura 27. Comparação do estímulo de flicker em 12 Hz. Amplitude em microvolts.....	48
Figura 28 Comparação da amplitude de PO3.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais.	21
Tabela 2. Padrões de respostas obtidos no ERG.	25
Tabela 3. Médias e desvios-padrão da amplitude da onda-a dos grupos experimentais.	44
Tabela 4. Média e desvio-padrão dos tempos de latência da onda-a dos grupos experimentais.	44
Tabela 5. Média e desvio-padrão da amplitude da onda-b dos grupos experimentais.	45
Tabela 6. Média e desvio-padrão dos tempos de latência da onda-b dos grupos experimentais.	45
Tabela 7. Média e desvio-padrão dos grupos experimentais após estímulo de flicker em 12 Hz.	47
Tabela 8. Média e desvio-padrão dos grupos após a medida dos potenciais oscilatórios.	49

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina trifostato
EPR	Epitélio pigmentar da retina
ERG	Eletrorretinograma
ffERG	Eletrorretinograma de Campo Total, do inglês <i>Full Field Electrorretinogram</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico, do inglês <i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
GSH	Glutationa na forma reduzida
GSSG	Glutationa na forma oxidada
ISCEV	Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão, do inglês <i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
NMDA	N-Metil D--Aspartato
OPs	Potencial oscilatório, do inglês <i>Oscillatory Potencial</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca²⁺	Íon cálcio
Hz	Hertz
Kg	Quilograma
Mg⁺²	Íon magnésio
μV	Microvolt
mM	Milimol
mg	Miligramma
ms	Milissegundo
mV	Milivolts
nm	Nanômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 GLUTATIONA.....	3
2.2 FUNCIONAMENTO BÁSICO DA RETINA	7
2.3 O SISTEMA VISUAL DO RATO.....	12
2.1 O ELETORRETINOGRAMA	14
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVO.....	20
4.1 GERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 ANIMAIS.....	21
5.2 INJEÇÃO INTRAVÍTEA	21
5.3 REGISTRO ELETORRETINOGRÁFICO	22
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
6. RESULTADOS	30
6.1 ONDA-A	44
6.2 ONDA-B	44
7. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO.....	512
REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, comumente descrito por sua importância como agente redox. Amplamente encontrada nos diversos tecidos, vêm tendo destaque na participação da fisiologia da retina, onde é encontrada em concentrações milimolares, e é liberada em maior quantidade pelas células gliais de Muller. Estudos que mostram que a GSH pode modular correntes excitatórias e inibitórias já que sua estrutura química possui afinidade com receptores glutamatérgicos e GABAérgicos, e seus constituintes básicos exercerem importante papel farmacológico no SNC. Esses resultados apontam para uma ação mais específica no SNC, exercendo efeito sobre a liberação de neurotransmissores.

A retina é responsável pela captação de sinais luminosos e transformação desses em sinais neurais, processo iniciado a partir da absorção de luz pelos fotorreceptores. Na retina de vertebrados encontramos dois tipos de fotorreceptores: os bastonetes e os cones, divididos morfologicamente em segmento externo, segmento interno, corpo celular e terminais sinápticos. Cones e bastonetes possuem diferenças morfológicas e funcionais, mas realizam semelhantes mecanismos de conversão de informação luminosa em elétrica, em um fenômeno chamado de fototransdução. Esse processo se inicia com a absorção de luz pelos pigmentos visuais seguido das conformações moleculares resultantes. Através de processos de adaptação, os fotorreceptores respondem de forma graduada, com aumento da amplitude da resposta proporcionalmente à intensidade do estímulo.

Dessa forma, o presente projeto pretende estudar a ação direta da GSH na retina através dos potenciais elétricos gerados após sua administração, e obtidos através de diferentes estímulos e condições de adaptação. Uma das técnicas amplamente utilizada para a avaliação funcional da retina é o eletrorretinograma de campo total (ffERG – *full field electroretinogram*), que é o registro elétrico da resposta em massa da retina, produzida após estimulação luminosa. O eletrorretinograma amplamente utilizada como ferramenta para avaliar a ação de substâncias.

Os componentes mais analisados nos estudos que utilizam o ffERG são a onda negativa (a) e a positiva (b), cuja amplitude e tempo implícito são determinados,

os potenciais oscilatórios e a análise de flicker. Essas respostas permitem inferir, a partir das respostas obtidas que grupo de células da retina está respondendo ao estímulo.

Com o processamento dos dados obtidos, espera-se contribuir na construção de hipóteses acerca da ação da GSH na função retiniana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GLUTATIONA

A glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, apresentando um grupamento sulfidríla (-SH) e uma ligação peptídica do tipo γ -glutamil entre o glutamato e a cisteína (Figura 1). Nos tecidos saudáveis cerca de 90% da glutathiona existente encontra-se na forma reduzida (GSH), apresentando-se em concentrações entre 0,1 e 10 mM (TAPIERO, 2003).

A GSH é uma molécula que intervêm em diversos processos, como antioxidantes e detoxificante, no transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa de certas enzimas, proteção do organismo contra a exposição a radiações solares e, estudos recentes apontam para uma participação importante da GSH na morte celular programada (DRINGEN, 1999; FORMAN, 2009; PARK, 2010).

Os níveis de celulares de GSH são regulados, em condições normais, por dois mecanismos principais: através do controle das taxas da sua síntese e da sua exportação a partir das células. Outros agentes ou condições também podem influenciar os níveis de GSH, através da alteração do estado redox do tiol, que leva a formação de conjugados-S ou complexos, que interrompem a distribuição de GSH entre várias organelas intracelulares (BALLATORI *et al*, 2009).

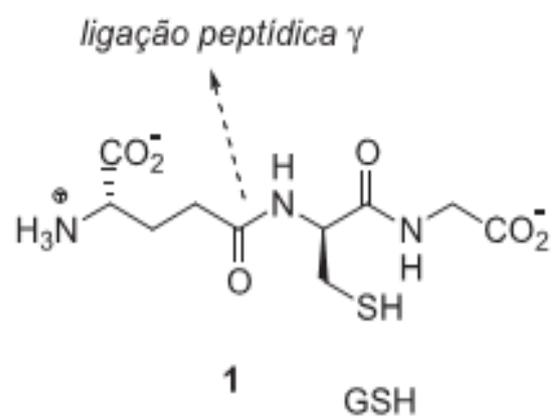


Figura 1. Glutationa (1): γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina Fonte: Huber et al, 2008.

A biossíntese de GSH ocorre no meio intracelular, pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamina e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, levando à γ -L-glutamil-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione sintetase, etapas estas que requerem ATP e Mg^{+2} .

A enzima responsável pela redução da GSSG à GSH é a glutathione redutase. Os sítios ligantes para GSSG estão situados na interface das duas subunidades que constituem a estrutura quaternária da glutathione redutase, sendo que cada uma tem um domínio distinto com um sítio ligante para o NADPH (HUBER *et al.*, 2008; OJA *et al.*, 2009)

Após sua síntese, a GSH é liberada para outros compartimentos intracelulares, como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e para o espaço extracelular, para então, ser utilizada por outras células e tecidos (BALLATORI *et al.*, 2005).

A degradação da GSH ocorre no espaço extracelular, nas superfícies de células que expressam a chamada g-glutamyl transpeptidase, o que contrasta com sua síntese, que ocorre exclusivamente no espaço intracelular. Depois que os componentes contendo GSH são liberados a partir das células, começam a ocorrer eficientes ciclos de degradação e utilização da glutathione (OJA *et al.*, 2009; BALLATORI *et al.*, 2005).

No interior da célula, o tripeptídeo existe principalmente na sua forma reduzida (GSH), correspondendo a cerca de 98% do total. Em algumas células existe também a presença da GSSG, assim como de outros produtos conjugados de glutathione (BALLATORI *et al.*, 2005).

O cérebro é bastante sensível à alteração da homeostasia da GSH. Disfunções do sistema nervoso estão relacionados com erros inatos do metabolismo da GSH. Na tentativa de explicar a sensibilidade das células cerebrais às oscilações dos níveis de GSH, duas hipóteses são consideradas: o consumo de altas concentrações de oxigênio, e a ação da GSH como possível neuromodulador ou neurotransmissor, sendo assim essencial para a atividade do SNC (DRINGEN, 1999; BALLATORI, 2009).

Devido a GSH ser constituída de três aminoácidos neuroativos: glutamato, cisteína e glicina, ela poderia ser considerada como um peptídeo armazenador ou precursor destas moléculas biologicamente ativas. Glutamato e glicina são neurotransmissores excitatório e inibitório, respectivamente, porém, a cisteína

também desencadeia um efeito excitatório no receptores de glutamato do tipo NMDA. A degradação da GSH extracelular pela g-glutamyl transpeptidase libera glutamato em locais específicos do cérebro, e a subsequente hidrólise mediada pela peptidase da cisteínaglicina libera cisteína e glicina. Além de funcionar como fonte de aminoácidos neuroativos, existe uma crescente evidência que a GSH desempenha um papel de neurotransmissor ou neuromodulador (BALLATORI et al, 2005, OJA, 2009).

Pan e colaboradores, em 1995 mostraram que a GSH modula aumentando as correntes de GABA na retina de ratos via receptor GABA_A. Além disso, a GSH mostrou também papel importante na modulação da liberação de GABA induzida por glutamato na retina de galinhas, porém, por um mecanismo desconhecido (PEREIRA, 2012). O papel do GABA, o principal transmissor inibitório no sistema nervoso central, incluindo a retina na formação da onda-b permanece controversa. Os receptores GABA_A e GABA_C desempenham papéis importantes e distintos na geração das respostas luz-induzidas na retina dos ratos; além disso, seus bloqueios possuem efeitos opostos na onda-b do ERG (KAPOUSTA-BRUNEAU, 2000).

A relevância inerente à GSH também é observada na estratégia terapêutica de suplementação com antioxidantes, o que trouxe resultados benéficos na prevenção ou retardo de anomalias oculares. (KRYZHANOVSKY, 2004).

Na retina, as lentes dependem de um estado redox balanceado para manutenção da completa transparência. Os altos níveis de GSH são importantes para proteção dos grupos tiois contra as espécies reativas de oxigênio (DAVID & SHEARER, 1984). A distribuição de GSH é específica, com armazenamento dominante nas células horizontais e células gliais de Muller (POW & CROOK, 1995).

Como um neuromodulador, glutathione se liga através da sua porção de g-glutamyl de receptores de glutamato ionotrópicos. Em concentrações micromolares ela desloca agonistas de glutamato e desta maneira previne entrada excitatória para atingir neurônios mediadas por AMPA e NMDA. O glutamato-antagonismo da glutathione também fornece a base para a defesa neuronal contra a excitotoxicidade do glutamato. Por outro lado, em concentrações milimolares, GSH, por meio do seu grupo cisteinil livre, regula o estado redox de receptores NMDA (OJA, 2009).

As interações de glutathione com a liberação de outros neurotransmissores têm sido investigada de forma bastante fragmentada. Acompanhamento ontogênico e filogenético na ligação de glutathione, estudos comportamentais sobre suas ações,

desenho e caracterização dos análogos da glutathione e ativas avaliação do seu possível potencial terapêutico no tratamento doenças neurológicas associadas com glutamato ou com a toxicidade cisteína, um dos seus constituintes básicos, são as novas abordagens que estão se desenhando nas pesquisas sobre o potencial dessa abundante molécula que vem colaborando no avanço na terapia de diversas patologias associadas ao estresse oxidativo. Isso poderá ter grande contribuição com o conhecimento acerca dos locais de atuação e ligação, e pela forma como a GSH atua. (OJA, 2009; NETO, 2010). Dessa forma, a avaliação do papel da GSH na retina possibilitaria um maior entendimento acerca do papel fisiológico dessa molécula.

2.2 FUNCIONAMENTO BÁSICO DA RETINA

A retina está localizada dentro do globo ocular, e seu relativo isolamento físico do resto do Sistema Nervoso Central (SNC) facilita alguns procedimentos experimentais que podem poupar outras estruturas vitais do SNC; e, conseqüentemente, a sobrevivência dos animais não é comprometida e os estudos de longo prazo podem ser viáveis (VIDAL-SANZ, 2012).

A luz chega à retina e atravessa as camadas mais internas sendo, então, captada pelos fotorreceptores, que são as células capazes de responder diretamente à luz (CONNORS, 2002).

O processo de transformação do sinal luminoso captado pelos fotorreceptores em um sinal elétrico que poderá ser interpretado pelo SNC é chamado de fototransdução. Esse processo inicia-se com a ativação dos fotopigmentos (rodopsina nos caso dos bastonetes e opsina no caso dos cones) dos fotorreceptores (Figura 2). A rodopsina ativa a transducina, uma proteína G localizada na membrana do segmento externo dos fotorreceptores. A transducina ativa, então, a fosfodiesterase (PDE), uma enzima que hidrolisa a Guanosina Monofosfato Cíclica (GMPc), que é o segundo mensageiro. Isso induz o fechamento dos canais de cátions ativados pelo GMPc, gerando uma hiperpolarização graduada no fotorreceptores, pela interrupção de íons Na^+ . Como consequência, a liberação de glutamato na sinapse é diminuída. Na ausência de luz a PDE não é ativada, por conseguinte, não ocorre a degradação de GMPc, permanecendo aberto os canais de cátions e as células despolarizadas, com contínua liberação de glutamato (BURNS, 2002; COBBS, 1983).

Em baixos níveis de luz, apenas os bastonetes têm sensibilidade suficiente para apresentar alterações graduadas do seu potencial de membrana após capturar poucos fótons. Visão de cores não é possível em níveis tão baixos de luz, porque os sinais a partir de um único detector, o bastonete, não podem ser diferenciados entre modulações espectrais. Em altos níveis de luz, em humanos e primatas do velho mundo, três tipos de cones respondem seletivamente a fótons em diferentes regiões do espectro visível – comprimento de onda longo (vermelho ou L), comprimento de onda médio (verde ou M) e comprimento de onda curto (azul ou S) (CASAGRANDE, 2004).

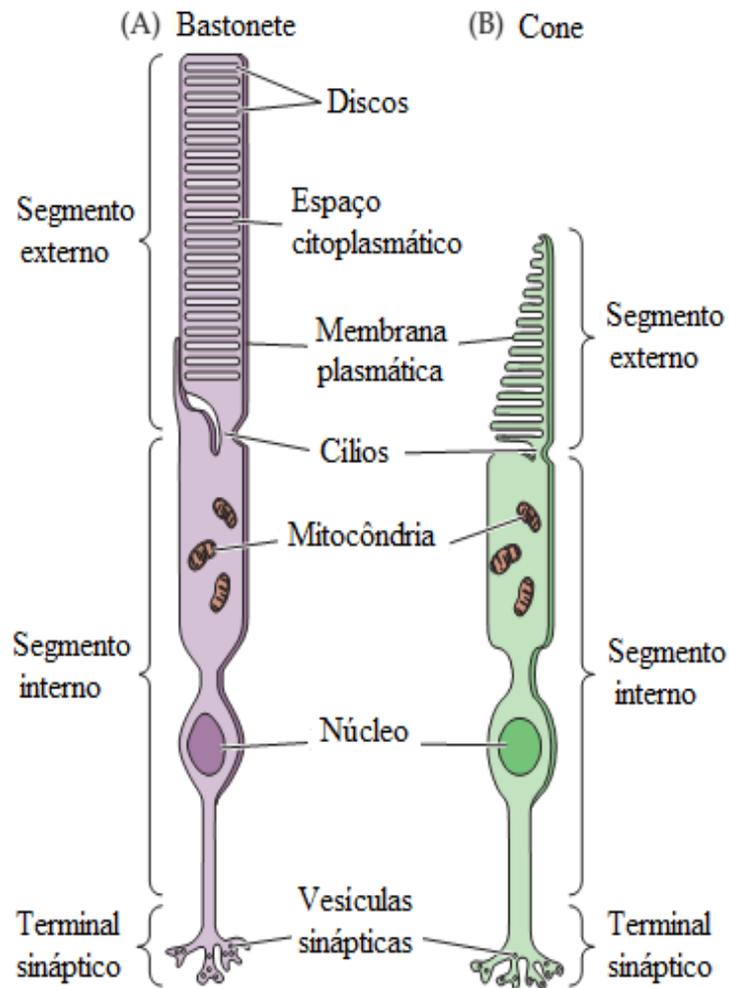


Figura 2. Diferenças estruturais entre cones e bastonetes. Embora, similares em estrutura, bastonetes (A) e cones (B) diferem em tamanho e forma, bem como na organização dos discos membranosos em seus segmentos externos. (Adaptado de Purves, 2004).

