

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

TARCYANE BARATA GARCIA

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO SOBRE OS NÍVEIS
EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E COMPOSTOS TIÓIS NA RETINA
EMBRIONÁRIA DE GALINHA

BELÉM

2011

TARCYANE BARATA GARCIA

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO SOBRE OS NÍVEIS
EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E COMPOSTOS TIÓIS NA RETINA
EMBRIONÁRIA DE GALINHA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, ICB-UFPA.

BELÉM

2011

TARCYANE BARATA GARCIA

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO SOBRE OS NÍVEIS
EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E COMPOSTOS TIÓIS NA RETINA
EMBRIONÁRIA DE GALINHA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, ICB-UFGPA.

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena – 1º Avaliador
ICB - Universidade Federal do Pará

Profª. Dra. Maria Elena Crespo-Lopez – 2º Avaliador
ICB - Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Evander Batista de Jesus – Suplente
NMT – Universidade Federal do Pará

BELÉM

2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação do Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

A vocês que tornaram este momento possível, porque me deram a vida e me ensinaram a lutar pelos meus objetivos, **Maria da Paz e Tarcízio Garcia**.

A minha irmã, **Tarcymara Garcia** que entende igualmente e compartilha dos sacrifícios para a conclusão deste.

Ao meu professor e amigo, **Anderson Herculano**, que idealizou o trabalho e “me ensinou a pescar”.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Apreendi que uma das grandes virtudes do ser humano é a gratidão, porém seria quase impossível citar os nomes de todos aqueles que de alguma maneira me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho. Mais difícil seria traduzir em palavras este sentimento de gratidão. Ainda assim, meus sinceros agradecimentos:

ORIENTADOR

Ao meu orientador **Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano**. Que acreditou em mim, quando eu própria achei que não conseguiria. Que sempre me incentivou e me ajudou de todas as maneiras possíveis. Que sempre me surpreende quando acho que vou levar uma bronca, mas nada acontece, e quando acho que nada vai acontecer levo uma bronca (risos). Conhece todos os meus trejeitos e sabe que não sei demonstrar afeição. Você é uma pessoa muito especial para mim e muitos dos seus passos eu quero seguir. E vamos publicar !!!!!

FINANCIADORES

À **UFPA**, seus servidores e ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular – **PPNBC**. Ao **CNPq** e **CAPES** que tornaram este trabalho financeiramente viável. E à **Makarú Ltda** pela doação dos ovos Leghorn.

LNE

A todos os alunos do LNE e ao Prof. Dr. **Domingos Picanço-Diniz**. Ao **Edinaldo** que muito me ajudou no HPLC dentre outras atividades do laboratório. Em especial aos meus amigos, **Adriene, Andréa, Caio, Daniel, Danielle, Elierson, Keuri, Luana, Maíra, Mônica, Natasha, Suellen, Susanne, Tayana e Waldiney**. Um “valeu mesmo” para as *girls* do lab, pela sexta do vestido e é claro, pela saidinha das mulheres, sensacional! E não podia faltar ele, o “mais mais” da Neuro, que queria me impedir de colocar um agradecimento MUITO especial, o meu amigo **Alan Grisólia**, que adora dosar glutamato as 6:30h da madrugada. Ele me aturou por

mais de três meses na sala de HPLC e se transformou no meu terapeuta particular. Obrigada por sua imensa ajuda em todos os âmbitos.

LNMC e LFM

À equipe do laboratório de Neuroquímica. Ao **Prof. Dr. José Luiz do Nascimento** que me abriu as portas para a ciência. À **Barbarela, Luiz Antônio e Karen Renata** que me conheceram ainda “criança” e desde então, estão sempre dispostos a ajudar. E eu não poderia esquecer da **Neide**, sempre me auxiliando.

À professora **Maria Elena Crespo-Lopez**, que nos prestigiou com as suas observações durante a qualificação deste trabalho. E a toda equipe do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial aos amigos **Rogério, Allan e Gisele**.

AMIGOS / MANHANUNGARA

Às “*six and seven*”, **Tatiane, Lorena, Carla, Deyse, e Alessandra**. Aos amigos que estão distantes, mas que permanecem no coração **Miguel, Alaine, Priscilla, Benedita, Cristiano e Cassiano**. Aos amigos do Grupo de Expressões de Cultura Popular Manhanungara, **Lane, Drica, Gley, Gleysson, Ivanildo e Thainá**.

FAMÍLIA

A todos os tios, tias, primos e primas maternos e paternos e minha querida vó **Dora**. Aos meus irmãos paternos e fundamentalmente àqueles que não mediram esforços para ver a minha felicidade. Meus pais, minha vida: **Maria da Paz e Tarcízio Garcia**. Minha irmã, meu espelho: **Tarcymara Garcia**. Não importa o que eu escreva aqui, não será suficiente para expressar a minha gratidão. Amo vocês! E o carinho e as palavras que recebi dos três no último natal jamais serão esquecidos. Eu quase ia esquecendo dele (risos), o futuro genro do papai, Wanderson. “Valeu aí” cunhado por tudo, incluindo os sorvetes, pizzas, filmes, bônus, e por ai vai.

Por último e o principal no meu coração, a Ele que esteve por trás de tudo isso e me carregou quando perdi o chão. Ao meu **Deus**, que tomou conta dos meus pensamentos e me deu força para continuar diante do luto da desilusão. Que me ensinou que o choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã (Sl, 30:5).

Well, it was very good when I realized the importance of the discovery of the nerve growth factor (...) I did not believe I would be a scientist. I wanted to go to Africa to fight leprosy. At the very end I work scientifically, but I work also to help women in the end. So I do believe that the best period of my life is the present.

Rita Levi-Montalcini

Interview at the European
Brain Research Institute
(september 2, 2008)

RESUMO

O fator de crescimento do nervo (NGF) e o glutamato têm papéis bem definidos durante o desenvolvimento do sistema nervoso e podem atuar de maneira sinérgica para induzir a sobrevivência neuronal. O NGF promove a liberação de glutamato em diferentes áreas corticais, mas pouco é conhecido sobre a regulação da liberação de glutamato por NGF na retina. Por este motivo, investigamos se NGF poderia modular a liberação de glutamato no tecido retiniano durante o seu pico de atividade neurotrófica (E10-E12). Além disso, estudamos os mecanismos de liberação de glutamato com relação a sua dependência de Ca^{2+} extracelular e a participação de transportadores dependentes e independentes de Na^+ . Uma vez que, níveis elevados de glutamato estão implicados na ocorrência de estresse oxidativo, investigamos também os efeitos de NGF sobre a liberação de compostos tióis. Para isto, tecidos retinianos íntegros de embrião de galinha (E11) foram incubados com NGF (10, 50, 100 ng/ml) por diferentes períodos de incubação (15, 30, 120). Os níveis extracelulares de glutamato e tióis foram medidos por cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE) e ensaio colorimétrico, respectivamente. Observamos que NGF aumenta rapidamente a liberação basal de glutamato e também pode induzir a liberação de tióis em um tempo maior de incubação. De maneira interessante, o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por NGF foi revertido em meio sem Ca^{2+} somente em retinas tratadas por 15 min. Retinas que foram incubadas com NGF por 30 min apresentaram liberação de glutamato independente de Ca^{2+} . Dado que, a liberação de glutamato e tióis induzida por NGF não foi bloqueada por Zn^{2+} e ocorreu na ausência de Na^+ , sugerimos o possível envolvimento do sistema independente de Na^+ , o trocador Xc^- em ambos os processos. O aumento de tióis extracelulares induzido por NGF poderia representar um importante mecanismo protetor, possibilitando que os neurônios mantenham seu estado redox durante o desenvolvimento.

ABSTRACT

Nerve growth factor (NGF) belongs to the neurotrophin family and induces its effects through activation of two distinct receptor types. NGF was first described by Rita Levi-Montalcini and collaborators as an important factor involved in nerve differentiation and survival. Another role for NGF has been established in neurotransmitter release in the hippocampus, developing visual cortex and cerebellar neuron. However, this phenomenon has not been demonstrated in retina to date. We therefore investigated whether NGF can modulate the glutamate release in the retinal tissue at its peak of the neurotrophic activity (E10-E12). In addition this, we aimed to study the mechanisms of this effect about its dependence on extracellular Ca^{2+} and participation of Na^{+} -dependent and Na^{+} -independent glutamate transporters. Since high levels of glutamate signalization have been implicated in the oxidative stress, we also investigated the effects of NGF on the thiols compounds. We used intact retinal tissue from chicken embryos (E11) incubated with NGF (10, 50, 100 ng/ml) for different periods (15, 30, 45, 60, 120 min). Extracellular glutamate and thiols content was measured by HPLC methods and colorimetric assay, respectively. We found that NGF rapidly enhances the release of basal glutamate and it can induce thiol release in a more prolonged time of incubation, as well. Interestingly, the NGF-induced increase in the extracellular levels of glutamate was blocked by Ca^{2+} -free medium only in retina treated for 15 min. Retina incubated for 30 min showed a non-vesicular NGF-induced glutamate release. Since glutamate and thiol release was not blocked by Zn^{2+} , we suggested the possible involvement of system Xc⁻ in both processes. NGF-induced increase in the extracellular thiol could be an important protective mechanism enabling retinal neurons to maintain their redox status during development.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Representação esquemática da estrutura da proteína NGF.....	17
Figura 2.	Modelo em fita da estrutura do NGF.....	21
Figura 3.	Representação esquemática dos receptores de NGF.....	25
Figura 4.	Representação Esquemática das Vias de sinalização mediadas por TrkA.....	27
Figura 5.	Representação esquemática das vias de sinalização mediadas por p75NTR.....	30
Figura 6.	As possíveis formas de internalização do NGF acoplado ao seu receptor TrkA.....	33
Figura 7.	Transporte retrógrado e endossomos de sinalização.....	34
Figura 8.	Transportadores de Glutamato.....	41
Figura 9.	Efeito do NFG sobre os níveis extracelulares de glutamato	54
Figura 10.	Efeito do NGF sobre os níveis extracelulares de compostos tióis	55
Figura 11.	Efeito do NGF sobre os níveis intra e extracelulares de tióis.....	56
Figura 12.	Efeito da remoção dos íons Ca^{2+} sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por NGF	58
Figura 13.	Efeito da remoção do íon Zn^{2+} sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por NGF.....	59
Figura 14.	Efeito do íon Zn^{2+} sobre o aumento dos níveis extracelulares de compostos tióis estimulado por NGF	60
Figura 15.	Efeito da remoção de Na^+ sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato estimulado por NGF	62