As camadas que compõem a retina, tomando como base a região mais externa do globo ocular são (KOLB, 2004; WASSLE, 2004):

1. O epitélio pigmentar, formado pelas células produtoras de melanina, responsáveis pela dissipação dos fótons de luz que atravessam a retina.
2. Segmento externo dos fotorreceptores, responsável pela transdução.
3. Membrana limitante externa, que separa o segmento externo dos fotorreceptores de seus núcleos.
4. Camada nuclear externa, formada pelos núcleos e corpos celulares dos fotorreceptores cones e bastonetes.
5. Camada plexiforme externa, onde ocorre a interação entre axônios dos fotorreceptores e os dendritos dos interneurônios (células bipolares horizontais).
6. Camada nuclear interna, que apresenta os corpos e núcleos dos neurônios de segunda ordem ou interneurônios, que são as bipolares, horizontais e amácrinas.
7. Camada plexiforme interna, que contém as sinapses formadas pelos axônios dos interneurônios e os dendritos das células ganglionares.
8. Camada de células ganglionares, que abriga os corpos celulares dessas células.
9. Camada de fibras nervosas, que é formada pelos axônios das células ganglionares que darão origem ao nervo óptico.
10. Membrana limitante interna, que é formada pelas células de Muller, tendo como principal função a manutenção da forma da retina e o fornecimento dos substratos essenciais à manutenção dos neurônios. (Figura 3).

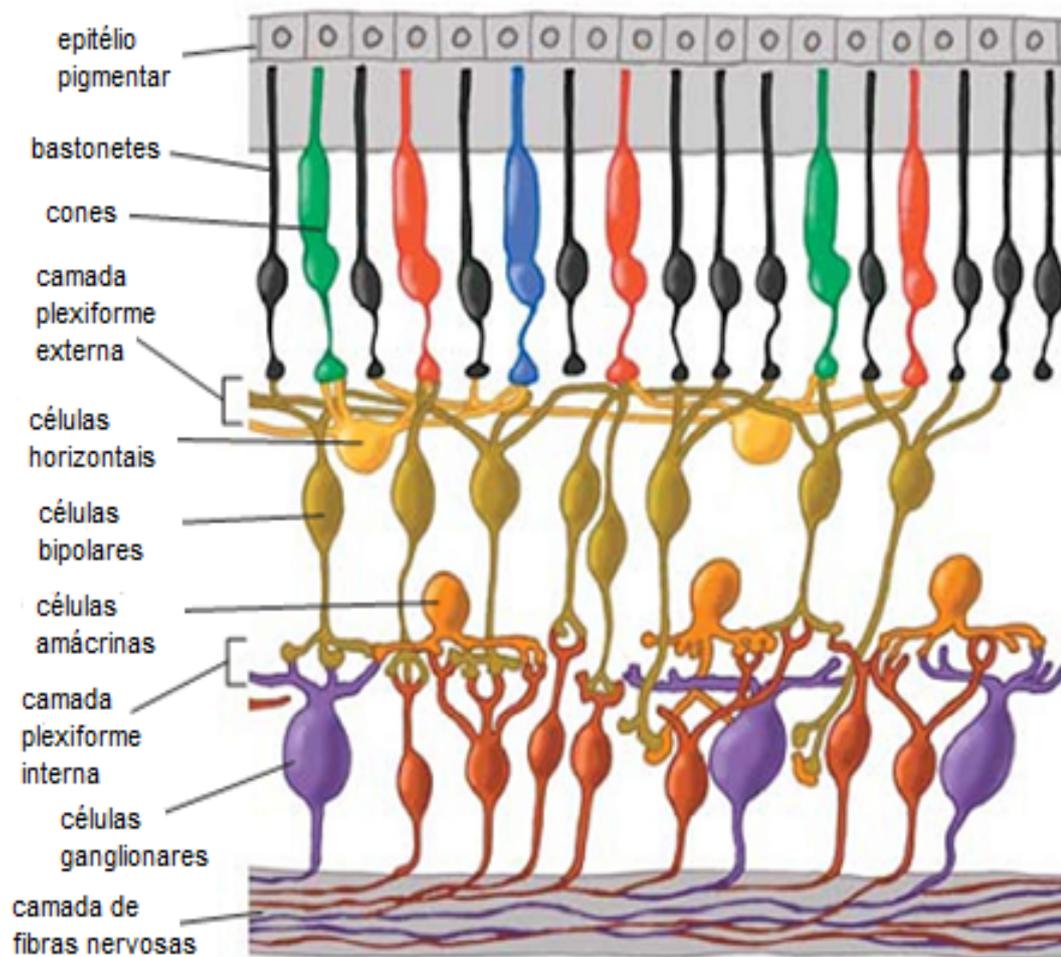


Figura 3. Organização das células da retina em camadas. Adaptado de Kolb, 2004.

Após ocorrerem alterações nos potenciais graduados dos fotorreceptores, essas alterações são transmitidas nos potenciais graduados das células bipolares. As células bipolares podem ser classificadas em Tipo *On* e Tipo *off*, possuindo efeitos contrários em resposta ao neurotransmissor liberado. Se a célula bipolar se hiperpolarizar na presença de glutamato e despolarizam na ausência deste, ela é classificada como Tipo *on*, se ocorrer despolarização na presença e hiperpolarização na ausência de glutamato, a classificação é o Tipo *off* (WASSLE, 2004; TAYLOR, 2000, MILLER, 1988).

Existe uma relação direta entre função e campo receptivo nas células bipolares. O conceito de campo receptivo corresponde à área da retina que gera alterações no potencial de membrana da célula quando estimulada. A célula bipolar possui seu campo receptivo em duas regiões denominadas centro e periferia. O centro recebe aferências diretas dos fotorreceptores com os quais as células bipolares realizam sinapses; a periferia recebe informações dos fotorreceptores adjacentes através das sinapses com as células horizontais, constituindo junto com as células amácrinas uma via lateral de transmissão (PURVES, 2002; WASSLE, 2004; KOLB, 2003).

A retina contém uma variedade de neurotransmissores, onde o glutamato e o GABA se destacam como os principais excitatório e inibitório, respectivamente. Tanto fotorreceptores como células bipolares liberam glutamato, tornando esse neurotransmissor o responsável pelo fluxo radial do sinal visual na retina. Essa liberação, muitas vezes pode induzir ou alterar a atividade dos neurônios pós-sinápticos na retina por alterar diretamente a permeabilidade da membrana aos íons ou pela ativação dos sistemas intracelulares através de receptores de glutamato ionotrópicos e metabotrópicos. O GABA é utilizado por numerosas células horizontais e amácrinas, modulando a transmissão sináptica em ambas as camadas (PURVES, 2002; YANG, 2004).

2.3 O SISTEMA VISUAL DO RATO

O sistema visual do rato tem sido assunto de intensas investigações por várias décadas. Ainda permanece no foco de interesse dos oftalmologistas como um modelo

facilmente acessível de vários tipos de degenerações retinianas herdadas e experimentais (CICERONE, 1976).

Ratos nascem com retinas imaturas. A maturação pós-natal da retina posterior precede a maturação da retina periférica; o volume e a superfície de área aumentam à medida que a retina se desenvolve (BRAEKVELT & HOLLENBERG, 1970).

A camada de fotorreceptores em ratos contém aproximadamente 99% de bastonetes e 1% de cones. Esse sistema visual dominado por bastonetes é essencialmente ativo em condições escotópicas é importante devido o rato ser um animal noturno. A distribuição espacial de cones e bastonetes é relativamente uniforme por toda a retina, não contendo fóvea (SZEL 1992; ROLICH, 2000).

Ao contrário de primatas e alguns marsupiais, a regra geral em mamíferos é a presença de apenas dois subtipos de cones. Na retina de vários roedores, são encontrados dois subtipos de cones: cones UV com pico de sensibilidade espectral em 358 nm; e os cones M, apresentando pico de sensibilidade em 510 nm. A presença de apenas dois cones nesses animais é o requisito básico para o estabelecimento da visão dicromata (JACOBS, 2001) (Figura 4).

A retina de ratos e camundongos, ambas dominadas por bastonetes, possuem o mesmo conjunto de células bipolares, como a retina primatas ou esquilos, que são cone-dominante (GHOSH, 2004).

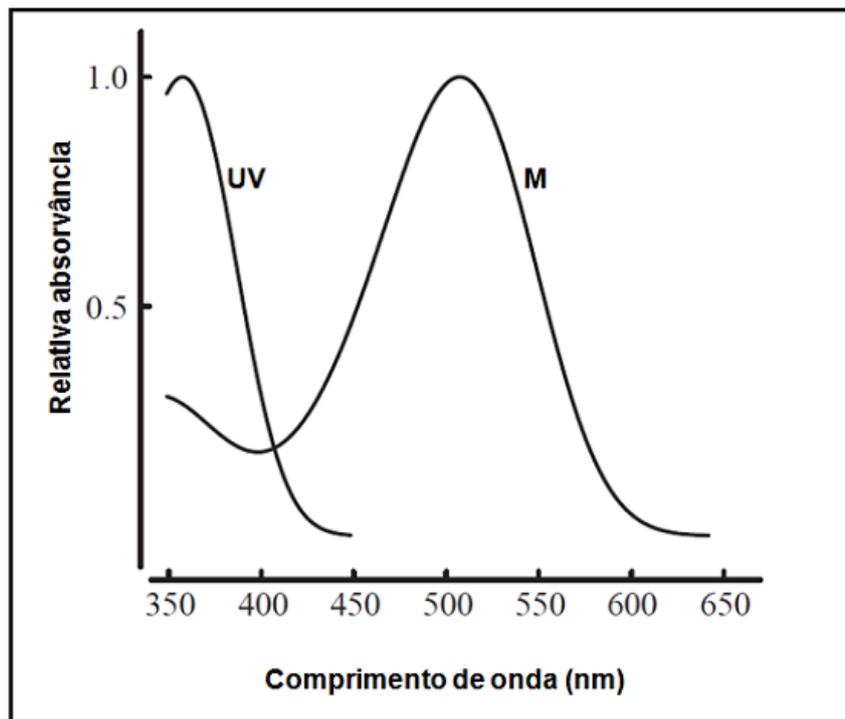


Figura 4. Curva de sensibilidade espectral dos cones UV e M. Fonte: Jacobs et al, 2003. Modificado por Rodrigues, 2013.

O refinamento dos estudos de toxicidade tem levado a um aumento na demanda por testes funcionais. Desse modo, a função da retina de ratos tem sido cada vez mais avaliada por eletrorretinografia (KRINKE *et al*, 1988).

O ERG pode ser medido de forma não-invasiva através de eletrodos posicionados na superfície da córnea ou esclera. É composto de um potencial de campo gerado por vários tipos celulares, de quem as contribuições relativas dependem das condições de estímulo, e tem sido conhecido como uma ferramenta útil para a avaliação objetiva da função da retina. (BUI & FORTUNE, 2003).

O ERG é composto dos principais componentes clássicos: as ondas-a, -b, -c e -d, cada uma expressando ativação preferencial de células ou uma cadeia de ativação de células da retina (Figura 5). Essa ativação preferencial se expressa claramente na dupla organização da retina, baseada em um sistema de cones e bastonetes, que é também refletida nas ondas do ERG (GRANIT, 1935; GRANIT, 1937).

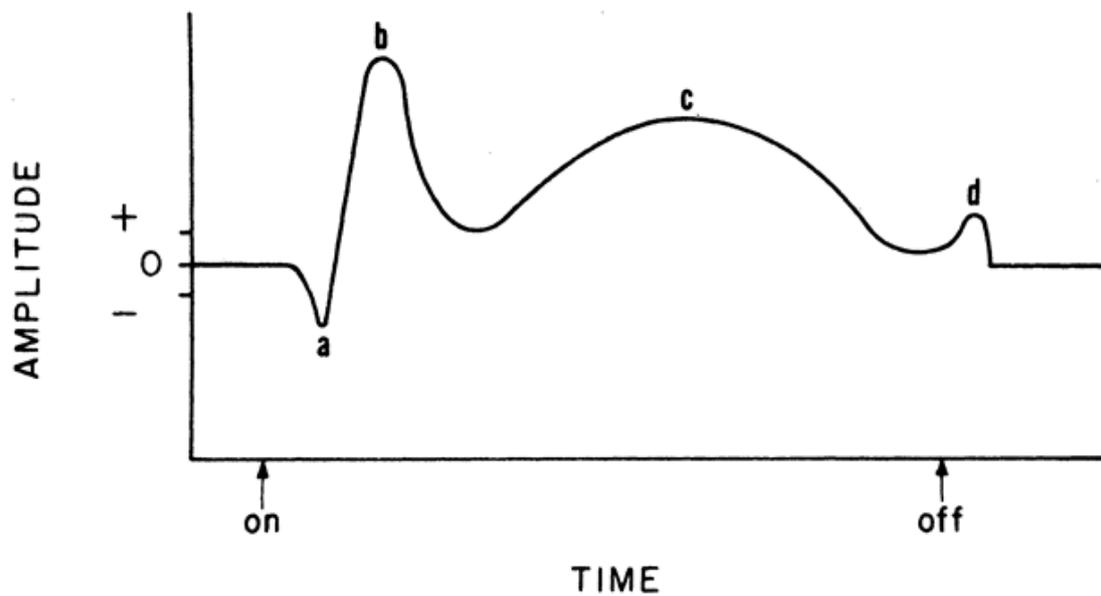


Figura 5. Componentes básicos da onda do ERG. Fonte: oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v3/ch005/003f.html acessado em: 11/01/2013.

A atividade e funcionalidade de cada tipo celular podem ser registradas pelo ERG. Pode-se observar a onda-a, produzida pela hiperpolarização dos fotorreceptores, a onda-b, originada pela despolarização das células de Muller e pela ativação das células bipolares do tipo ON; e os potenciais oscilatórios, produzido pelas células amácrinas (Figura 6) (WACHTMEISTER, 1998; ZHAO, 2013).

Os potenciais oscilatórios (OPs – *oscillatory potentials*), são caracterizados por apresentarem de quatro a seis ondas rítmicas que aparecem na inclinação ascendente e pico da onda-b (LAYTON, SAFA & OSBORNE, 2007) (Figura 4). A avaliação dos OPs desperta interesse devido seu padrão de resposta refletir a função de diferentes neurotransmissores subjacentes aos mecanismos de adaptação neuronal na retina interna (WACHTMEISTER, 1998).

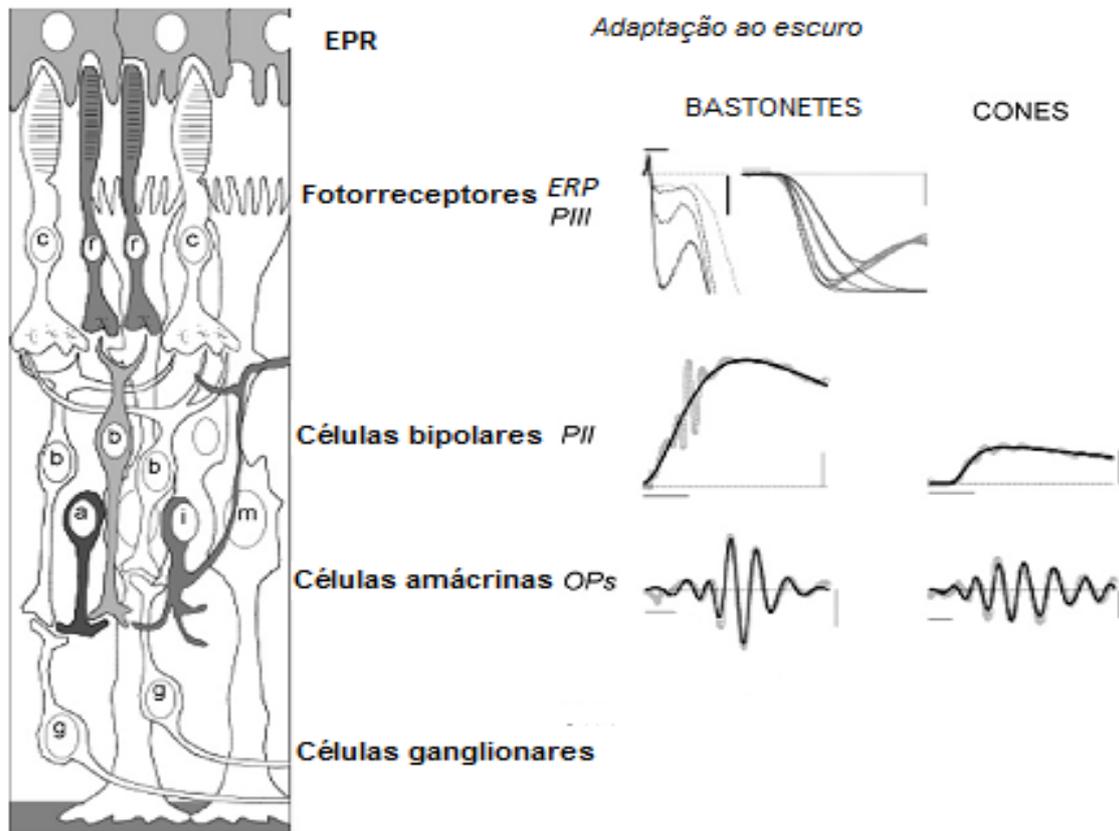


Figura 6. Esquema identificando os componentes que ERG que melhor avaliam as populações neuronais específicas dentro da retina dos roedores. Abreviações para células marcadas no esquema da retina (painel da esquerda): a: amácrina, b: bipolar, c: cone; g: ganglionar; i: interplexiforme; m: Muller, r: bastonete e EPR: epitélio pigmentar da retina. Fonte: Vingrys & Weymouth, 2007. Modificado.

3. JUSTIFICATIVA

A retina apresenta diversos neurotransmissores encontrados no SNC. O papel neuromodulador de algumas dessas moléculas está bem descrito na literatura atual, porém, ainda há muitas moléculas presentes na retina cujo papel na fisiológico ainda não foi totalmente esclarecido. A GSH parece interagir com as principais vias de transmissão neuroquímica neste tecido, contribuindo diretamente na modulação a informação visual. Diversos trabalhos vêm demonstrando que a GSH pode influenciar a liberação de importantes neurotransmissores como o GABA e o glutamato, que alteram diretamente a resposta fisiológica da retina. Por isso é tão importante investigarmos o papel desempenhado na associação do aumento da concentração dessa molécula na retina com as respostas obtidas no eletrorretinograma.

4. OBJETIVO

4.1 GERAL

Avaliar os registros eletrorretinográficos após a injeção intravítrea de glutathione (GSH) na retina de ratos Wistar jovens

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar possíveis alterações no tempo implícito e formato das ondas obtidas no domínio do tempo;
- Determinar, entre o sistema de cones e bastonetes, qual é mais alterado;
- Investigar as possíveis alterações funcionais em neurônios através da análise dos potenciais oscilatórios;
- Identificar dentre as concentrações testadas, em qual ocorrem mais alterações.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos, entre 2 a 6 meses de idade, mantidos em gaiolas adequadas, em sala climatizada e sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimento *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade federal do Pará (CEPAE-UFPA), parecer 174-13. Os animais foram divididos em 4 grupos:

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupo	Substância	Concentração	Volume
1	PBS*	-	2 μ L
2	GSH	1 mM	2 μ L
3	GSH	5 mM	2 μ L
4	GSH	10 mM	2 μ L

* PBS: Tampão fosfato salino, utilizado como solução controle.

5.2 INJEÇÃO INTRAVÍTREA

Na metodologia utilizada, procurou-se estabelecer padrões para minimizar danos desde a injeção. Segundo Chiu *et al*, 2007, para conduzir uma boa injeção intravítrea, existem três aspectos que devem ser observados: 1) o local de injeção não deve romper a estrutura da retina; 2) o sangramento deve ser evitado para reduzir o risco de infecção; 3) as lentes não devem ser tocadas para evitar catarata traumática.

Os animais foram adaptados ao escuro por 12 horas e então, sob uma luz vermelha de baixa intensidade, foi realizada anestesia. Foram realizadas injeções com o

auxílio de uma seringa Hamilton® de 26 gauge. O protocolo para a realização da injeção intravítrea consistiu dos seguintes passos:

1. O animal é anestesiado com uma injeção intraperitoneal de Ketamina 10% (hidroclorato de cetamina) na dose de 50mg/Kg e Xilazina 2% (hidroclorato de xilazina) na dose de 5mg/Kg (relação de volume em 2:1).
2. É preparada a injeção utilizando uma microseringa Hamilton.
3. O rato é posicionado e a região superior do olho é exposto, e suavemente mantido com o auxílio de uma pinça de ponta curva (figura 1).
4. A ponta da agulha da microseringa é posicionada em um ângulo de 45° e, então inserida, passando da esclerótica para dentro do corpo vítreo. 2 µL de solução de substância (Tabela 1) diluída em PBS é inserida.
5. Espera-se 1 minuto para remover a agulha, a fim de evitar vazamentos.

5.3 REGISTRO ELETORRETINOGRÁFICO

Após a injeção intravítrea, três eletrodos de contato (Figura 8) foram posicionados nos animais ainda sob efeito da anestesia:

- O eletrodo terra, em formato de disco foi conectado na orelha ipsilateral ao registro, utilizando um gel condutivo para melhor fixação.
- O eletrodo de referência, em formato de agulha, foi posicionado na região sub-palpebral, de forma que sua extremidade fique adjacente à córnea.
- O eletrodo de registro, também em formato de agulha, foi posicionado de forma a manter contato direto com a córnea, sendo mantido fixo com auxílio de um pequeno pedaço de massa de modelar.

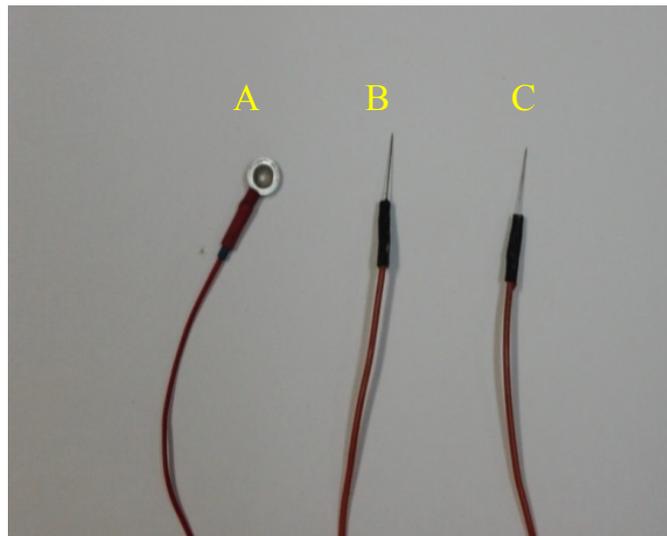


Figura 7. Eletrodos utilizados no registro eletrorretinográfico: (A) terra, (B) referência e (C) ativo.

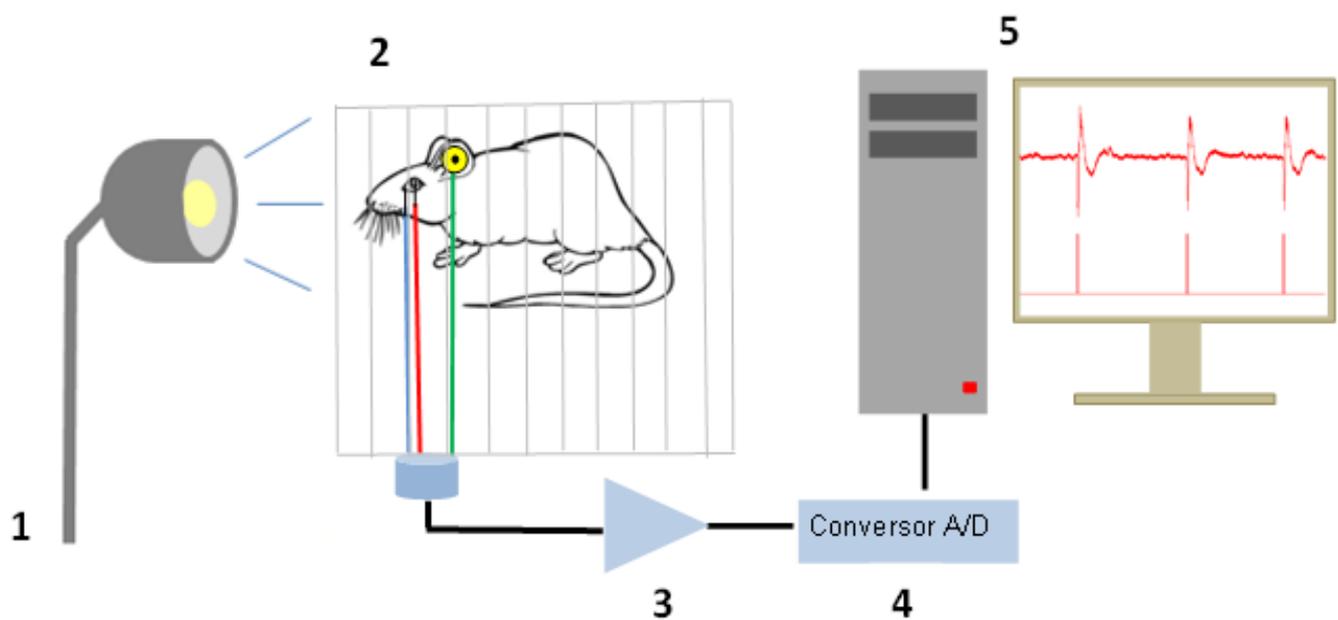


Figura 8. Desenho esquemático dos equipamentos utilizados nos registros eletrorretinográficos. 1. Fotoestimulador; 2. Gaiola de Faraday; 3. Amplificador; 4. Conversor análogo/digital; 5. Computador para armazenagem e processamento dos registros. Notar os três eletrodos posicionados no animal. Fonte: da autora.

Para evitar ressecamento na córnea, após o posicionamento adequado dos eletrodos, foi administrada uma gota de metilcelulose 2%. Após as 12 horas de adaptação ao escuro e a realização da injeção intravítrea, as medições foram realizadas através de estímulos luminosos (*flashes*) na intensidade de 10,215 cd.s/m² para se obter a resposta escotópica máxima. Para o registro das respostas fotópicas, o animal foi adaptado ao claro por um período de 10 minutos, e após isso, foram aplicados estímulos luminosos (*flashes*) na intensidade de 10,215 cd.s/m² (Figura 9).

Foi utilizado um fotoestimulador com tubo de xenônio (PS33-PLUS, Grass Technologies) para gerar os pulsos de luz. Foram utilizados filtros de densidade neutra, que reduziram a intensidade luminosa, e filtros de cores verde e azul para avaliar a resposta de subpopulações de cones UV e M, respectivamente. As respostas foram amplificadas 50.000 vezes, com filtragem passa-alta de 0,3 Hz e passa-baixa de 300 Hz, através do amplificador diferencial AC com alta impedância de entrada (P511, Grass Technologies). O programa LabView 3.0 (National Instruments) foi utilizado para aquisição dos dados.

O padrão dos estímulos foi estabelecido a partir de adaptações na recomendação da Sociedade Internacional para Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV – *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) (2008). Foram observados 4 padrões de respostas (Tabela 2).

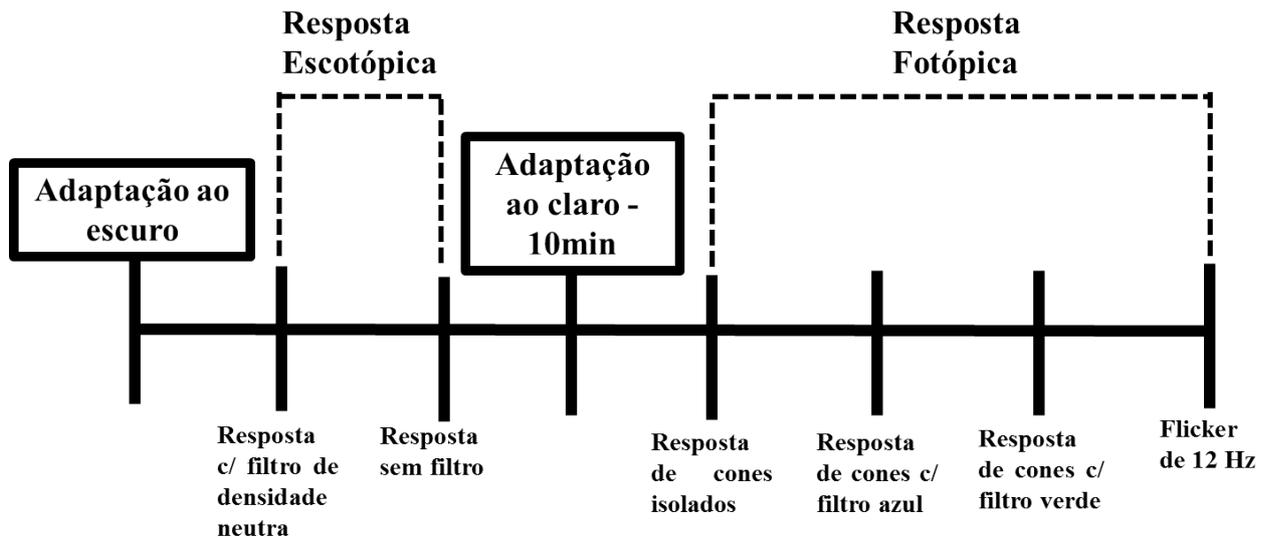


Figura 9. Ordem cronológica dos estímulos.

Tabela 2. Padrões de respostas obtidos no ERG.

Tipo de resposta	Escotópica de bastonetes	Escotópica máxima	Fotópica de cones (UV e M)	Fotópica de Flicker (12 Hz)
Adaptação	Escotópica (≥ 12 h)	Escotópica (≥ 12 h)	Fotópica (10 m)	Fotópica (10 m)
Intensidade do estímulo	<0,09 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²
Duração do estímulo	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms
Intervalo entre estímulos	10 s	10 s	10 s	0,2 s
Resposta	Bastonetes	Cones + Bastonetes	Cones	Cones

Para cada tipo de resposta serão emitidos de 6 a 8 pulsos com intervalo de 10 segundos entre cada pulso. A realização do protocolo, a partir do início dos registros, deverá ter duração média de 30 minutos. As respostas obtidas serão promediadas no programa SignalExpress 3.0 (National Instruments) e os principais parâmetros mensurados serão a amplitude e tempo implícito das ondas *a* e *b*. A amplitude da onda *a* é a medida entre a linha de base e o pico máximo (negativo) da onda *a*. A amplitude da onda *b* é a medida entre o pico máximo da onda *a* e o pico máximo da onda *b* (positivo). O tempo implícito de cada onda será medido a partir do início do estímulo até o pico máximo de cada onda (Figura 10). Os parâmetros temporais do estímulo do flicker de cone do ERG foram medidos calculando-se a amplitude pico-a-pico da onda-b de três respostas consecutivas, posteriormente, obtendo-se a média das três respostas para cada animal, na frequência de 12 Hz (Figura 11). A análise dos potenciais oscilatórios foi realizada medindo-se a amplitude do terceiro pico: OP3 (Figura 12). Para melhor avaliação, as respostas foram submetidas a um filtro passa-baixa de 100 Hz (figura 13); exceto para análise dos potenciais oscilatórios, cuja filtragem foi realizada com filtro passa-banda na faixa de 80 a 300 Hz.