Figura 16.	Efeito da remoção do Na ⁺ sobre o aumento dos níveis extracelulares de compostos tíois estimulado por NGF	63
Figura 17.	Efeito do NGF sobre a liberação de LDH na retina embrionária de galinha	64
Tabela 1	Liberação de neurotransmissores induzida por NGF em diferentes modelos experimentais	36
Tabela 2	Expressão dos receptores de NGF na retina de diferentes espécies em estágios de desenvolvimento e durante a vida adulta	39
Tabela 3	Soluções utilizadas em CLAE	48

LISTA DE SIGLAS

[PI(3,4,5)P3] – Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

[PI(4,5)P₂] – Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

ANOVA – Análise de Variância

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

BSA – Albumina Bovina Sérica

CaMK – Proteína-Cinase dependente de Ca²⁺

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficácia

CMF – Tampão Livre de Ca²⁺ e Mg²⁺

DAG – Diacilglicerol

DTNB – Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

EAAC1 – Carreador de Aminoácido Excitatório 1

EAAT1, 2, 3, 4, 5 – Transportador de Aminoácido Excitatório subtipo 1, 2, 3, 4, 5.

EGTA – Ácido Etilenoglicol Tetracético

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GEF – Fator Permutador de nucleotídeo Guanina

GLAST – Transportador de Glutamato/Aspartato

GLT-1 – Transportador de Glutamato 1

GSH – Glutathiona reduzida

ICD – Domínio Intracelular

IP3 – Inositol 1,4,5-trifosfato

JNK – c-Jun N-terminal Cinase

LDH – Lactato Desidrogenase

MAPK – Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

MRP – Proteína associada à Resistência a Múltiplas drogas

NGF – Fator de Crescimento do Nervo

NT3,4,5,6,7 – Neurotrofina 3,4,5,6,7

OATP – Polipeptídeo Transportador de Ânions Orgânicos

OPA – Orto-Ftaldeído

p75NTR – Receptor pan-NT

PBS – Tampão Fosfato Salino

PK1 – Proteína Cinase Dependente de Fosfatidilinositol

PI3K – Cinase do Fosfatidilinositol 3

PKB – Proteína Cinase B

PKC – Proteína Cinase C

PLC γ – Fosfolipase γ

RGC – Células Ganglionares da Retina

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TCA – Ácido Tricloroacético

TNB – Ácido Nitrobenzóico

TNFR-SF – Superfamília de Receptores para Fatores de Necrose Tumoral

TRAR6 – Fator 6 Associado ao Receptor TNF

TrkA, B, C – Receptor tirosino-cinase subtipo A, B e C.

Trx - Tioredoxina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO	18
2.1.1 A Descoberta do NGF	19
2.1.2 Estrutura.....	20
2.1.3 Biosíntese e Localização	22
2.1.4 Receptores de NGF.....	24
2.1.5 Endocitose e Transporte Retrógrado.....	29
2.1.6 Modulação da transmissão sináptica	35
2.2 RETINA.....	37
2.2.1 Fator de Crescimento do Nervo.....	37
2.2.2 Glutamato	38
2.2.3 Compostos Tióis.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 OBTENÇÃO DO TECIDO RETINIANO DE EMBRIÃO DE GALINHA.....	45
4.2 TRATAMENTOS.....	45
4.3 MEDIDA DOS NÍVEIS DE GLUTAMATO	46
4.3.1 Instrumentação e Condições cromatográficas	47
4.3.2 Reagentes e Soluções Analíticas	47
4.3.3 Preparo das Amostras e Procedimento de Derivatização.....	49

4.3.4 Quantificação de Glutamato e Curva de Calibração	49
4.4 MEDIDA DOS NÍVEIS DE COMPOSTOS TIÓIS	50
4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	51
4.6 MEDIDA DOS NÍVEIS DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	52
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5 RESULTADOS	53
5.1 O NGF INDUZ AUMENTO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES BASAIS DE GLUTAMATO E COMPOSTOS TIÓIS NA RETINA EMBRIONÁRIA.....	53
5.2 MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E TIÓIS	57
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE	83

1 INTRODUÇÃO

O fator de crescimento do nervo (NGF – *Nerve Growth Factor*) é uma glicoproteína constituída por 118 aminoácidos (Figura 1A), altamente conservada entre as diferentes espécies de vertebrados (Figura 1 B) (MICERA *et al*, 2007).

O NGF é primariamente um sinalizador extracelular parácrino, liberado localmente, capaz de afetar neurônios e células não-neuronais, com alguns casos de atividade endócrina e autócrina (YARSKI; BRADSHAW, 2003).

Em linhas gerais, o NGF age como um fator derivado de célula-alvo, transportado retrogradamente. Pode induzir o crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de diferentes tipos celulares, através da ligação a duas classes de receptores totalmente distintas (LEVI-MONTALCINI *et al*, 1996).

A expressão transitória destes receptores, em muitas áreas cerebrais, sugere que NGF pode regular a ontogenia de diferentes populações neuronais, processo que pode ocorrer de maneira sinérgica com a atividade de neurotransmissores excitatórios (COHEN-CORY; DREYFUS; BLACK, 1991).

Recentemente, outras funções foram associadas com a atividade deste fator neurotrófico, como a modulação da transmissão e plasticidade sináptica. A aplicação de NGF em áreas centrais, como hipocampo e cerebelo, leva ao aumento notável da liberação de neurotransmissores (NUMAKAWA *et al*, 2003; HUH *et al*, 2008).

Contudo, até o presente, o estudo do aumento da liberação de neurotransmissores induzido por NGF, incluindo o glutamato, se restringiu a áreas corticais. Pouco se conhece a respeito deste fenômeno na retina, embora este tecido sintetize e expresse os receptores de NGF, desde os estágios iniciais do desenvolvimento (EBENDAL; PERSSON, 1988).

A importância da regulação dos níveis de glutamato na retina está implicada tanto em eventos de desenvolvimento (BODNARENKO; JEYARASASINGAM; CHALUPA, 1995), quanto em quadros de retinopatias (PULIDO *et al*, 2007), o que justifica o interesse na investigação de fatores que possam regular a liberação do neurotransmissor nesta área do sistema nervoso central (SNC).

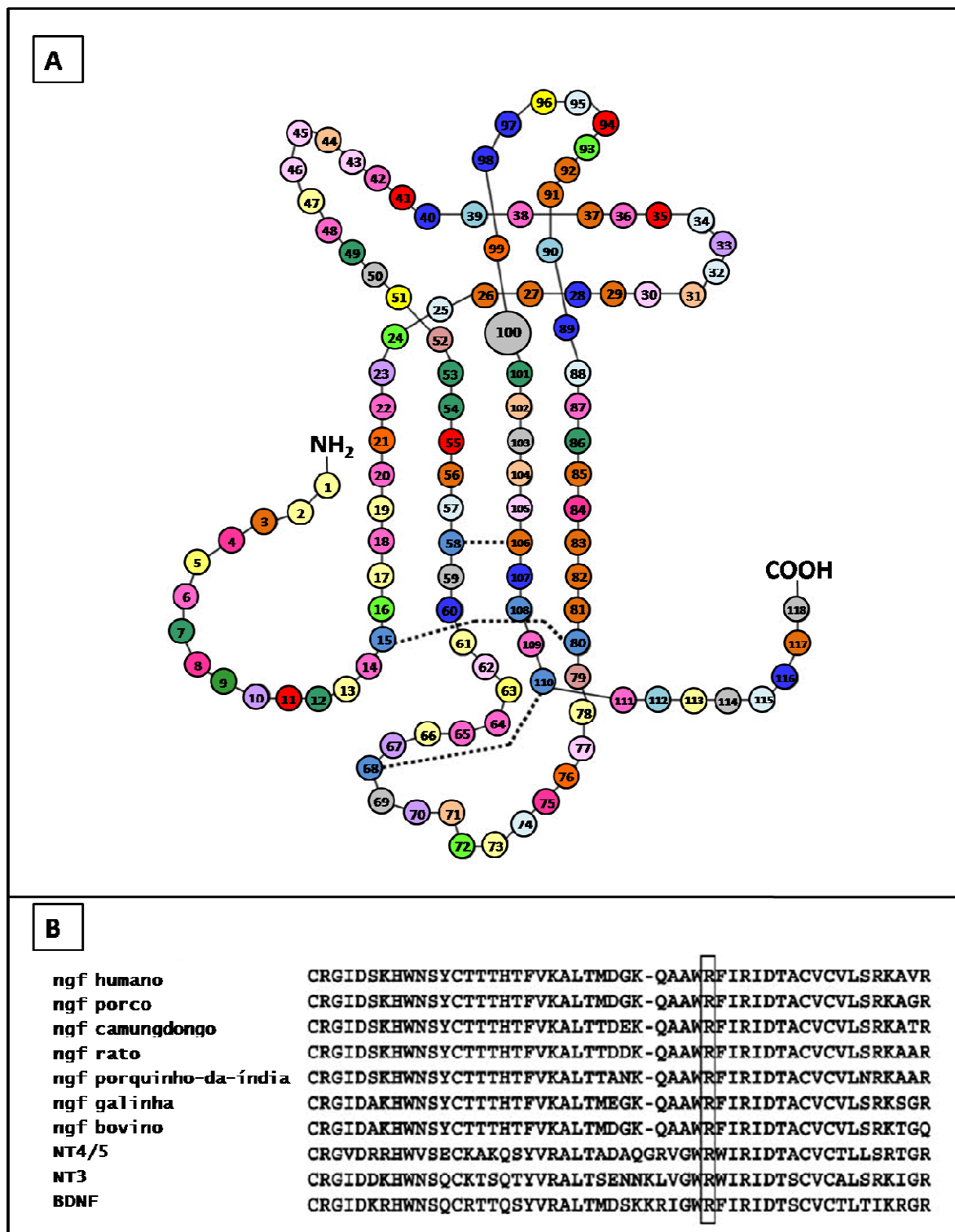


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da proteína NGF. (A) Seqüência de aminoácidos, baseada no modelo tridimensional de McDonald et al.(1991 *apud* Wiesmann e de Vos, 2001). As linhas tracejadas representam as pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína. Fonte: Modificado de Einarsdottir et al. (2004) (B) Alinhamento de seqüência da proteína NGF de diferentes espécies, e de outras neurotrofinas humanas, mostrando a grande homologia entre os polipeptídios, e a conservação do aminoácido arginina ocupando a posição 100 na seqüência de aminoácidos [em destaque no alinhamento (R)]. Fonte: Adaptado de Einarsdottir et al. (2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO

Apesar das sinapses, na maioria das vezes, transmitirem sinais em uma única direção, a comunicação celular pode ser descrita como bidirecional. O tecido-alvo também emite sinais que regulam quantos dos vários neurônios em inervação deverão sobreviver (ALBERTS *et al*, 2009).

Esta sinalização neurotrófica – que comanda a sobrevivência de um subconjunto de neurônios, bem como a formação e manutenção do número ideal de conexões – ocorre em parte, pelo fornecimento e disponibilidade de fatores tróficos secretados por células-alvo (PURVES *et al*, 2008).

A maior parte dos neurônios é produzida em excesso, mas até 50% deles morre logo após alcançarem seu alvo. Isto porque, para sobreviverem, estas células precisam “competir” por fatores tróficos sintetizados em quantidades limitadas pelo tecido-alvo. Esta estratégia aparentemente dispendiosa de superprodução, seguida pela morte de células excedentes, oferece um meio efetivo para ajustar cada população de neurônios à quantidade de tecido que requer inervação (ALBERTS *et al*, 2009).

Existem várias classes de fatores de crescimento e algumas delas agem quase que exclusivamente no sistema nervoso, enquanto outras atuam sobre uma grande diversidade de células por todo o corpo (SIEGEL *et al*, 2006).

Dentre os fatores tróficos que atuam no sistema nervoso, se destacam as neurotrofinas, família de moléculas relacionadas, com estrutura bioquímica altamente conservada. Quatro membros distintos foram identificados: o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*), as neurotrofinas 3 (NT3) e 4/5 (NT4/5), e o NGF, o qual é o mais bem estudado e caracterizado no sistema nervoso (CHAO *et al*, 2006).

2.1.1 A Descoberta do NGF

A origem da hipótese que prevê a capacidade de algumas substâncias de favorecer a diferenciação e o prolongamento axonal, data a partir de 1942. Rita Levi Montalcini e seu professor Giuseppe Levi, inspirados pelo trabalho prévio do embriologista experimental, Viktor Hamburger conduziram um estudo sobre os eventos que seguiam à amputação de membros em embriões de galinha. Neste trabalho, caracterizaram os eventos de desenvolvimento, os quais aproximadamente três décadas depois seriam conhecidos como morte celular geneticamente programada ou apoptose (LEVI MONTALCINI; LEVI, 1942 *apud* COWAN, 2001).

Por volta de 1952, Levi-Montalcini sugeriu que certos tumores liberavam fatores humorais, que ao atingirem os gânglios, promoviam um crescimento intenso de fibras. Para testar esta hipótese, neurônios ganglionares simpáticos e sensoriais de embriões de galinha foram cultivados em meio semi-sólido, envolvidos por fragmentos de sarcomas murinos 180 e 37. Em resposta, eles produziram um halo denso de fibras nervosas entre 12-24 horas (LEVI-MONTALCINI, 1982).

O fator humoral liberado pelos dois sarcomas de camundongos foi identificado pelo bioquímico Stanley Cohen. Por sua habilidade em induzir um crescimento maciço de neuritos, este fator foi batizado como “Fator de Promoção do Crescimento do Nervo”, nome posteriormente encurtado para “Fator de Crescimento do Nervo” (COHEN; LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1954).

Em 1956 e 1958, Levi-Montalcini et al, descobriram que as mais potentes fontes de NGF eram encontradas em veneno de cobras e em glândulas salivares submaxilares de camundongo. Apesar de uma procura extenuante por fontes alternativas, a glândula salivar de camundongo permaneceu como a mais rica fonte, fornecendo NGF purificado para estudos estruturais, bem como para a exploração de seu mecanismo de ação (COWAN, 2001).

2.1.2 Estrutura

Hoje é bem estabelecido que a molécula de NGF, biologicamente ativa, consiste de duas cadeias polipeptídicas idênticas ligadas não-covalentemente, por pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas entre suas β -folhas centrais (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008). Entretanto, muitas das contradições sobre a estrutura desta proteína só foram solucionadas quando se tornou claro que ela existe em duas formas de diferentes pesos moleculares: uma forma de alto peso molecular e outra de baixo peso molecular, conhecidas respectivamente como NGF 2.5 S e NGF 7S (Figura 2) (SHOOTER, 2001).

NGF 2.5 S é o dímero biologicamente ativo com monômeros idênticos (2 subunidades β) mantidos juntos por ligações não covalentes (Figura 2B). Por sua vez, NGF 7S, além do próprio dímero, contém dois outros tipos de subunidades (duas subunidades α e duas subunidades γ) (Figura 2C). Apesar da modificação estrutural, NGF 7S não difere de NGF 2.5 S em sua atividade biológica (LEVI-MONTALCINI, 1982).

A seqüência de aminoácidos do NGF foi elucidada por Angeletti e Bradshaw em 1971. Cada monômero (Figura 2A) de β -NGF possui 118 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 13 kDa. A estrutura cristalográfica de NGF foi determinada em 1991 (McDONALD *et al*, 1991 *apud* WIESMANN; de VOS, 2001), revelando que o monômero de NGF tem uma forma alongada, com a parte central da molécula formada por dois pares de β -folhas trançadas e antiparalelas. Na sua forma biologicamente ativa, dois monômeros se posicionam ao redor de um eixo central, assumindo a forma de um halter. As duas β -folhas centrais de cada monômero se posicionam uma contra outra, formando a haste do halter (WIESMAN; de VOS, 2001).

O complexo NGF 7S foi descrito apenas em glândulas salivares de camundongos e ratos. Em humanos, o NGF ativo foi somente encontrado na forma do dímero β (β -NGF), sendo similar em todos os tecidos (McDONALD; CHAO, 1995).