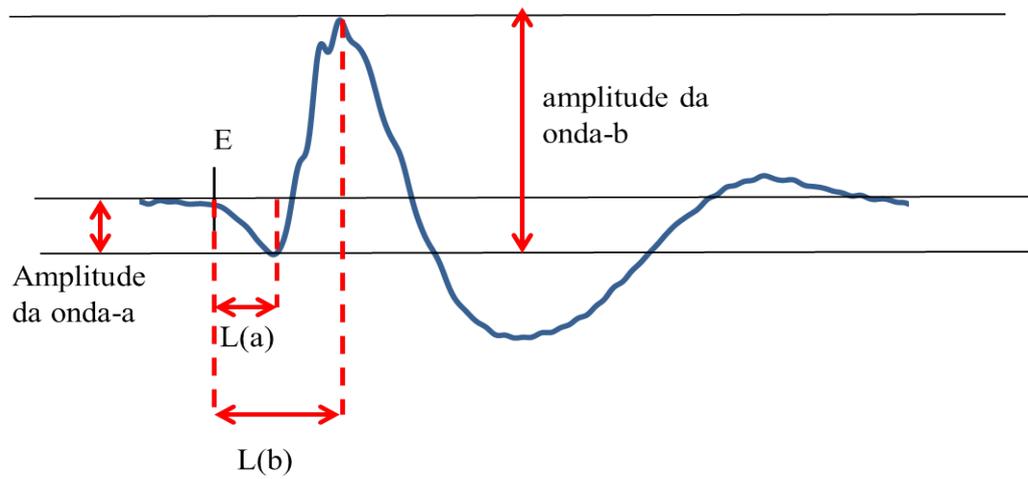


Figura 10. Padrão de resposta obtido no ERG as com linhas para medições dos principais parâmetros do registro: amplitude e tempo implícito da onda-a e onda-b. E: início do estímulo, L: Latência.

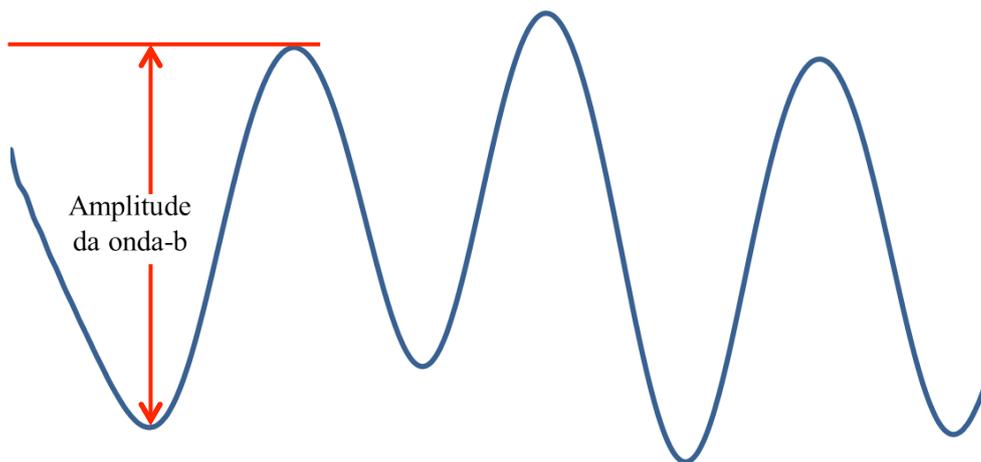


Figura 11. Modelo de análise do Flicker de 12 Hz.

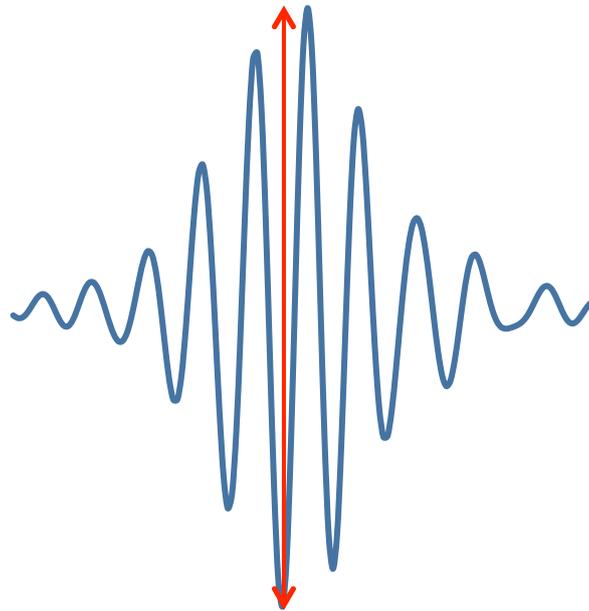


Figura 12. Modelo de análise dos potenciais oscilatórios. A seta vermelha indica a amplitude de PO3: potencial oscilatório 3.

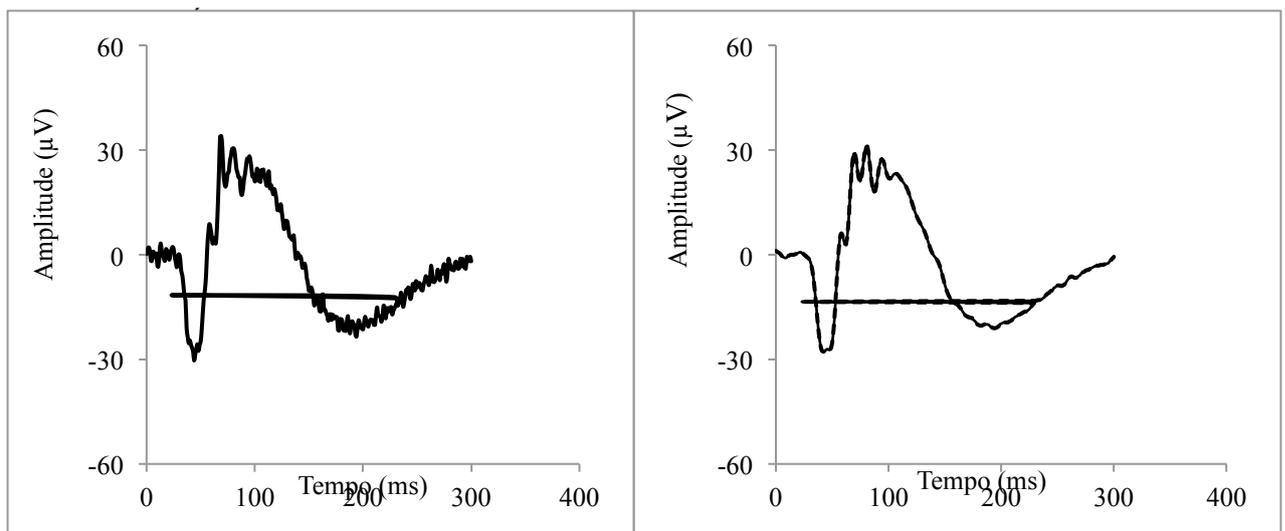


Figura 13. À esquerda, resposta escotópica máxima de um rato *Wistar*, à direita a mesma resposta filtrada com filtro passa-baixa de 100 Hz.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos serão submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5, onde serão determinados a média e o desvio-padrão dos grupos experimentais. Os dados serão, então, comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) um critério, seguido pelo pós-testes Bonferroni e Dunnet. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram mostrados com as alterações encontradas no teste de Dunnet, que compara cada grupo com o controle.

6. RESULTADOS

Foram realizados registros eletrorrétinográficos de cada grupo com o intuito de verificar se a resposta era compatível com o estímulo aplicado e se após a injeção intravítrea as características principais a serem observadas, como a amplitude e tempo implícito das ondas não seriam prejudicados. O modelo das respostas obtidas é demonstrado na Figura 10. Para cada tipo de resposta foram medidos a amplitude e o tempo implícito das ondas, além dos potenciais oscilatórios na resposta escotópica máxima, a análise de flicker em 12 Hertz, e posteriormente realizada a análise estatística. As respostas foram avaliadas de acordo com o padrão da ISCEV 2008 (Marmor *et al*, 2009). Os resultados de amplitude foram medidos em microvolts.

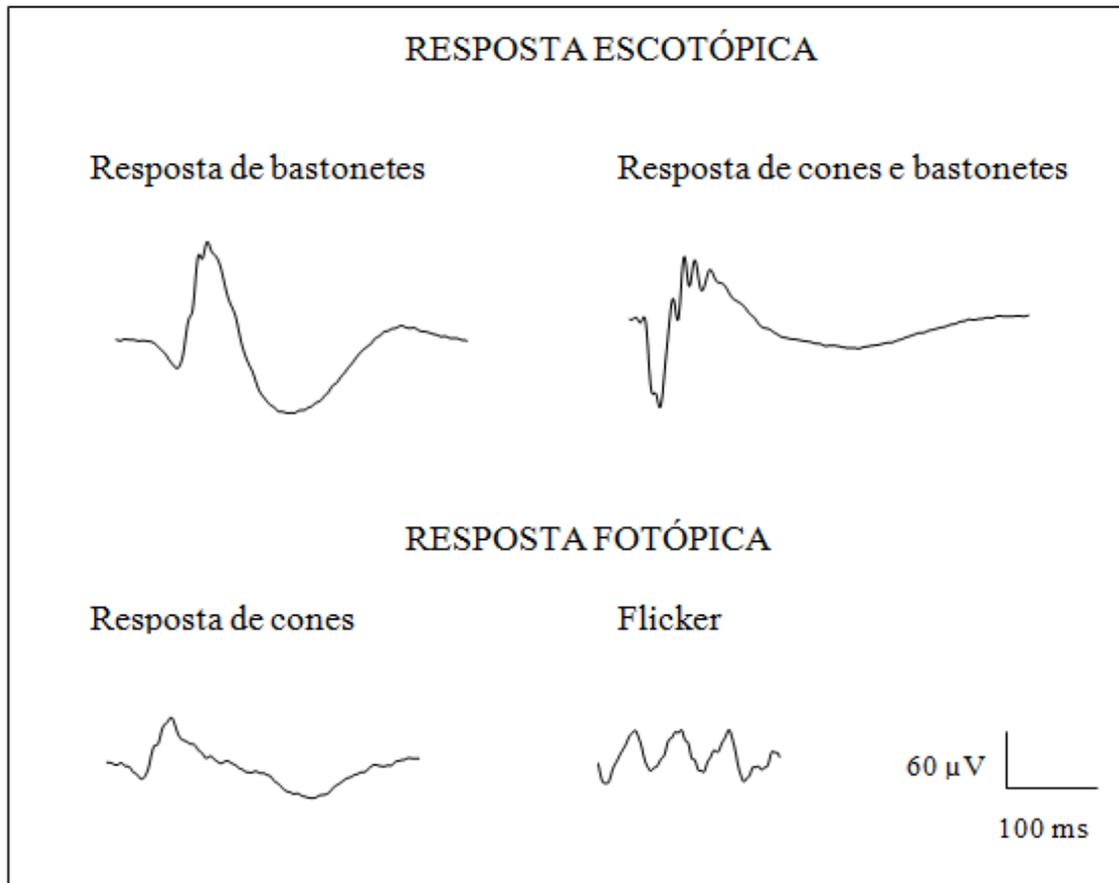


Figura 14. Respostas obtidas no ERG de ratos *Wistar* usados como controle. Fonte: da autora

As respostas foram filtradas no filtro passa-baixa de 100 Hz, exceto a resposta escotópica máxima, que primeiramente foi filtrada em passa-banda de 80-300 para avaliação do potencial oscilatório. As alterações em cada tipo de resposta foram avaliadas e comparadas entre os grupos controle, GSH1, GSH5 e GSH 10 mM. :

Alterações na resposta Escotópica: o teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet mostraram alterações significativas na amplitude da onda-b, entre o grupo controle (PBS) e os grupos GSH 5mM e GSH 10mM, sendo o valor de $P=0.0359$. A comparação do grupo controle com GSH 1mM não apresentou diferença significativa (Figuras 15 e 16).

Alterações na resposta Escotópica máxima: o teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet mostrou alterações significativas na amplitude da onda-a, entre o grupo controle (PBS) e os grupos GSH 5mM e GSH 10mM, sendo o valor de $P= 0.0464$. Foram observadas também alterações na amplitude da onda-b ($P= 0.0020$), com diferenças significativas entre os grupos controle e GSH 5mM e GSH 10mM. Em relação ao grupo GSH 1mM não houve diferenças significativas (Figuras 17 e 18).

Alterações nas respostas Fotópicas de cones: o teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet não mostrou alterações significativas na amplitude da onda-a, entre os 4 grupos comparados. Em relação a amplitude da onda-b, foi observada grande diferença com valor de $P<0,0001$. Houve diferença quando comparado o grupo controle com todos os grupos GSH (Figuras 19 e 20).

Alterações nas respostas Fotópicas de cones UV: o teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet não mostrou alterações significativas na amplitude da onda-a, entre os 4 grupos comparados. Em relação a amplitude da onda-b, foi observada grande diferença com valor de $P<0,0001$. Houve diferença quando comparado o grupo controle com todos os grupos GSH (Figuras 21 e 22).

Alterações nas respostas Fotópicas de cones S: o teste de ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Dunnet não mostrou alterações significativas na amplitude da onda-a, entre os 4 grupos comparados. Em relação a amplitude da onda-b, foi observada grande diferença com valor de $P<0,0001$. Houve diferença quando comparado o grupo controle com todos os grupos GSH (Figuras 23 e 24).

Os resultados mostraram que não houve alterações significativas nos tempos implícitos de nenhuma resposta, tanto nas respostas escotópicas, quanto nas fotópicas.

Alterações na resposta de Flicker de 12 Hz: O teste ANOVA mostrou diferença significativa, com $P<0,0005$ e utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni, houve diferença significativa entre os grupos GSH 1mm e GSH 5mM

quando comparados com o controle e entre os grupo GSH 1mM e GSH 10mM (Figura 25).

Alterações dos potenciais oscilatórios: a redução de amplitude de PO3 foram significativas, com grande diminuição nos grupos GSH 5 e GSH 10 mM. Em muitos indivíduos do grupo GSH 10 mM, tiveram o potencial oscilatório com amplitude tão baixa que não foi possível realizar a mensuração (Figura 26).

Para avaliar se havia diferença entre as subpopulações de cones (UV e S), as amplitudes de $-a$ e $-b$ foram comparadas. Não houve diferença significativa entre as subpopulações.

RESPOSTA ESCOTÓPICA DE BASTONETES

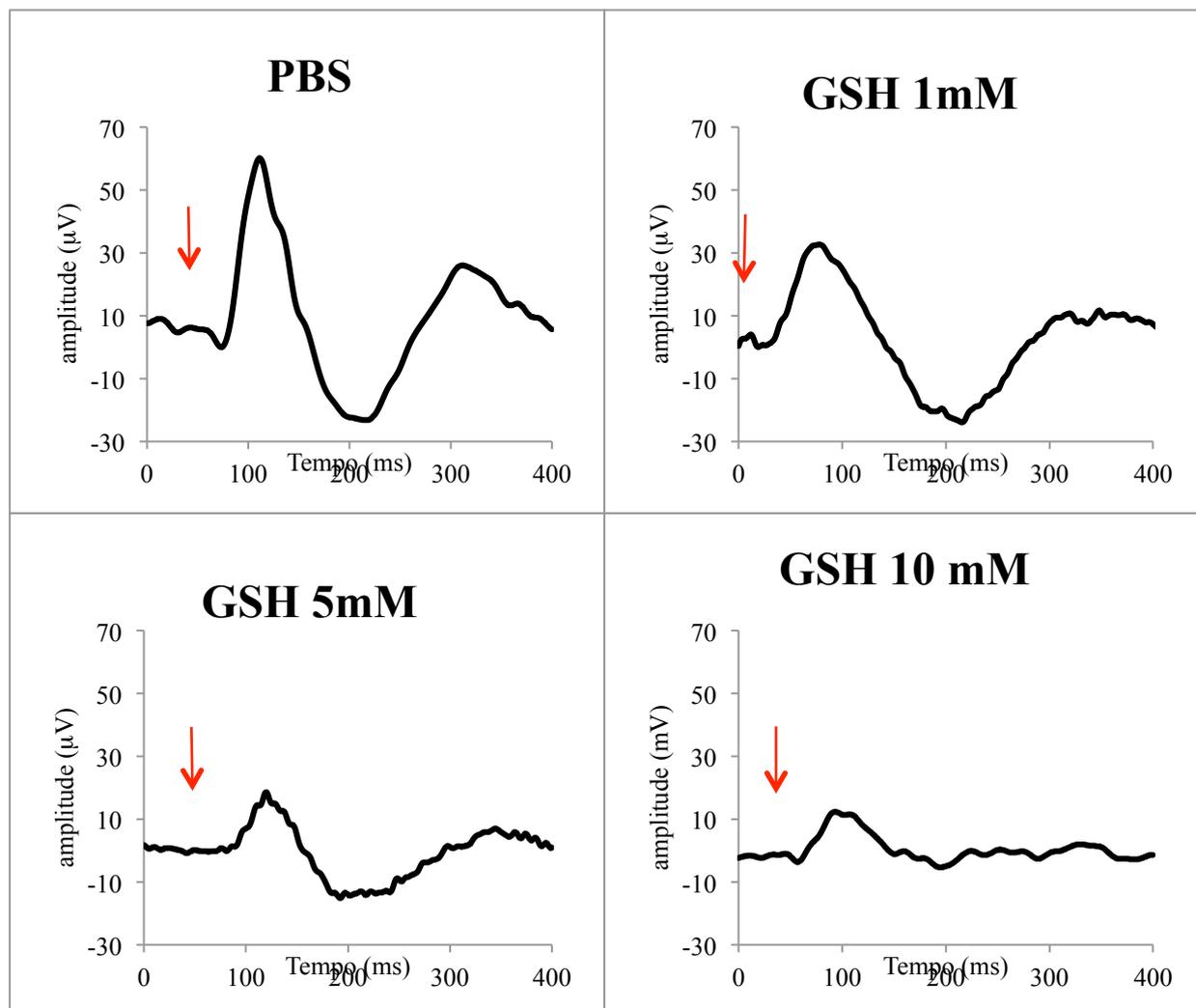


Figura 15. Resposta escotópica de bastonetes. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.

RESPOSTA ESCOTÓPICA DE BASTONETES

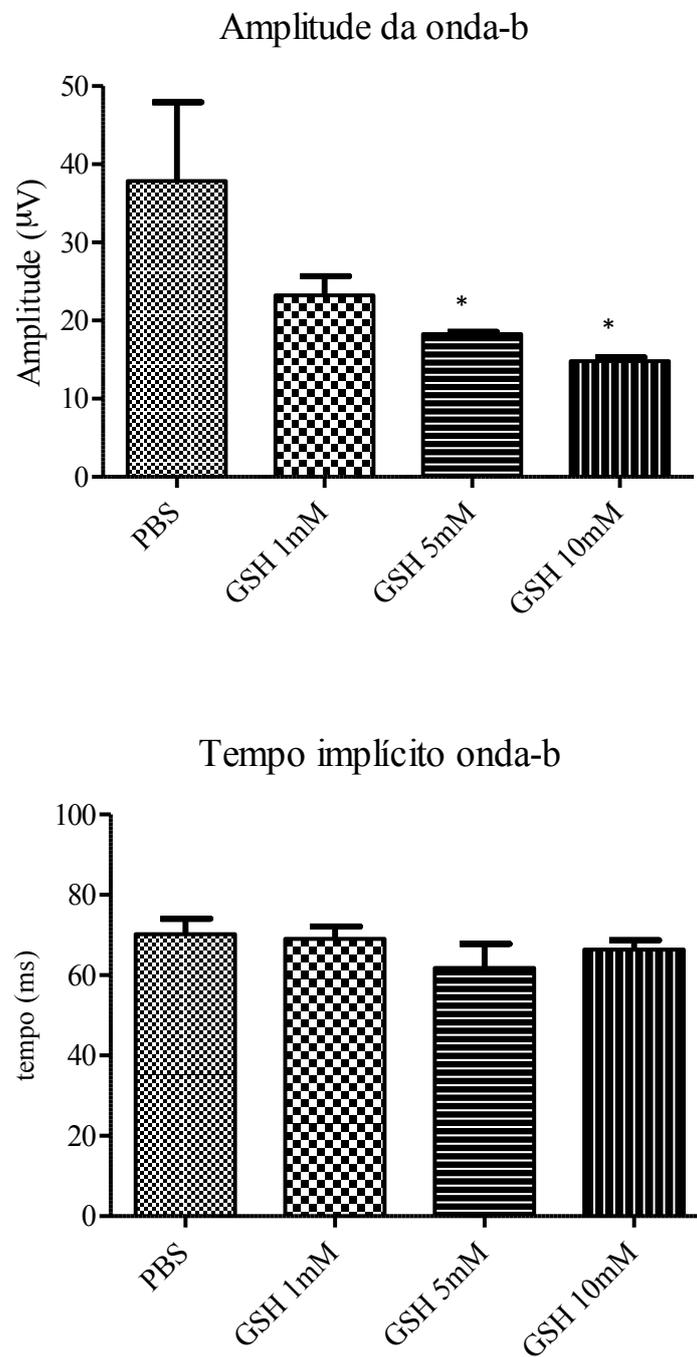


Figura 16. . Resposta escotópica de bastonetes. Acima a amplitude da onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle,

RESPOSTA ESCOTÓPICA MÁXIMA

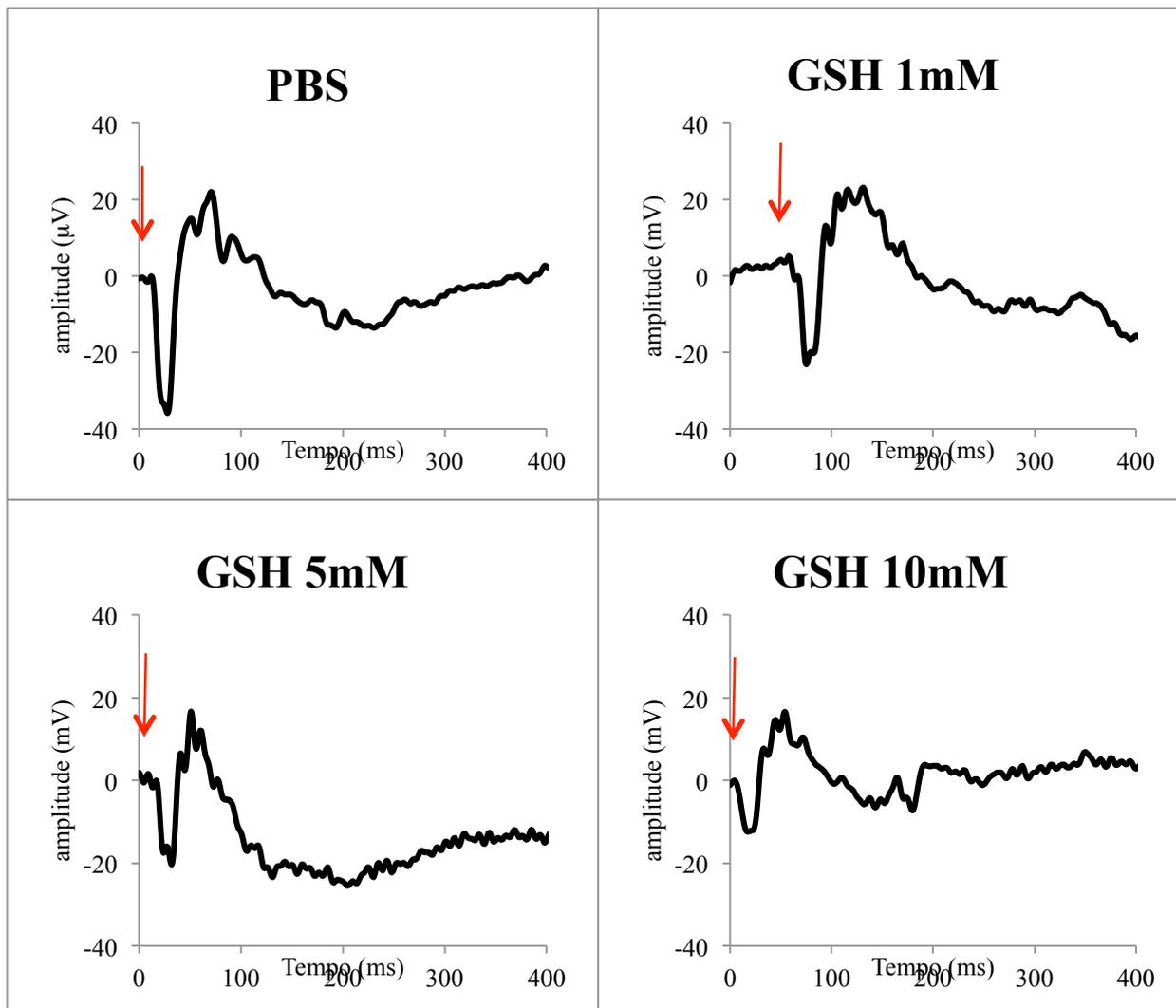


Figura 17. Resposta escotópica máxima. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.

RESPOSTA ESCOTÓPICA MÁXIMA

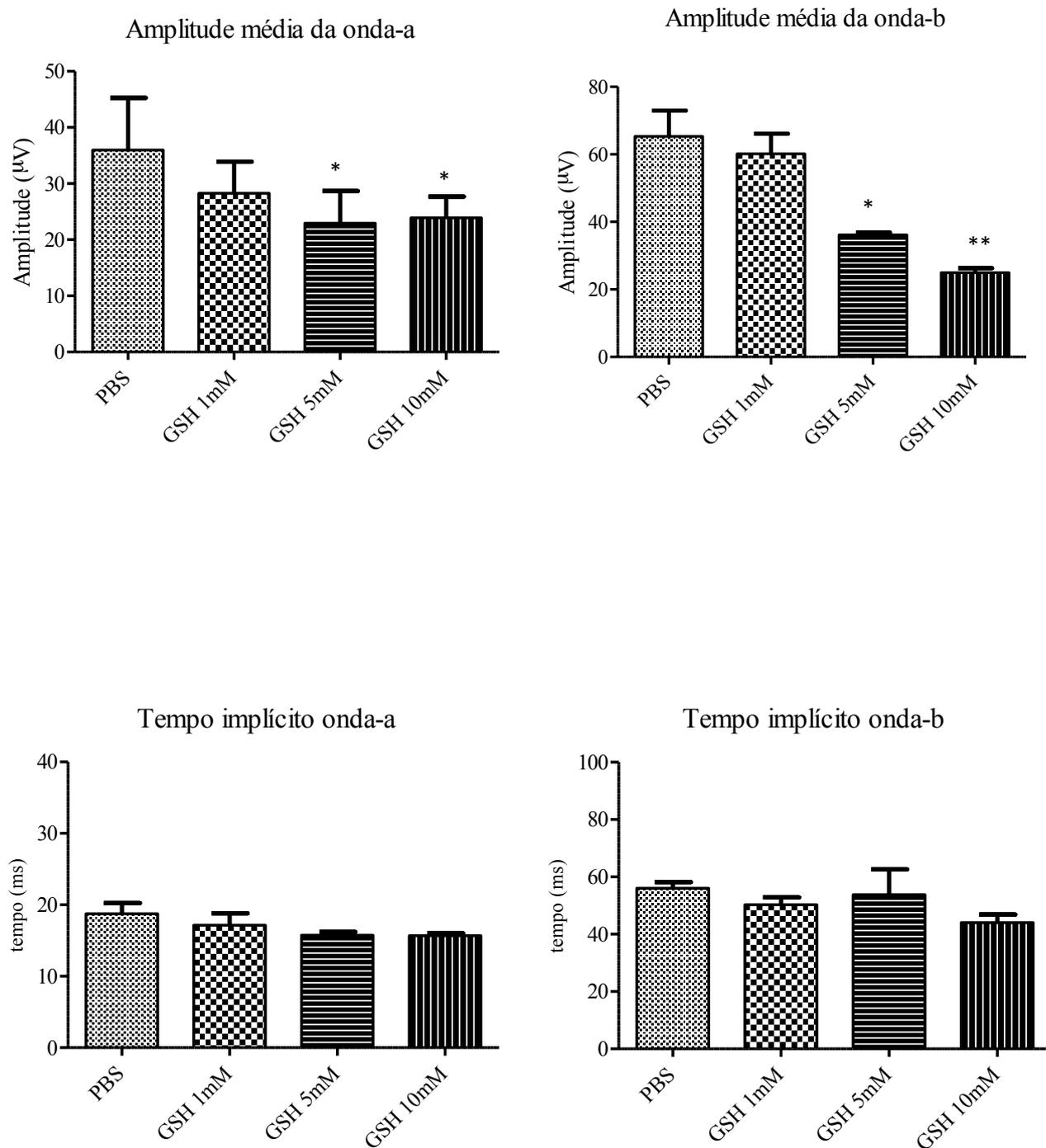


Figura 19.. Resposta escotópica máxima. Acima a amplitude da onda-a e onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-a e onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle,

RESPOSTA DE CONES

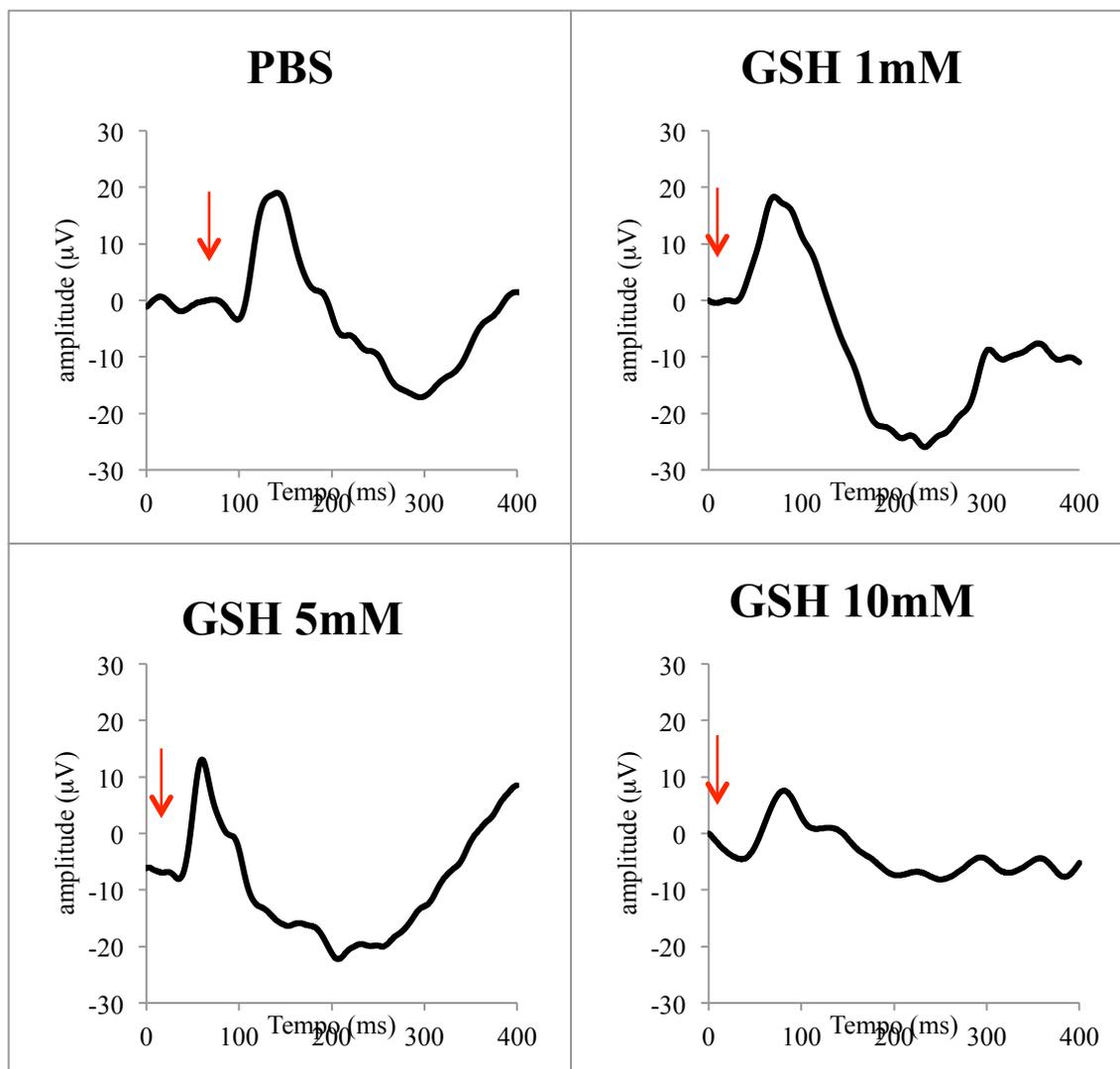


Figura 20. Resposta fotópica de cones sem a utilização de filtros. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.