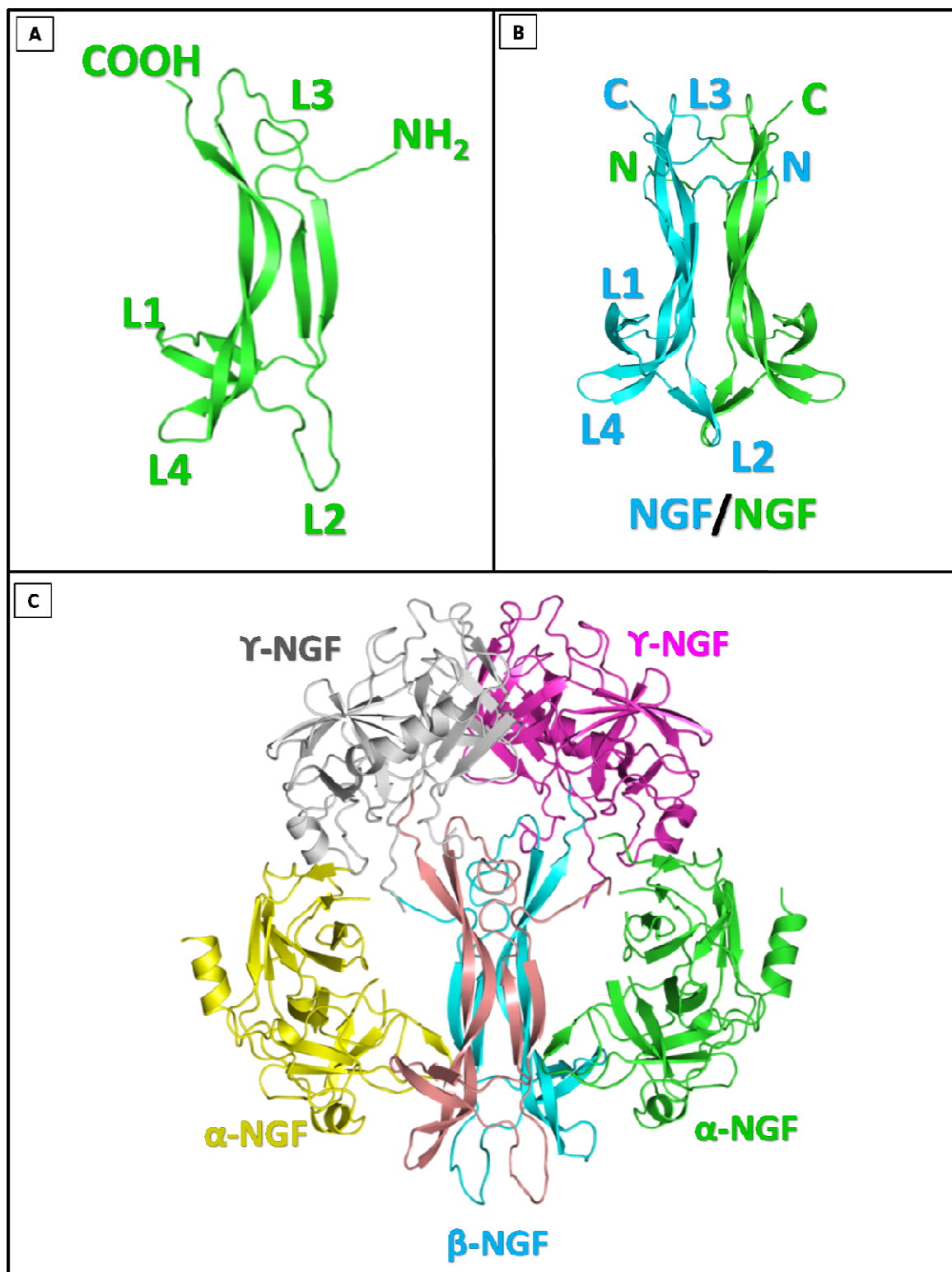


Figura 2: Modelo em fita da estrutura do NGF. As estruturas são baseadas no modelo de McDonald et al, (1991 *apud* Wiesmann e de Vos, 2001) (A) Estrutura do Monômero NGF. L = regiões em laço. (B) NGF 2.5 S. Cada uma das estruturas verde e azul representa um dos monômeros que se unem para formar o dímero biologicamente ativo. (C) Estrutura de NGF 7S. O dímero β -NGF está representado em azul e rosa claro no centro, duas cópias de α -NGF são mostradas em amarelo e verde, e duas cópias de γ -NGF são mostradas em cinza e rosa escuro. Fonte: Modificado de Wiesmann e de Vos (2001).

2.1.3 Biosíntese e Localização

O gene codificante para o dímero β -NGF está localizado no cromossomo 3 em camundongo e no braço curto do cromossomo 1 em humanos. A estrutura do gene β -NGF é similar entre as espécies, com seis éxons e quatro íntrons (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

O produto protéico do gene NGF inclui uma seqüência sinalizadora ao retículo endoplasmático e um pró-domínio, seguido pela seqüência da proteína madura. Este produto gênico deve ser processado através de proteólise, resultando na proteína em seu estado ativo. Desta forma, NGF é sintetizado como um precursor (pré-pró-NGF) e sofre processamento pós-traducional para gerar e secretar a forma de NGF madura, (β -NGF) (MICERA *et al*, 2007).

Quatro diferentes transcritos de NGF foram descritos em camundongos, dois principais (A e B) e dois secundários (C e D), resultantes da presença de dois promotores e dois mecanismos de processamento alternativo de RNAm. No entanto, somente os transcritos principais A e B foram descritos em humanos. (RACKE *et al*, 1996).

Assim, a proteína NGF é traduzida a partir dos transcritos A e B, originando duas moléculas de pré-pró-NGF e a clivagem da seqüência sinalizadora no retículo endoplasmático leva à formação de dois peptídeos pró-NGF de 32 e 25 kDa, respectivamente (EDWARDS *et al*, 1988).

A molécula de pró-NGF foi considerada primeiramente uma forma intermediária de NGF ativo, sendo sistematicamente clivada em NGF maduro. De fato, estudos recentes mostram que pro-NGF é a principal forma de NGF em muitas células como neurônios simpáticos e astrócitos, bem como na próstata, tendo ele próprio efeitos pró-apoptóticos (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

O NGF é produzido por várias células no corpo, acumulando-se em diferentes tecidos e no sangue, mas os mecanismos que regulam a síntese e liberação deste fator neurotrófico ainda não estão completamente esclarecidos (LAMBIASE *et al*, 2004).

O NGF foi encontrado em baixas concentrações na próstata e fluído seminal de porquinhos-da-índia, búfalos, carneiros, coelhos e cabras, bem como, em pele humana e em numerosos tecidos e fluidos corporais. Também foi identificado em órgãos como o coração, rim, timo, diafragma, útero, canal deferente, baço e fígado (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

Em cultura de células, a medula adrenal, bem como várias linhagens celulares, como células L, 3T3, SV40 3TC, neuroblastoma, melanoma, mioblasto, glioma e glioblastoma, também produzem e secretam NGF (FURUKAWA *et al*, 1984; LAMBIASE *et al*, 2004).

Entre as células não-nervosas, que sintetizam e liberam NGF, destacam-se células inflamatórias imunes, tais como linfócitos T e B, mastócitos, eosinófilos, e monócitos/macrófagos (LAMBIASE *et al*, 2004); células estruturais, como fibroblastos, células epiteliais, células musculares lisas, queratinócitos e células endoteliais. NGF também foi encontrado em células β pancreáticas e nos tecidos adipócitos marrom e branco (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

No sistema nervoso, o NGF é produzido por neurônios e células da glia, como astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, os quais por sua vez, regulam o processo de diferenciação e sobrevivência de neurônios principalmente através da formação de circuitos parácrinos. No SNC, os mais altos níveis de NGF são encontrados no encéfalo adulto, em áreas como hipocampo, córtex e regiões olfativas (FRADE; BARDE, 1998).

Na retina, NGF foi detectado em células ganglionares, epitélio pigmentar e áreas adjacentes à membrana limitante externa (CUI *et al*, 2002; GARCÍA *et al*, 2003; SUN *et al*, 2008). Recentemente se observou que em retinas de ratos durante o desenvolvimento pós-natal, NGF é encontrado em células ganglionares, células de Muller e células pigmentadas nos períodos mais iniciais, enquanto que células amácrinas, bipolares e horizontais expressam o fator neurotrófico em períodos mais tardios (YOCHKOVA; VOUCHIDOLOVA; GERASIMOV, 2009).

2.1.4 Receptores de NGF

O NGF induz seus efeitos através da ativação de duas classes de receptores transmembrana completamente distintas (Figura 3): o receptor de alta afinidade, tirosino-cinase subtipo A (TrkA) e o receptor de baixa afinidade pan-NT (p75NTR) (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008). Estes receptores podem funcionar independentemente e com frequência desencadeiam resultados opostos, onde TrkA quase sempre promove sobrevivência e diferenciação, e p75NTR promove apoptose. Entretanto, quando estes receptores são co-expressos podem formar complexos, alterando a sinalização de ambas as partes (HUANG; REICHARDT, 2003).

Atualmente, sabe-se que a partir da ligação ao seu receptor TrkA, o NGF pode estimular múltiplas vias de sinalização. Ao contrário, o papel de p75NTR é consideravelmente mais enigmático, em parte porque p75NTR é desprovido de atividade cinase, não utilizando vias de sinalização convencionais, e pode também interagir com vários co-receptores (CUI, 2006).

Outra diferença interessante entre TrkA e p75NTR está no fato de que cada uma das pró-neurotrofinas e neurotrofinas maduras é capaz de se ligar e ativar o receptor p75NTR, enquanto que TrkA é específico para NGF. Assim como, BDNF e NT4 são específicos para TrkB, e NT3 para TrkC. Em alguns casos raros, NT3 também é apto para ativar TrkA, embora com menor eficiência (REICHARDT, 2006).

A) Receptor TrkA

O receptor TrkA é uma glicoproteína de 140 kDa, composto de uma única hélice transmembrana. Pertence à família de receptores tirosino-cinases, com atividade cinásica intrínseca no seu domínio intracelular. É amplamente expresso no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), bem como em células não-neuronais

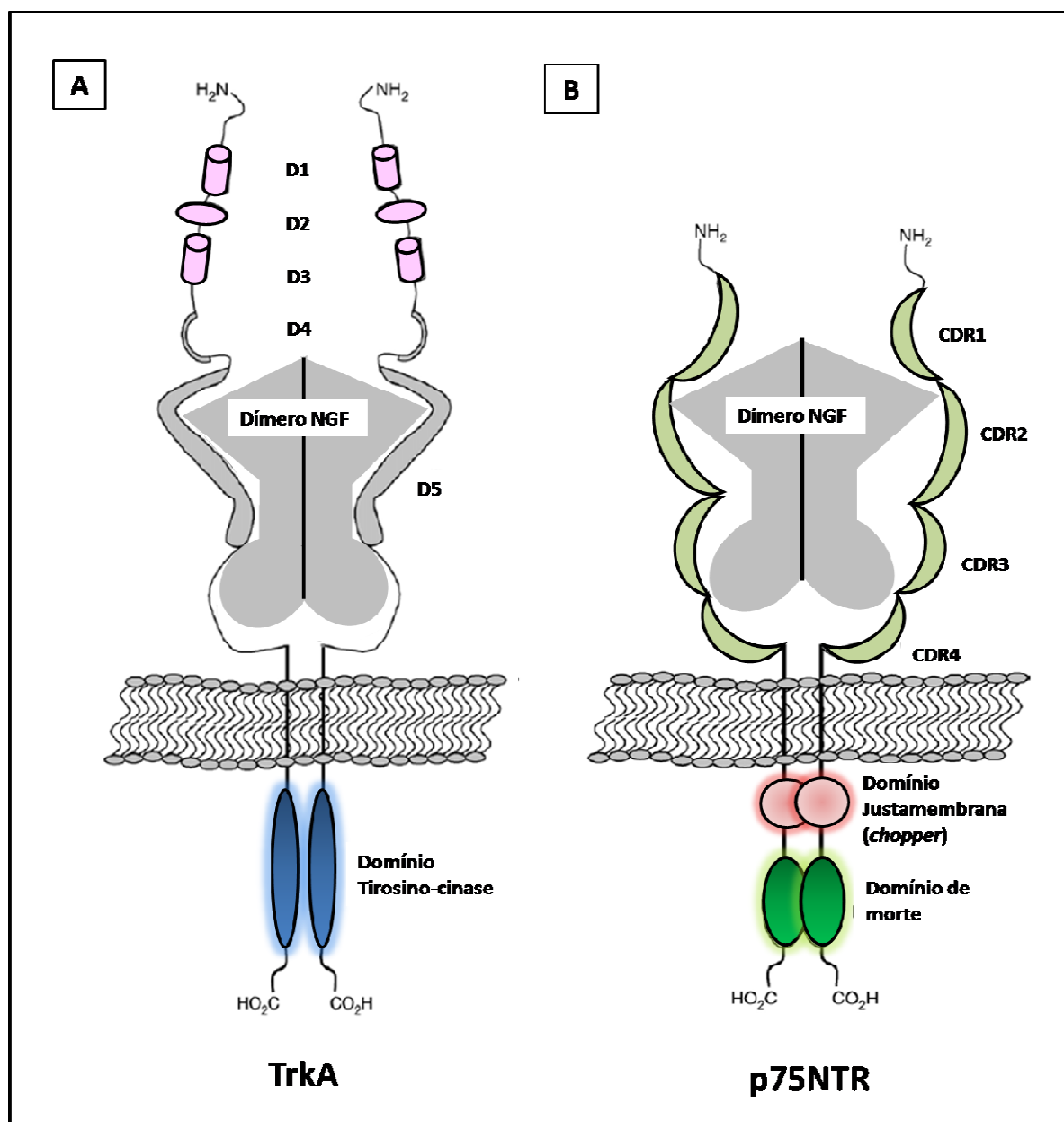


Figura 3: Representação esquemática dos receptores de NGF. (A) Estrutura do receptor TrkA – O dímero NGF induz a dimerização do receptor TrkA levando a sua ativação. A sequência extracelular contém cinco domínios (D1-D5), sendo que D5 é responsável pela ligação de NGF. O receptor possui um único domínio transmembrana curto, seguido por um domínio intracelular que contém uma atividade tirosino-cinase intrínseca. (B) Estrutura do receptor p75NTR – O dímero NGF induz a dimerização do receptor p75NTR levando a sua ativação. O domínio extracelular do receptor contém quatro domínios ricos em cisteína chamados CRD1-4, característica dos receptores pertencentes à superfamília dos receptores de morte. O receptor possui um único domínio transmembrana, seguido por dois domínios intracelulares particulares, que auxiliam no recrutamento de proteínas adaptadoras: o domínio justamembrana ou *chopper* e o domínio de morte (domínio característico de todos os receptores da superfamília dos receptores de morte). Fonte: Modificado de Freund-Michel e Frossard (2008).

(WIESMANN; deVOS, 2001). A seqüência extracelular do receptor é composta de cinco domínios distintos (D1-D5), sendo D5 o responsável pelo acoplamento de NGF (Figura 3) (CHAO, 2003).

A ativação do receptor TrkA por NGF leva à dimerização do receptor e ativação de sua atividade cinase. Cada domínio cinase de ambos monômeros induz a fosforilação de seis resíduos de tirosina do domínio contralateral. Outras tirosinas expressas fora do domínio cinase levam à ativação de três principais vias de sinalização (Figura 4) (HUANG; REICHARDT 2003).

Primeiro, a ativação de TrkA por NGF leva ao recrutamento de fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ) que se liga às tirosinas fosforiladas do receptor e ativa a via de sinalização do fosfolípido de inositol. A fosfolipase atua sobre fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P₂], presente na camada interna da membrana plasmática, gerando dois subprodutos: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Nesta etapa, a rota de sinalização se bifurca. IP₃ se difunde pelo citoplasma e se liga aos canais de cálcio dependentes de IP₃ na membrana do retículo endoplasmático, levando à liberação de cálcio no citoplasma. DAG por sua vez, permanece na membrana e ativa proteína cinase C (PKC). O aumento inicial de Ca²⁺ induzido por IP₃ leva ao deslocamento de PKC do citoplasma para a membrana onde será ativada por DAG. O aumento de Ca²⁺ também leva à ativação da proteína cinase dependente de Ca²⁺ e calmodulina (CaMK). A sinalização através das vias PKC e CaMK pode regular a expressão e/ou atividade de muitas proteínas, incluindo canais iônicos, transportadores e fatores de transcrição (REICHARDT, 2006).

Segundo, a ativação de TrkA pode levar ao recrutamento de outra enzima denominada cinase do fosfatidilinositol 3 (PI3K), a qual induz a formação de fosfatidilinositol 3,4 -bifosfato [PI(3,4)P₂] que por sua vez, promove o recrutamento da proteína cinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1) para a membrana, ativando a proteína cinase B (PKB, também conhecida como Akt). PKB então pode ativar a transcrição gênica por vias dependentes e independentes de MAPK, ou ainda inibir a atividade de BAD (proteína indutora de apoptose) (DUDEK *et al*, 1997; ASHCROFT *et al*, 1999).

Terceiro, TrkA ativado interage com uma série de proteínas adaptadoras (como as Shc, Grb-2 e SOS) que se ligam em cascata a uma proteína reguladora

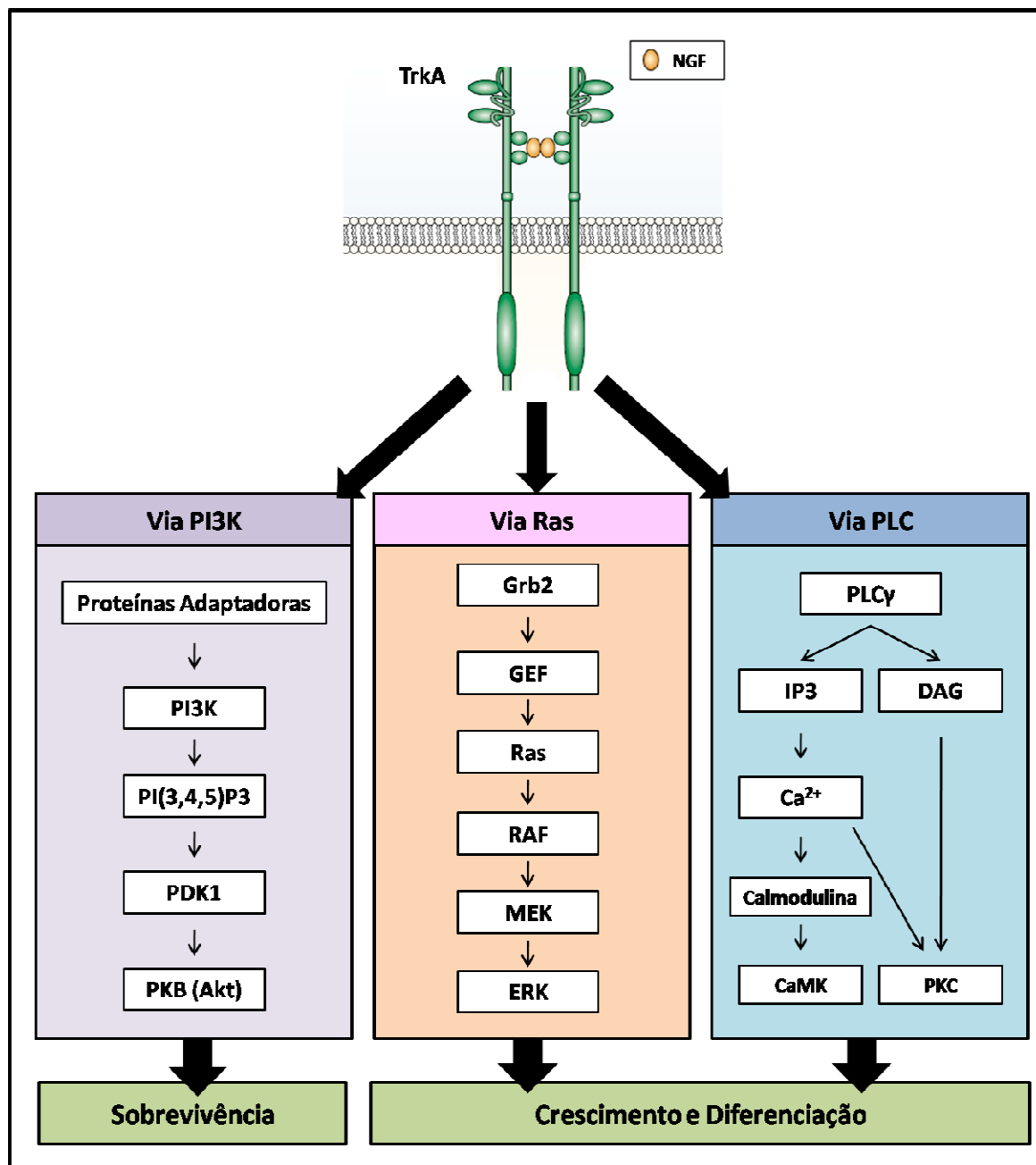


Figura 4. Representação Esquemática das Vias de sinalização mediadas por TrkA – As três principais vias, promovem seus efeitos através da ativação de inúmeras proteínas de sinalização intracelular e segundos mensageiros. PI3K induz a ativação de Akt, levando a sobrevivência. A via Ras leva a ativação de uma série de serinotreoninocinasas (RAF, MEK, ERK) que promovem o crescimento e a diferenciação celular. Outra via de sinalização envolve a ativação de PLCγ e PKC, ou da pequena proteína G Ras que induz a ativação de CaMK, JNK e p38. PI3K = cinase do fosfatidilinositol 3; PI(3,4,5)P3 = fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PDK1 = proteína cinase dependente de fosfatidilinositol; PKB = proteína cinase B; GEF = Fator permutador de nucleotídeo guanina; RAF = Map-cinase-cinase-cinase; MEK = Map-cinase-cinase; ERK = Map-cinase; PLC = Fosfolipase C; IP3 = Inositol 1,4,5-trifosfato; DAG = Diacilglicerol; PKC = Proteína Cinase C; CaMK = Proteína-Cinase dependente de Ca^{2+} ; JNK = c-Jun N-terminal cinase. Fonte: Modificado de Chao (2003).