RESPOSTA DE CONES

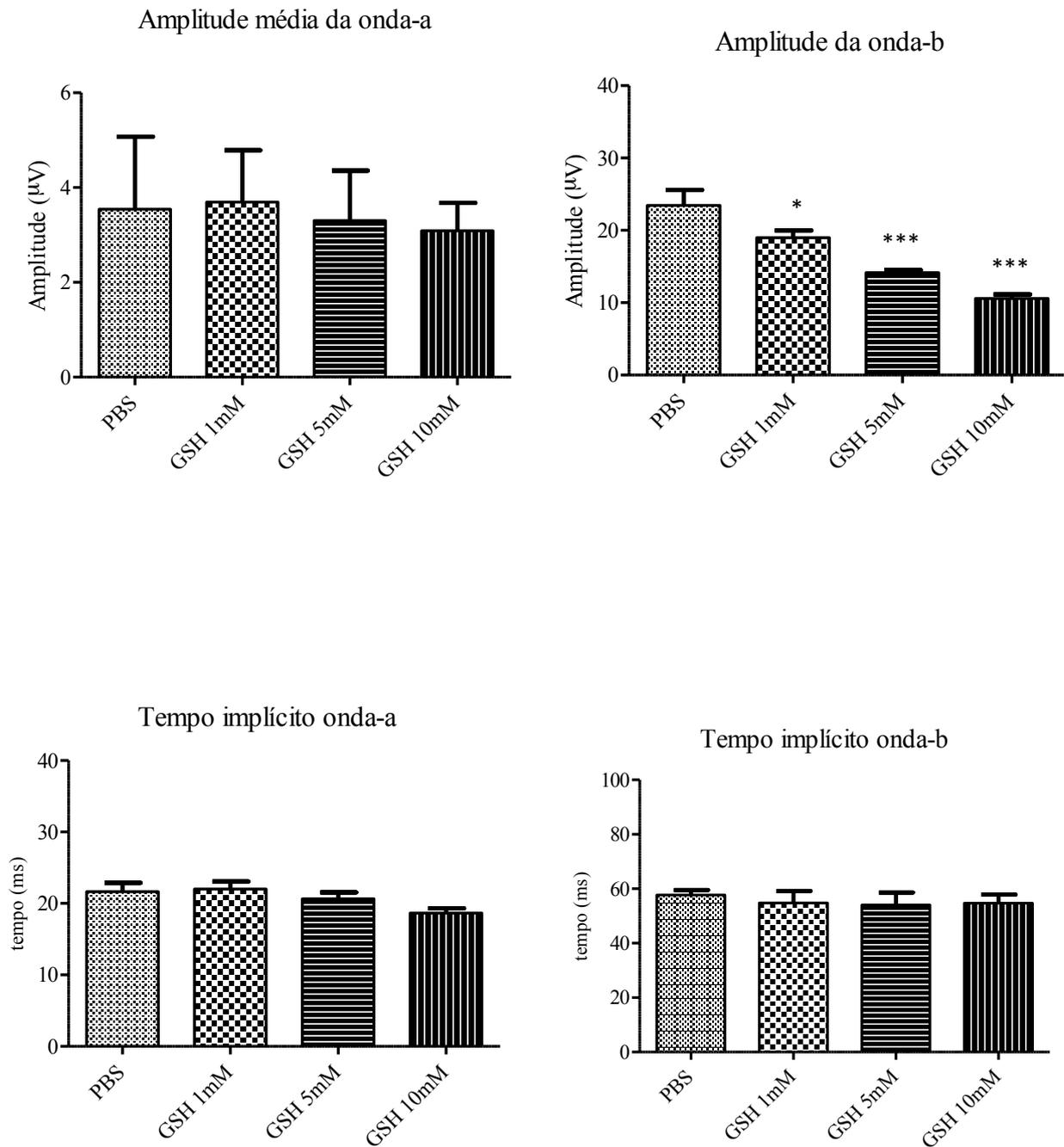


Figura 21. Resposta fotópica de cones. Acima a amplitude da onda-a e onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-a e onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle,

RESPOSTA DE CONES UV

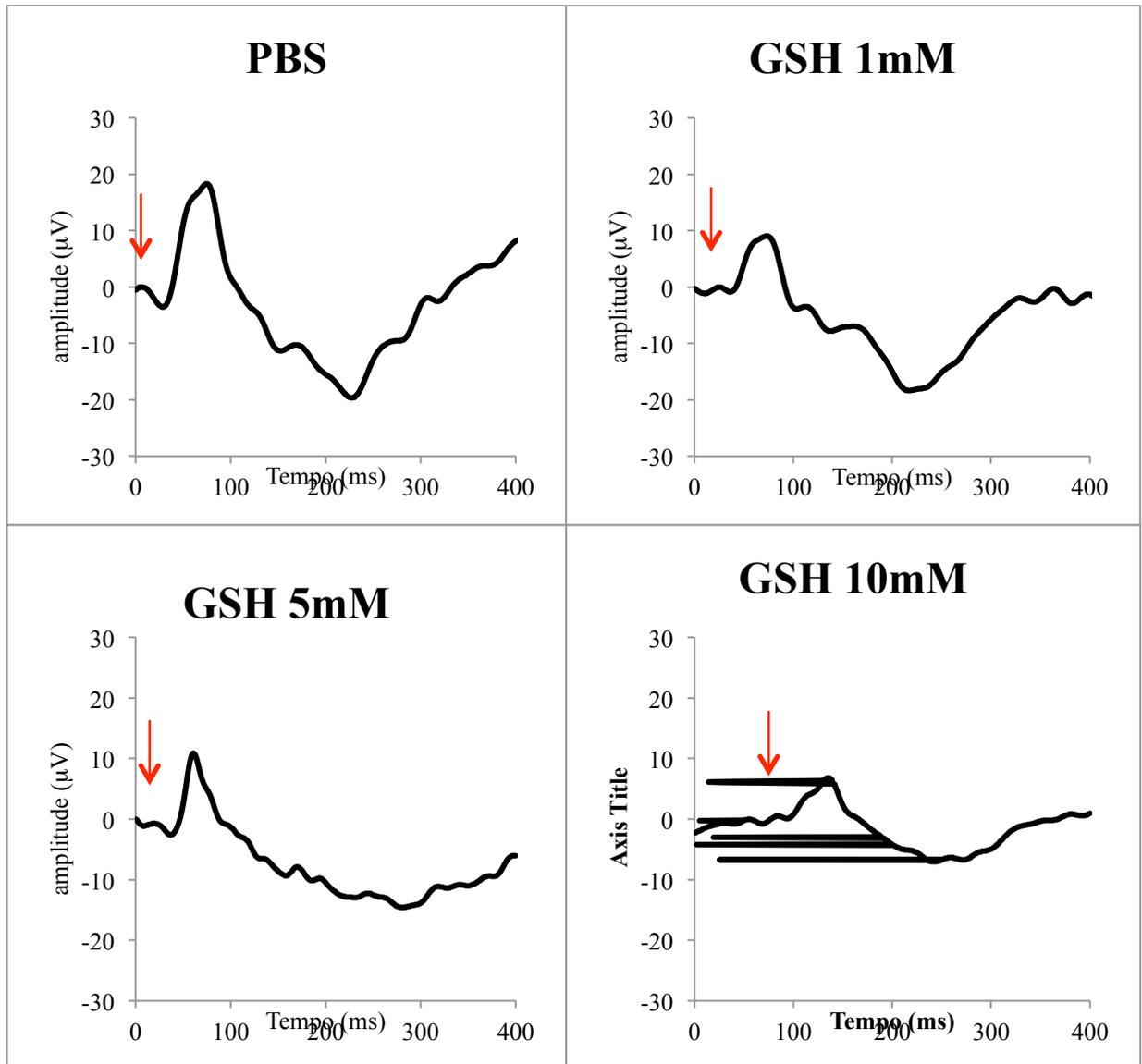


Figura 22. Resposta fotópica de cones UV com a utilização do filtro azul. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.

RESPOSTA DE CONES UV

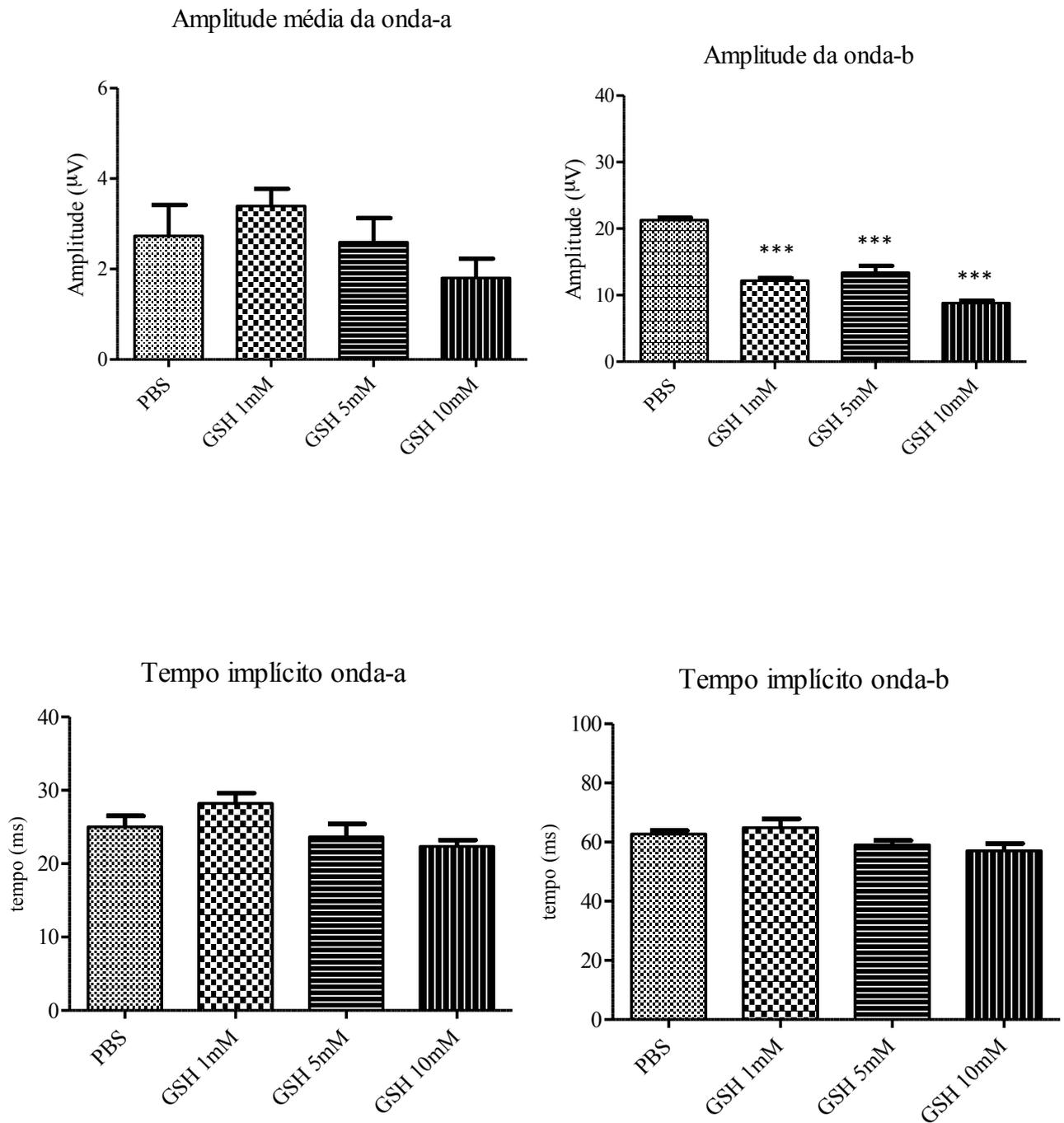


Figura 23. . Resposta fotópica de cones. UV Acima a amplitude da onda-a e onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-a e onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle,

RESPOSTA DE CONES S

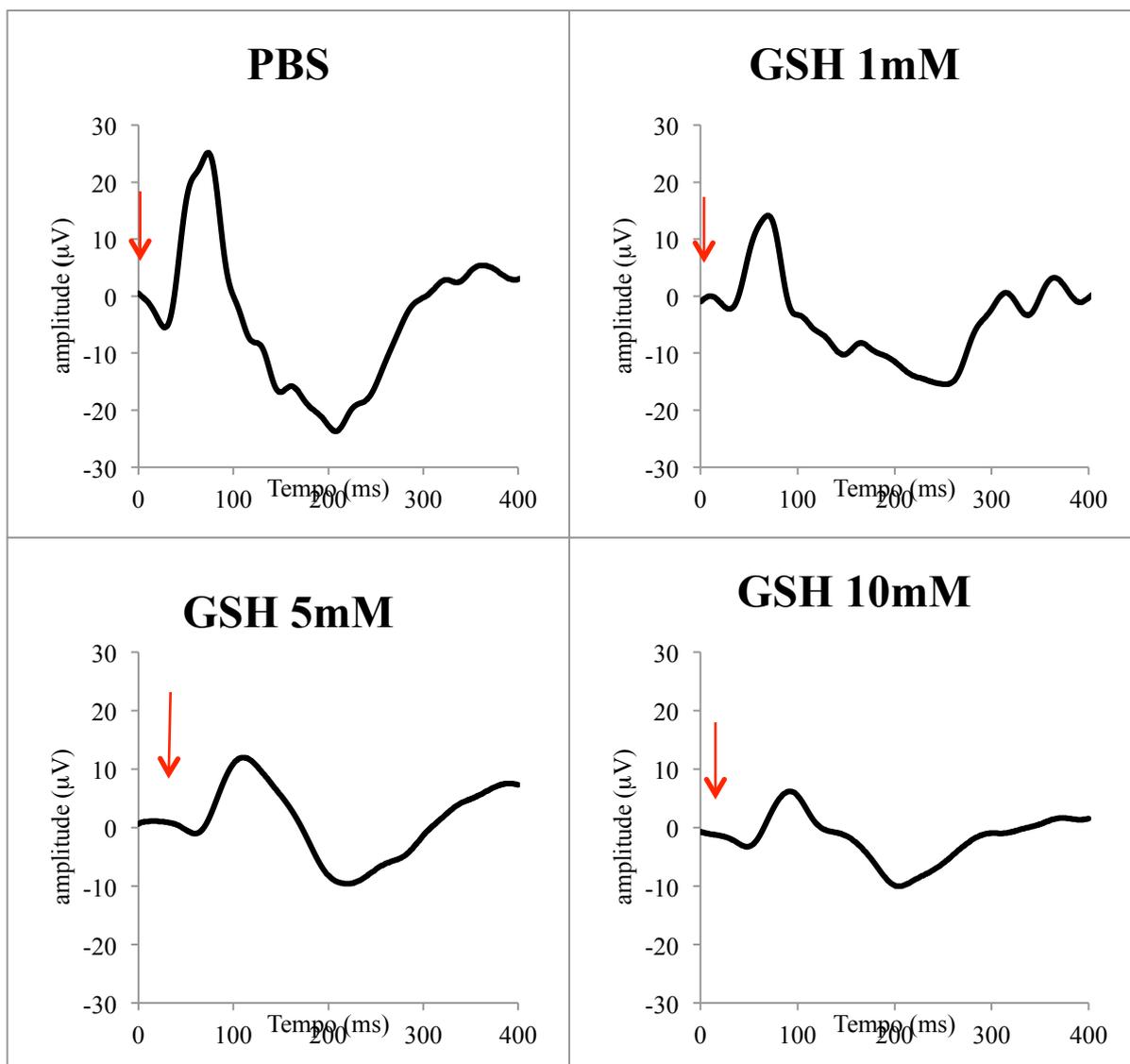


Figura 24. Resposta fótópica de cones S com a utilização do filtro verde. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início do estímulo.