que ativa Ras, uma GTPase monomérica. A ativação de Ras tem curta duração, e para estimular a proliferação ou diferenciação celular, precisa desencadear um evento de longa duração, que possa manter o sinal e transmiti-lo para o núcleo. A Ras ativada realiza este processo através de uma série de fosforilações de serinotreonino-cinases. Três delas constituem o módulo central da cascata: MAPK (ERK), MAP-cinase-cinase (MEK) e MAP-cinase-cinase-cinase (Raf). Finalmente, esta via leva à ativação de fatores de transcrição envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

B) Receptor p75NTR

O receptor p75NTR é uma glicoproteína de 75 kDa, composta de uma única hélice transmembrana, pertencente à superfamília de receptores para fatores de necrose tumoral (TNFR-SF). Esta superfamília é caracterizada por uma sequência específica intracelular, denominada domínio de morte, por sua habilidade em promover apoptose (Figura 3B) (CHAPMAN, 1995).

A seqüência extracelular de p75NTR contém 4 domínios ricos em cisteína, enquanto a seqüência intracelular é composta de dois domínios principais, o primeiro é um domínio de morte, o qual recruta proteínas adaptadoras que induzem apoptose, e o segundo é um domínio justamembrana, o qual recruta proteínas adaptadoras capazes de induzir vias apoptóticas ou de sobrevivência (ROUX; BARKER, 2002).

Sugere-se que a ligação de NGF leva os dois domínios extracelulares a se aproximarem, permitindo a associação dos domínios intracelulares com proteínas adaptadoras. Seqüencialmente, p75NTR sofre clivagem proteolítica, liberando seu domínio intracelular (ICD) dentro do citoplasma, que por sua vez ativa fatores de transcrição, como NF- κ B através do recrutamento do fator 6 associado ao receptor TNF (TRAR6). ICD pode também migrar para o núcleo e agir ele próprio como um fator de transcrição (SCHECTERSON; BOTHWELL, 2010).

A ativação de p75NTR por NGF desencadeia dois principais efeitos, a indução de apoptose através da ativação de JNK, ou a indução de sobrevivência celular, por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B. A via apoptótica envolve a fosforilação de Bad, p53 e Bax por JNK, induzindo a liberação de citocromo c da mitocôndria e ativação de caspases, em particular, caspase 3 e 9. A ativação de JNK é induzida por três vias principais: recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, síntese de ceramidas e ativação da pequena GTPase monomérica Rac1(ROUX; BARKER, 2002). Já a indução de sobrevivência celular, resulta da ativação de NF- κ B através de três principais vias: pelo recrutamento de TRAF6, com ativação da proteína cinase associada a IL-1 (IRAK), pelo recrutamento de RIP-2, e pela ativação de PI3K e Akt (Figura 5) (PAPA *et al*, 2004).

A indução de apoptose ou sobrevivência por p75NTR dependerá das vias de sinalização ativadas, e também das proteínas adaptadoras ou co-receptores por ele recrutados. Este receptor pode se ligar ao pró-NGF, com uma afinidade maior do que se liga à neurotrofina madura, ativando vias de sinalização apoptótica, em um mecanismo envolvendo o co-receptor denominado sortolina. Além disso, sugere-se que o receptor p75NTR pode formar um complexo com o receptor NogoR. O acoplamento destes dois receptores leva ao recrutamento da GTPase RhoA para o domínio de morte de p75NTR, resultando na regulação do crescimento axonal (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008).

A interação direta entre os receptores p75NTR e TrkA foi sugerida e parece provável que estes receptores se comuniquem através de proteínas adaptadoras compartilhadas e/ou através da convergência de vias de sinalização em cascata (BARKER, 2007).

2.1.5 Endocitose e Transporte Retrógrado

Por meio da injeção de pequenas quantidades de [¹²⁵I]-NGF dentro da câmara anterior do olho de camundongo, pôde-se demonstrar que a neurotrofina era especificamente captada pelos terminais simpáticos que inervavam este órgão,

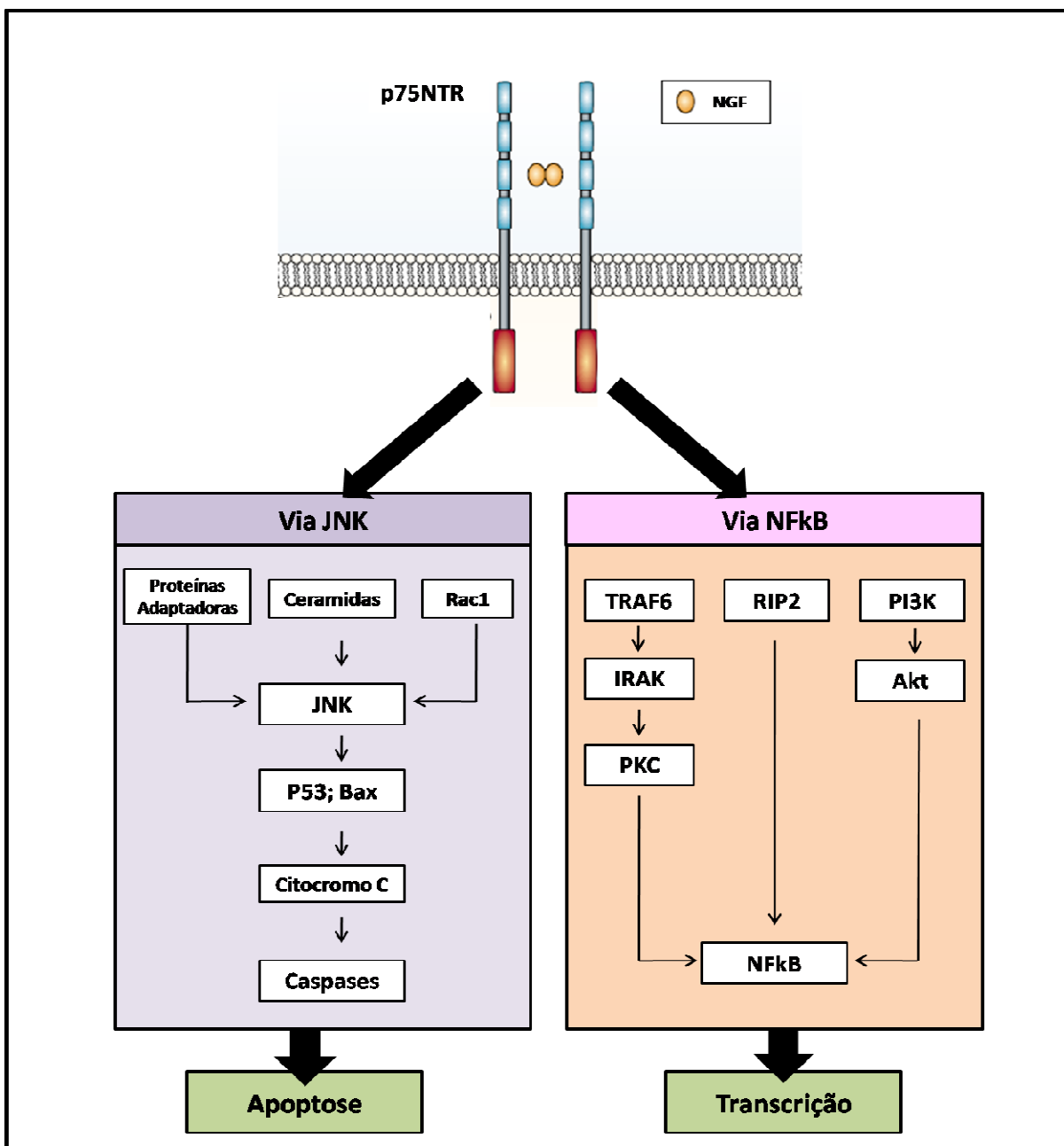


Figura 5. Representação esquemática das vias de sinalização mediadas por p75NTR – À esquerda estão representadas algumas das principais vias pró-apoptóticas. JNK exerce um papel central na apoptose mediada por p75NTR. JNK pode ser ativado por proteínas adaptadoras, após a ativação da síntese de ceramidas e esfingomielinas ligadas à membrana, ou após a ativação da pequena proteína G Rac1. Uma vez ativado JNK leva a ativação de fatores pró-apoptóticos que induzem a liberação de citocromo C mitocondrial e conseqüente indução de apoptose. À direita, estão representadas as vias de sinalização pró-sobrevivência, onde o fator de transcrição NFκB exerce um papel central. Este fator pode se ativado pela proteína adaptadora TRAF6, levando ao recrutamento de IRAK e ativação de uma isoforma atípica de PKC; pela proteína adaptadora RIP2; ou ainda pela ativação de PI3K e Akt. Uma vez ativado por fosforilação NFκB migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes envolvidos na sobrevivência celular. Fonte: Modificado de Chao (2003).

internalizada e transportada intraaxonalmente para o soma localizado no gânglio cervical superior ipsilateral. O gânglio contralateral, o qual servia como um controle interno, continha significativamente menos radioatividade (HENDRY *et al*, 1974).

A partir de então, verificou-se que após a sua secreção, o NGF se liga aos seus receptores de membrana plasmática e pode eliciar seus efeitos permanecendo na superfície celular ou alternativamente entrando em neurônios responsivos, através de endocitose mediada por receptor. A vesícula endocítica carregando o complexo NGF e receptor pode então ser subsequente transportada de maneira retrógrada para o corpo celular – o que é estritamente necessário para algumas das funções deste fator neurotrófico em células-alvo (LEVI-MONTALCINI, 1987).

A sobrevivência celular induzida por NGF pode ser desencadeada unicamente por aqueles receptores TrkA que se mantêm na superfície celular, entretanto para ocorrer o processo de diferenciação no mesmo tipo celular, se faz necessária a internalização do complexo NGF-receptor (ZHANG *et al*, 2000).

Estes efeitos divergentes da endocitose sobre a diferenciação e sobrevivência indicam que os receptores localizados na membrana plasmática e aqueles localizados no interior de endossomos ativam de maneira distinta uma mesma via de sinalização. Sugere-se que a sinalização mediada por receptores que permanecem na membrana esteja relacionada com um grupo de respostas rápidas, enquanto, efeitos de crescimento em longo prazo resultam da internalização de NGF e posterior interação com o genoma (MARCHISIO *et al*, 1981).

A internalização e tráfego intracelular dos receptores TrkA desempenham dois papéis importantes – primeiro, trazem o receptor ativado para as proximidades de certos compartimentos celulares, como o núcleo, onde a sinalização é requerida para permitir respostas celulares específicas; e segundo, transportam receptores TrkA ativados para compartimentos membranosos, onde efetores de sinalização estão concentrados (DELCROIX *et al*, 2003).

A endocitose e transporte axonal constituem características importantes da sinalização do receptor TrkA, mas os mecanismos responsáveis por estes processos permanecem controversos, uma vez que muitos modelos foram propostos. Dentre eles destacam-se, a endocitose dependente de clatrina, macroendocitose

dependente da proteína pincher e a endocitose mediada por caveolina (Figura 6) (ZWEIFEL; KURUVILLA; GINTY, 2005).

Uma grande parte dos receptores TrkA internalizados não é transportada retrogradamente, sendo marcada para degradação em lisossomos ou entregue a endossomos de reciclagem (CHEN *et al*, 2005).

Receptores TrkA internalizados que não são marcados para degradação ou reciclagem, podem induzir a ativação de vias de sinalização local que participam no crescimento axonal, em particular as vias ERK1/2 e PI3K. Ou ainda, podem migrar dentro de endossomos ao longo do axônio para o núcleo celular, por meio de um mecanismo dependente de proteínas motoras associadas a microtúbulos (Figura 7). No núcleo, outras vias de sinalização são ativadas, em particular uma nova isoforma de MAPK, a ERK5, levando à ativação de fatores de transcrição, os quais participam da sobrevivência celular (SORKIN; VON ZASTROW, 2002).

Pouco é conhecido sobre o tráfego intracelular de p75NTR. Este receptor parece ser importante na internalização e transporte retrógrado de outras neurotrofinas como BDNF e NT3, mas não exerce qualquer influência sobre a endocitose e transporte retrógrado do NGF em neurônios periféricos (FREUND-MICHEL; FROSSARD, 2008). Contudo, em células PC12 a ativação de p75NTR por NGF induz a internalização dependente de clatrina, embora três vezes menor que a internalização de TrkA. Ademais, os endossomos primários formados não se fundem com lisossomos, em vez disto, eles se tornam endossomos de reciclagem, conduzindo p75NTR reciclado à membrana celular. Por outro lado, a internalização de p75NTR induz o recrutamento de proteínas adaptadoras para os endossomos iniciais, sugerindo a formação de endossomos de sinalização, mas espacial e temporalmente diferentes daqueles para TrkA (ZWEIFEL; KURUVILLA; GINTY, 2005).

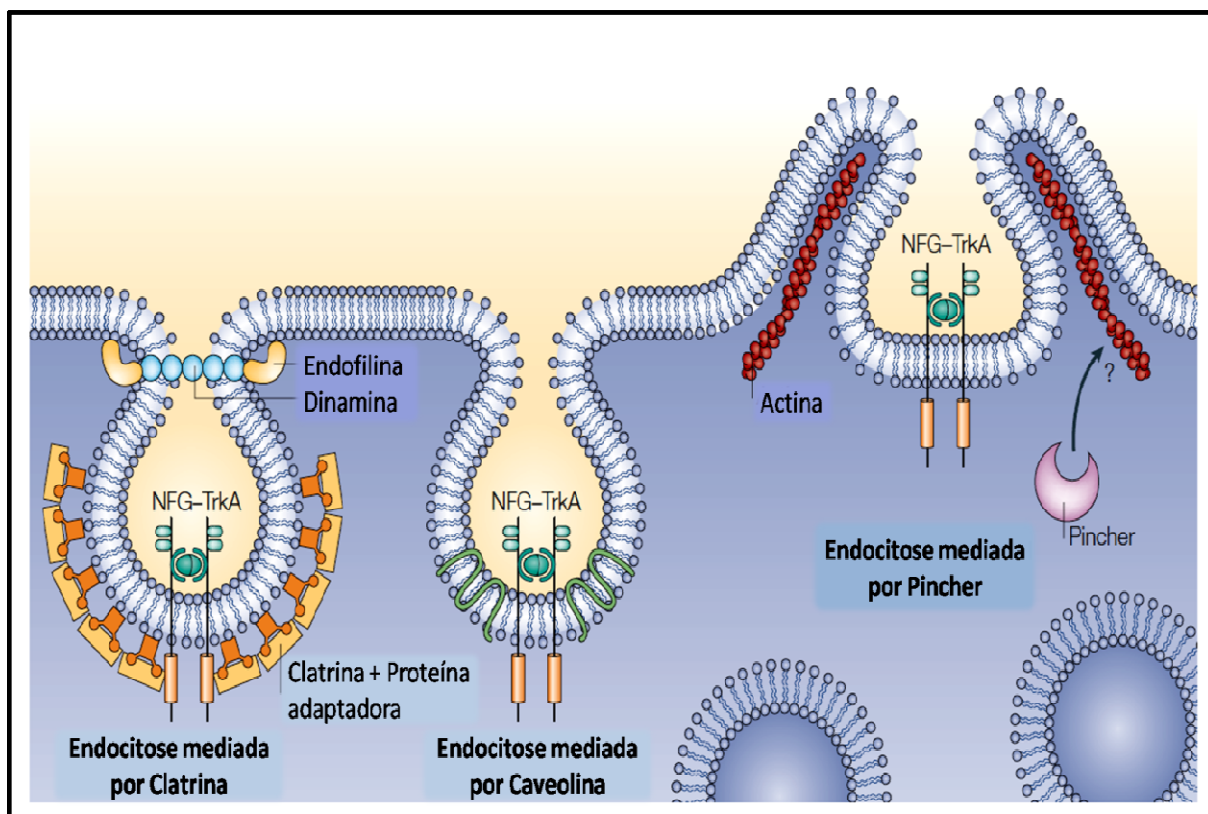


Figura 6. As possíveis formas de internalização do NGF acoplado ao seu receptor TrkA – O complexo NGF-TrkA pode ser internalizado por três vias diferentes. Existem fortes evidências de o complexo possa ser internalizado através de processos dependentes de clatrina/dinamina. O receptor TrkA também foi localizado em domínios semelhantes à cavéolos em células PC12. Outro mecanismo, pinocitose mediada pela nova proteína Pincher foi identificado em células PC12 e culturas primárias de neurônios simpáticos. Como a sinalização do receptor TrkA modula essas vias permanece não esclarecido. Fonte: Adaptado de Zweifel, Kuruvilla e Ginty (2005).