RESPOSTA DE CONES S

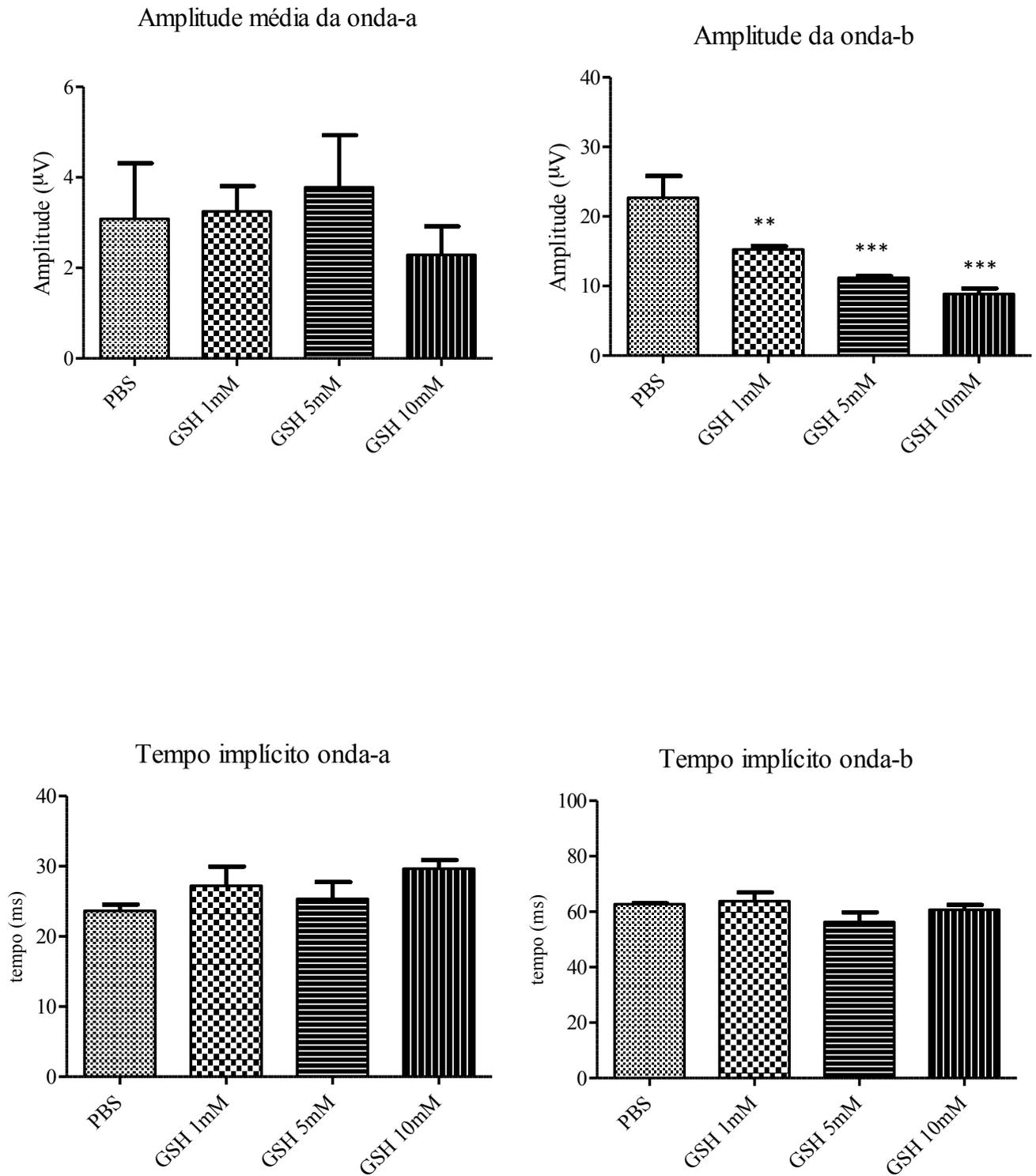


Figura 25. Resposta fotópica de cones S. Acima a amplitude da onda-a e onda-b; abaixo tempo implícito médio da onda-a e onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle,

6.1 ONDA-A

Observando-se a amplitude da onda-a nos diferentes grupos, notamos que as médias não diferem, exceto na resposta escotópica máxima, onde os grupos GSH 5 e GSH 10 mM mostraram diferença em relação ao controle (Figura 18). A média dos grupos e seus respectivos desvios estão apresentados na Tabela 3.

Com relação à latência, os quatro grupos tiveram média semelhante, sem diferença entre nenhum dos grupos observados (Figura 18). As médias com os respectivos desvios estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão da amplitude da onda-a dos grupos experimentais.

	PBS	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Escotópica máxima	35,98±9,3	28,27±5,63	22,93±5,74	23,89±3,81
Cones	3,54 ±3,06	3,70±2,18	3,30±2,36	3,09±1,01
Cones UV	2,73±1,38	3,39±0,66	2,59±1,19	1,08±0,73
Cones S	3,08±2,13	3,25±1,253	3,78±2,29	2,29±1,09

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos tempos de latência da onda-a dos grupos experimentais.

	PBS	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Escotópica máxima	18,75±2,99	19,60±1,82	15,75±0,95	15,67±0,58
Cones	21,67±2,08	22±2,16	20,67±1,52	18,67±1,15
Cones UV	25±2,65	28,20±3,19	23,67±3,05	22,33±1,52
Cones S	23,67±1,52	29,75±2,63	25,33±4,163	29,67±2,08

6.2 ONDA-B

Observando-se a amplitude da onda-b individualmente, em todas as respostas houve uma grande variação, com expressiva diminuição da amplitude nos grupos GSH 5 e GSH 10 mM quando comparados com o controle.

A latência da onda-b não se alterou em nenhuma das respostas observadas.

Tabela 5. Média e desvio-padrão da amplitude da onda-b dos grupos experimentais.

	PBS	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Escotópica de bastonetes	37,87 ± 17,45	23,23 ± 5,48	18,29 ± 0,48	14,83 ± 0,83
Escotópica máxima	65,29 ± 13,33	60,16 ± 14,51	36,18 ± 1,15	25 ± 2,28
Cones	23,44 ± 3,74	18,97 ± 2,29	14,13 ± 0,78	10,59 ± 0,99
Cones UV	21,28 ± 0,62	12,18 ± 0,97	13,38 ± 2,04	8,82 ± 0,74
Cones S	22,70 ± 5,421	15,24 ± 1,059	11,18 ± 0,48	8,84 ± 1,38

Tabela 6. Média e desvio-padrão dos tempos de latência da onda-b dos grupos experimentais.

	PBS	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Escotópica de bastonetes	70,20 ± 8,85	69 ± 8,33	61,75 ± 12,04	66,33 ± 4,04
Escotópica máxima	56 ± 4,4	50,33 ± 7,63	53,75 ± 17,69	44 ± 5
Cones	57,67 ± 3,21	54,83 ± 10,70	54 ± 8	54,67 ± 5,5
Cones UV	62,67 ± 2,08	64,86 ± 8,07	59 ± 2,65	57 ± 4,36
Cones S	62,67 ± 0,58	63,83 ± 7,7	56,33 ± 6,03	60,67 ± 3,05

COMPARAÇÃO DE CONES UV E S

Para avaliar se havia diferença entre as subpopulações de cones, foram comparadas as respostas dos cones UV e S. Não houve diferença significativa entre as subpopulações.

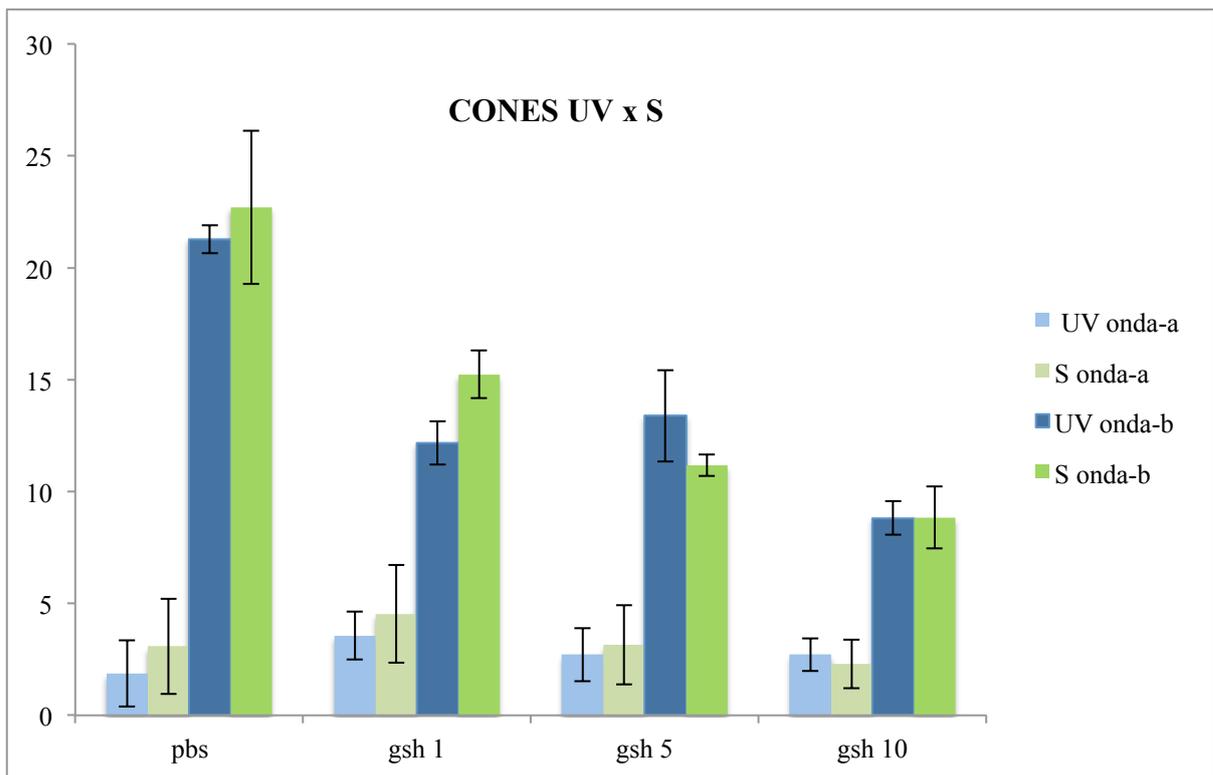


Figura 26. Comparação das subpopulações de cones UV e S com a utilização de filtros azul e verde, respectivamente. Valores expressos em média \pm desvio-padrão. A diferença na intensidade das cores é apenas ilustrativa.

RESPOSTA DO FLICKER DE 12 HERTZ

Em relação à resposta intermitente do flicker, foi observada grande diminuição de amplitude em 12 Hz. Foram medidos 3 ondas consecutivas, de onde foi obtida a média de amplitude da onda-b. Como o flicker não é uma medida de alta resolução temporal, não foi medido o tempo de latência. Para uma melhor avaliação foi aplicada a FFT de onde se obteve a medida de energia na frequência avaliada (12 Hz). Os grupos controle e GSH 1 mM não diferiram. O pós teste de comparação de Bonferroni mostrou que há diferença entre o grupo controle e os grupos GSH 5 mM e GSH 10 mM, e diferença entre os grupo GSH 1 mM quando novamente comparado aos dois últimos.

Tabela 7. Média e desvio-padrão dos grupos experimentais após estímulo de flicker em 12 Hz.

	PBS	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Média	22,77	19,95	12,56	7,81
Desvio-padrão	± 2,91	± 4,03	± 3,48	± 0,43

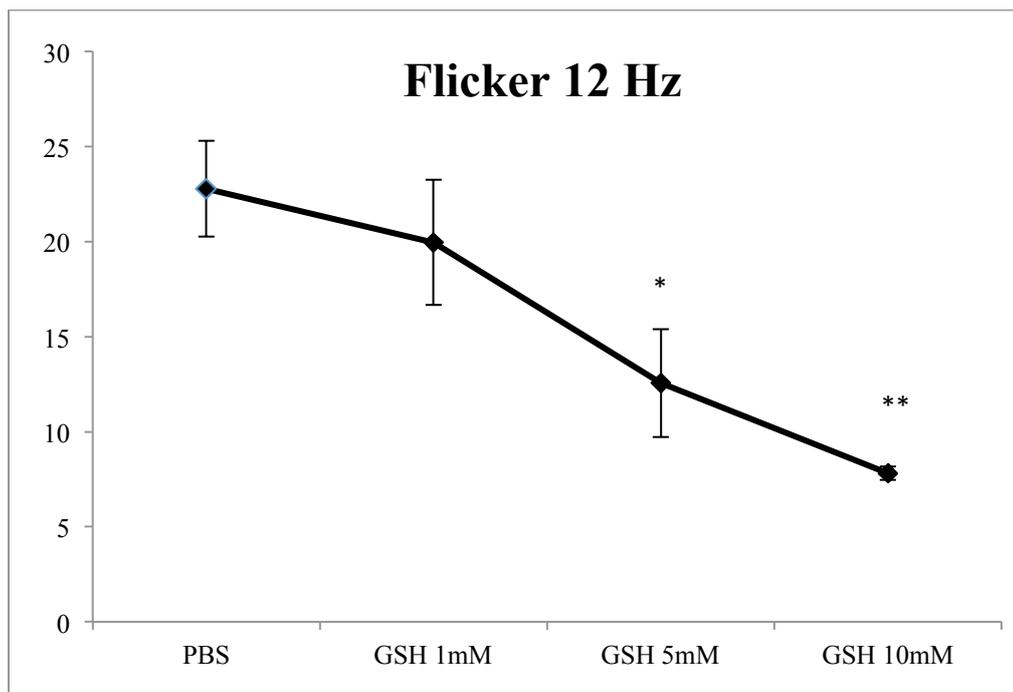


Figura 187. Comparação do estímulo de flicker em 12 Hz. Amplitude em microvolts.