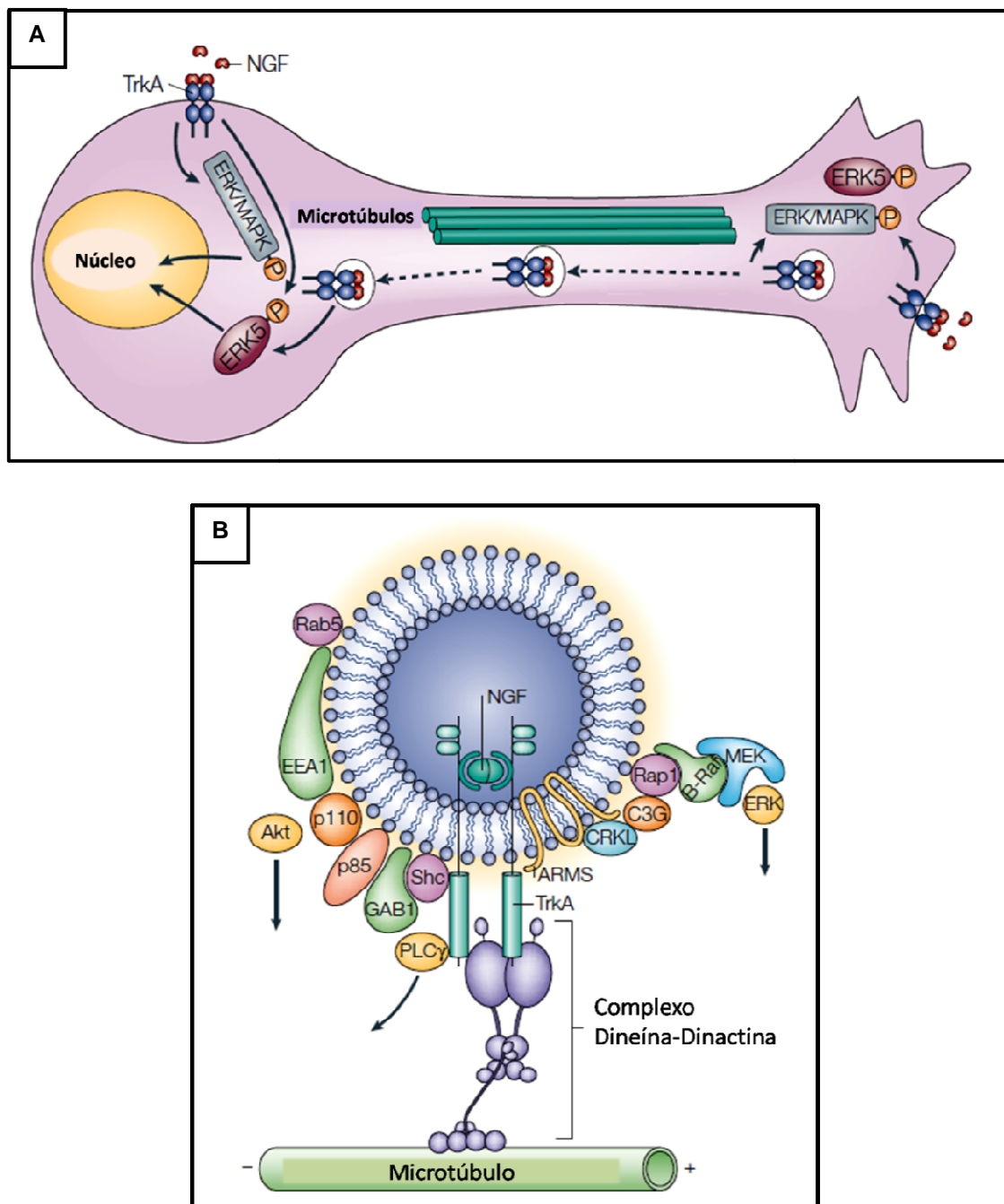


Figura 7. Transporte retrógrado e endossomos de sinalização. (A) A aplicação de NGF no corpo celular de neurônios sensoriais leva a ativação de ERK1/2 e ERK5, as quais são translocadas para o núcleo e regulam a expressão gênica. A aplicação de NGF nos axônios distais também leva a ativação de ERK1/2 e ERK5 nesta região, entretanto leva a ativação apenas de ERK5 no corpo celular por um mecanismo dependente de endocitose e transporte retrógrado baseado em microtúbulo. Fonte: Sorkin e Von Zastrow (2002). (B) Os endossomos de sinalização constituem plataformas para uma série de efetores de sinalização, os quais são essenciais para a ativação de vias de sinalização em cascata e transporte retrógrado. PI3K = Fosfatidilinosil 3-cinase; ERK = protein cinase ativada por mitógeno; PLC = Fosfolipase C; EEA1 = antígeno 1 de endossomo inicial; ARMS = proteína integral de membrana rica em anquirina. Fonte: Adaptado de Zweifel, Kuruvilla e Ginty (2005).

2.1.6 Modulação da transmissão sináptica

Os efeitos tróficos das neurotrofinas ocorrem geralmente em longos períodos, no decurso de horas ou dias. Em contrapartida, quando acontece uma rápida variação local na concentração destes fatores, a transmissão e plasticidade sináptica podem ser influenciadas dentro de minutos. Cascatas de sinalização envolvendo cinases e proteínas efetoras são ativadas imediatamente após a ligação dos fatores neurotróficos aos neurônios. Essas atividades citosólicas podem levar a alterações imediatas da função neuronal (HEUMANN, 1994).

Embora exista um conhecimento amplo sobre os mecanismos pelos quais as neurotrofinas desencadeiam seus efeitos clássicos (LEVI-MONTALCINI, 1987), a compreensão de como estes fatores tróficos regulam de forma aguda a transmissão sináptica é relativamente menor.

A primeira evidência para aumento da transmissão sináptica mediado por neurotrofinas é proveniente de um estudo em culturas de junções neuromusculares de *Xenopus laevis*. Após a aplicação de BDNF e NT-3, tanto a liberação de neurotransmissor basal quanto a estimulada foram potencializadas. A adição destas neurotrofinas resultou em aumento da frequência, mas não da amplitude de correntes sinápticas espontâneas, sugerindo que estes fatores neurotróficos exercem seus efeitos através do aumento da liberação do neurotransmissor (LOHOF *et al*, 1993 *apud* STOOP; POO, 1996).

Com base nestes dados, tanto os efeitos crônicos quanto os efeitos a curto-prazo das neurotrofinas sobre a liberação de neurotransmissores começaram a ser investigados (BLOCHL; SIRRENBURG, 1996). Atualmente existe um número significativo de trabalhos mostrando que ambos NGF e BDNF têm potentes efeitos sobre a liberação de neurotransmissores (NUMAKAWA *et al*, 2003; RAITERI *et al*, 2003).

NGF foi aplicado em diferentes áreas do SNC e mostrou um efeito significativo sobre a liberação de neurotransmissores (Tabela 1). Apenas, a liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA), parece não ser afetada (SALA *et al*, 1998; HUH *et al*, 2008).

Tabela 1 – Liberação de neurotransmissores induzida por NGF em diferentes modelos experimentais

NEUROTRANSMISSOR	ÁREA/MODELO	ANIMAL	REFERÊNCIA
Acetilcolina	Sinaptossomos do Córtex Visual	Rato Jovem	Sala et al, (1998)
	Cultura de Neurônios do Prosencéfalo Basal	Embrião de Rato	Auld, Mennicken e Quirion (2001)
	Cultura de Neurônios do Prosencéfalo Basal	Rato recém-nascido	Huh et al, (2008)
Dopamina	Culturas neuronais mesencefálicas	Embrião de Rato	Blöchl e Sirrenberg (1996)
	Formação Hipocampal	Rato Adulto	Paredes; Granholm; Bickford (2007)
Glutamato	Sinaptossomos do Córtex Visual	Rato Jovem	Sala et al, (1998)
	Cultura de Neurônios Cerebelares	Rato recém-nascido	Numakawa et al, (2003)
	Sinaptossomos do Córtex Visual	Rato Jovem	Raiteri et al, (2003)
	Formação Hipocampal Microdialise	Rato Adulto	Paredes; Granholm; Bickford (2007)
	Cultura de Neurônios do Prosencéfalo Basal	Rato recém-nascido	Huh et al, (2008)

2.2 RETINA

A retina é considerada parte do sistema nervoso central, e pode ser caracterizada como uma fina camada de tecido nervoso responsável pela conversão de energia luminosa em atividade neural (LENT, 2010).

A retina dos vertebrados é composta de aproximadamente 50-60 tipos celulares diferentes, agrupados em sete classes principais: bastonetes, cones, células horizontais, células bipolares, células amácrinas, células ganglionares (RGC) e glia de Müller (DONOVAN; DYER, 2005).

A regulação da sobrevivência e proliferação destas células, como em outras áreas do sistema nervoso em desenvolvimento, depende amplamente de sinais extracelulares. Dentre as moléculas sinalizantes, as neurotrofinas e o neurotransmissor excitatório glutamato exercem um papel decisivo no destino das células retinianas (FRADE; BOVOLENTA; RODRÍGUEZ-TÉBAR, 1999; BODNARENKO; JEYARASASINGAM; CHALUPA, 1995).

2.2.1 Fator de Crescimento do Nervo

O NGF e seus receptores estão localizados em numerosas áreas do sistema visual, desde a retina até o córtex visual. Na retina, o NGF pode exercer múltiplos efeitos sobre diferentes tipos celulares, incluindo proliferação, crescimento de neuritos e mudanças no citoesqueleto, bem como, transmissão e plasticidade sináptica (HALLBÖÖK *et al*, 1996; CHAUM, 2003).

Existem duas fontes principais de NGF no tecido retiniano: o transporte retrógrado a partir do colículo superior e a síntese local. Esta última pode ser realizada por células ganglionares, bipolares, amácrinas, epitélio pigmentar, bem como por células gliais, incluindo as células de Müller (CHAUM, 2003; AGARWAL *et al*, 2007). Adicionalmente, existem evidências de que o NGF é sintetizado por

células microgliais que migram para a retina em desenvolvimento e o apresentam para neurônios, induzindo a morte celular via p75NTR, em células que não expressam TrkA (FRADE; BARDE, 1998).

As primeiras evidências para a expressão de uma via NGF/receptor na retina surgiram de estudos independentes em retina de aves e ratos em desenvolvimento (AYER-LELIEVRE *et al*, 1983; EBENDAL; PERSSON, 1988; HALLBÖÖK *et al*, 1996). Atualmente, é bem estabelecido que os receptores de NGF são expressos por diferentes tipos celulares de animais em desenvolvimento e adultos (Tabela 2). Ademais, as células ganglionares da retina não somente expressam seus receptores como também transportam NGF de uma maneira retrógrada e anterógrada ao longo de seus axônios (MICERA *et al*, 2004).

Vários estudos conduzidos em retina adulta mostram que células de Müller expressam o receptor p75NTR, mas este mesmo receptor em RGC de animais adultos não foi encontrado até o presente. Esta ausência ou expressão limitada de p75NTR em células ganglionares maduras está de acordo com a observação geral