POTENCIAIS OSCILATÓRIOS

Os potenciais oscilatórios foram filtrados a partir da resposta escotópica máxima e filtrado em passa-banda de 80-300 Hz. Para análise foi medida a amplitude do potencial oscilatórios 3, ou seja, o maior pico. Comparando-se os grupos observou-se significativa diferença do grupo controle em relação aos grupos GSH 5 e GSH 10 mM. No grupo GSH 10 mM a resposta diferiu bastante, com amplitude tão baixa que em muitos indivíduos não foi possível realizar as medidas. As médias dos grupos estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 8. Média e desvio-padrão dos grupos após a medida dos potenciais oscilatórios.

	PBS	GSH 1mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
Média	19.10	14.77	8.595	4.261
Desvio-padrão	± 1.203	± 4.386	± 1.782	± 0.7435

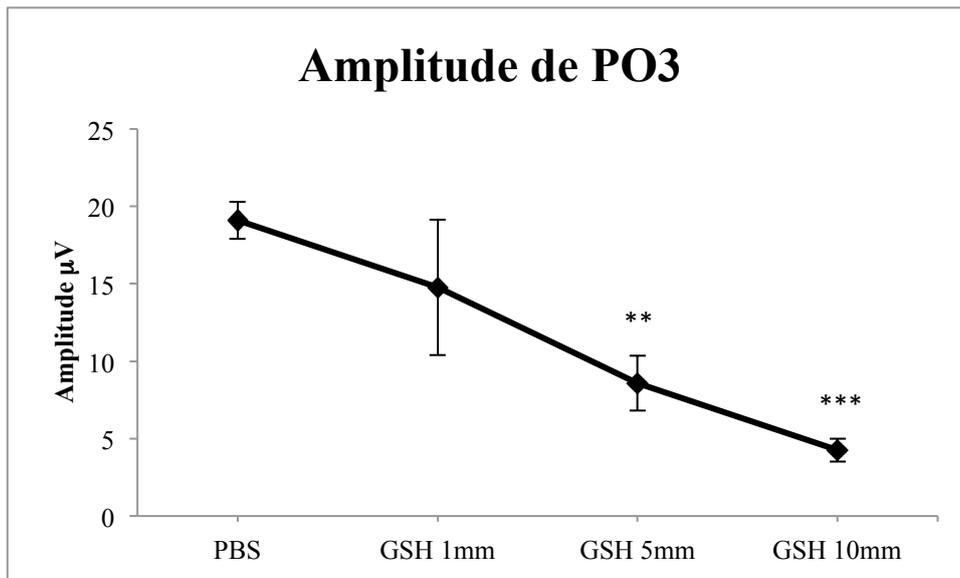


Figura 198 Comparação da amplitude de PO3.

7. DISCUSSÃO

O ERG é uma importante ferramenta clínica que provê uma medida quantitativa objetiva da função retiniana. A diminuição de amplitude das ondas-a e -b e latência prolongada estão relacionadas com a redução da função retiniana que podem ser resultado de toxicidade, dano isquêmico, ou distrofia retiniana (ALEXANDER *et al*, 2001).

Para avaliar as respostas do ERG, o protocolo foi adaptado das recomendações da ISCEV 2008 (MARMOR *et al*, 2009). Foi utilizado um filtro de densidade neutra para obter a resposta escotópica de bastonetes e dois filtros para avaliar as subpopulações de cones UV e M: um azul e um verde, respectivamente.

Os eletrorretinograma obtidos no presente trabalho mostraram respostas em condições escotópicas e fotópicas semelhantes as encontradas na literatura (WEIDNER, 1976; ZANG *et al* 2007). As alterações encontradas foram relacionadas à diminuição da amplitude da onda-b em ambas as condições de adaptação. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo o primeiro utilizado como controle.

Com relação à amplitude da onda-a, os animais não apresentaram muitas variações entre os grupos, nem quando comparados ao controle, nem quando comparados entre si. A exceção foi na resposta escotópica máxima, onde observou-se diferença entre o grupo controle e os grupos GSH 5 e GSH 10 mM. Não houve diferença entre os grupos.

A latência da onda-a não apresentou alterações quando comparados ao controle, nem entre os grupos.

Com relação à onda-b, houve significativas alterações, tanto em condições escotópicas como em fotópicas. As respostas mostraram redução de amplitude principalmente nos grupos GSH 5 e GSH 10 mM.

Os grupos responderam de maneira semelhante em relação à latência da onda-b, sem apresentar diferenças entre o controle e entre os grupos.

Com os resultados da amplitude das ondas -a e -b podemos inferir que a GSH desempenha um papel pós-receptor, já que não alterou amplitude onda-a, formada principalmente pela resposta dos fotorreceptores. Já a diminuição da onda-b pode estar relacionada com alterações nas células bipolares, ganglionares e amácrinas

(WATCHMEISTER, 1998). Esses resultados estão de acordo, ainda, com o observado na avaliação dos potenciais oscilatórios, já que o OP3 é resultado da resposta das células pós-receptorais. A avaliação do OP3 mostrou grande redução nos grupos GSH 5 e GSH 10 mM. Não houve diferença entre o grupo controle e GSH 1 mM.

HARAZNY e colaboradores demonstrou em 2009 que ratos apresentam baixa resolução temporal em resposta a estímulos intermitentes de flicker, por isso o tempo implícito dessa resposta não foi avaliado; contudo a grande diferença encontrada na alteração de amplitude entre os grupos mostra alteração na resposta das células ganglionares.

Por último, as alterações no estímulo do flicker seguiram a mesma linha de resultados, com grande alteração de amplitude nos grupos GSH 5 e GSH 10 mM. O que demonstra uma alteração no tempo de recuperação da retina entre e um flash e outro.

A motivação para este trabalho vem das recentes descobertas da ação da glutathiona não apenas como agente anti-oxidante. Muitos estudos têm demonstrado que ela pode funcionar como neurotransmissor e neuromodulador no CNS. Receptores de GSH podem ser mais antigos do que os receptores de glutamato, uma vez que os ligantes de receptores de glutamato não são capazes de deslocar a GSH, enquanto que a GSH desloca ligantes de receptores de glutamato (JANÁKY *et al.*, 1999). Por isso a importância de se estudar uma via que utilize o glutamato como principal neurotransmissor, como é captação da informação luminosa na retina.

A retina é composta por células organizadas em camadas claramente distintas, morfológico e funcionalmente, o que é vantajoso para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela transferência dos sinais e pelas interações ocorridas na sua circuitaria (YANG, 2004). Células de Müller são as principais células gliais da retina. A concentração média de GSH nas células de Muller na retina é de cerca de 3,83 mM, esse valor é compatível com os estudos comparativos em outras células gliais. A morfologia característica e o posicionamento geométrico destas células provêm a precisa modulação da transmissão glutamatérgica ou gabaérgica (HUSTER, 2000; NEWMAN & REICHENBACH, 1996).

Em ratos, existe essa grande participação da atividade gabaérgica na sinalização vertical entre neurônios de camadas retinianas diferentes, e uma das hipóteses para explicar a diminuição da amplitude da onda-b nas respostas é a liberação de GABA induzida por glutamato, através do influxo de Ca^{+2} da ativação de receptores

do tipo AMPA. A modulação da GSH nesse evento foi mostrada em retina de galinhas, onde glutamato e GSH foram responsáveis pela liberação de GABA, ocorrendo também uma atenuação da liberação quando utilizado um bloqueador da síntese de glutamato (PEREIRA, 2012). Na retina, os receptores GABA_A e GABA_C possuem atividades opostas na amplitude da onda-b. O receptor GABA_A, além de ser o mais abundante é o que possui real atividade inibitória (KAPOUSTA-BRUNEAU, 2000; PAN, 1995).

Outra hipótese é a da super-ativação das células glutamatérgicas de segunda ordem. Na literatura existem trabalhos que mostram que a saturação desses receptores com L-glutamato diminui, ou até mesmo, extingue a geração da onda-b (ARDEN, 2011). Dessa forma as altas concentrações de GSH poderiam desencadear essa super-ativação, o que diminuiria também resposta excitatória das células glutamatérgicas. A atividade da GSH em receptores glutamatérgicos foi sugerida pela capacidade de seus três constituintes básicos (glutamato, cisteína e glicina) de interferirem na atividade dos receptores, já que a cisteína em grandes concentrações é neurotóxica e a glicina é um coagonista de receptores de glutamato do tipo NMDA (OJA, 2000).

A continuidade deste trabalho terá o foco no bloqueio seletivo de receptores de GABA e glutamato. Dessa forma, será possível inferir qual o tipo de receptor que está sendo mais afetado pela GSH na retina, ou se a ação inibitória tem caráter duplo, com modulação de receptores gabaérgico e glutamatérgicos na retina.

8. CONCLUSÃO

Os resultados prévios obtidos demonstram que a GSH pode alterar a amplitude das respostas eletrorretinográficas de ratos *Wistar* em condições escotópicas e fotópicas;

Os resultados mostraram também que as alterações ocorrem em neurônios de segunda ordem, devido a pouca alteração nas respostas dos fotorreceptores, e grande alteração na amplitude da onda-b, nos potenciais oscilatórios e na resposta intermitente do flicker;

A GSH não altera o tempo de latência das ondas do ERG;

A diminuição das amplitudes observadas está diretamente relacionada com o aumento na concentração de GSH;

Essas observações mostram que a GSH de alguma forma modula a resposta na retina, provavelmente aumentando resposta gabaérgica inibitória.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER KR; BARNES CS; FISHMAN GA. High-frequency attenuation of the cone ERG and ON-response deficits in X-linked retinoschisis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 42(9) : 2094-101, 2001.

ANA SOARES DA SILVA RODRIGUES NETO. Glutathione: envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas. **Dissertação de mestrado.** Universidade do Porto, 2010.

ARDEN GB; SIVAPRASAD S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. **Current Diabetes Reviews,** 7(5), 2011.

BALLATORI N; HAMMOND CL; CUNNINGHAM JB; KRANCE SM; MARCHAN R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 204: 238-255, 2005.

BALLATORI N; KRANCE S; NOTENBOOM M; S SHI; S TIEU; HAMMOND K. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry.** 390(3): 191–214, 2009.

BRAEKEVELT C; HOLLENERG M. J. The development of the retina of the albino rat. **American Journal of Anatomy.** 127: 281-302, 1970.

BUI B; FORTUNE B. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. **Journal of Physiology.** 555(1): 153-173, 2003.

CHIU K; CHANG RC; SO K. Intravitreal Injection for Establishing Ocular Diseases Model. **Journal of Visualized Experiments.** 8: 313, 2007.

CICERONE CM. Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat. **Science.** 194: 1183-S, 1976.

DAVID LL; SHEARE TR. State of sulfhydryl in selenite cataract. **Toxicology and applied Pharmacology,** 74(1), 1984.

DICKINSON DA; FORMAN HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology** 64(5-6), 2002.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, 62: 649-669, 1999.

FORMAN HJ; RINNA A; ZHANG H. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, 30: 1-12, 2009.

GHOSH K; BUJAN S; HAVERKAMP S; FEIGENSPAN A; WÄSSLE H. Types of bipolar cells in the mouse retina. **Journal of Comparative Neurology**. 469: 70–82, 2004.

GRANIT R. The components of the retinal action potentials in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. **Journal of Physiology**. 77: 207±239, 1933.

GRANIT RL; MUÈNSTERHJELM A. The electrical response of dark adapted frog's eye to monochromatic stimuli. **Journal of Physiology**. 88: 436±458, 1937.

HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova** 31(5): 1170-1179, 2008.

HUSTER D; REICHENBACH A; REICHEL T W. The glutathione content of retinal Muller (glial) cells: effect of pathological conditions. **Neurochemistry International**, 36(4-5), 2000.

JACOBS GH; FENWICK JA; WILLIAMS GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. **The Journal of Experimental Biology**. 204: 2439–2446, 2001.

JANAKY R, OGITA K, PASQUALOTTO BA, BAINS JS, OJA SS, YONEDA Y, SHAW CA. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. **J Neurochem**. 73:889–902, 1999.

KAPOUSTA-BRUNEAU NV. Opposite effects of GABA_A and GABA_C receptor antagonists on the b-wave of ERG recorded from the isolated rat retina. **Vision Research** 40: 1653-1665, 2000.

KEURI ELEUTÉRIO RODRIGUES. Avaliação Eletroretinográfica de Ratos Wistar Jovens Submetidos à Tireoidectomia Bilateral. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, 2013.

KRYZHANOVSKY GN. Some categories of general pathology and biology: health, disease, homeostasis, sanogenesis, adaptation, immunity New approaches and notions. **Pathophysiology**. 11(3):135-138, 2004.

KOLB H. **How Does Retina Works**. American Scientist, Sigma Xi 91, 2004.

LAYTON CJ; SAFA R; OSBORNE NN. Oscillatory potentials and the b-Wave: Partial masking and interdependence in dark adaptation and diabetes in the rat. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**. 245: 1335–1345, 2007.

MARMOR MF; FULTON AB; HOLDER GE; MIYAKE Y; BRIGELL M; BACH M. (for the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision). **Documenta Ophthalmologica**. 118:69–77, 2009.

NEWMAN E; REICHENBACH A. The Muller cell: a functional element of the retina. **Trends in Neuroscience**, 19(8), 1996.

OJA SS; JANÁKY R; VARGA V; SARANSAARI P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. **Neurochemistry International**, 37(299±306), 2000.

PAN Z; THRING RB; GRANTYN R; STUART AL. Differential Modulation by Sulfhydryl Redox Agents and Glutathione of GABA- and Glycine-Evoked Currents in Rat Retinal Ganglion Cells. **The Journal of Neuroscience** 15(2): 1394-1391, 1995.

PARK WH; YOU BR. Gallic acid induced lung câncer death is related to glutathione; depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**. 24(5): 1356-1362, 2010.

POW D; CROOK DK. Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. **Neuroscience Letters**, **193**(1), 1995.

PURVES D. **Neuroscience**. 3ª Edição, Sinauer Associates, 2004.

SZÉL A; LUKÁTS A; FEKETE T; SZEPESSY Z; ROHLICH P. Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. **Journal of the Optical Society of America**. **17** (3), 2000.

TAPIERO H; TEW KD. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **57**(3-4): 145-155, 2003.

TIAGO DE LIMA PEREIRA. Efeito modulador da glutathione na liberação de GABA induzida por glutamato em retinas de embrião de galinha. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Pará, 2012.

VIDAL-SANZ M; SALINAS-NAVARRO M; NADAL-NICOLÁS FM., Understanding glaucomatous damage: Anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. **Progress in Retinal and Eye Research** **31**: 1-27, 2012.

WACHTMEISTER L. Oscillatory Potentials in the Retina: what do they Reveal. **Progress in Retinal and Eye Research** **17**(4): 485-521, 1998.

WASSLE H. Parallel processing in mamalian retina. **Nature Reviews Neuroscience**, **5** 2004.

WEIDNER C. The c-wave in the erg of albino rat. **Vision Research**, **16**(7), 1976.

WEYMOUTH AE; VINGRYS AJ. Rodent electroretinography: Methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. **Progress in Retinal and Eye Research** **27**:1–44, 2008.

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

ZHAO Y; YU B; XIANG Y-H; HAN X-J; XU Y. Changes in Retinal Morphology, Electroretinogram and Visual Behavior after Transient Global Ischemia in Adult Rats. **PLoS ONE** 8(6): e65555, 2013.



PARECER 174-13

Projeto: INFLUÊNCIA DA GLUTATIONA NAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS EM RETINA DE RATOS WISTAR

Coordenador: Profa. Dr. Bruno Duarte Gomes

Área Temática: Neurociências

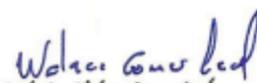
Vigência: 07/2013 a 07/2014

No no CEPAE-UFPA: 180-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N=50, Ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 30 de junho de 2013


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA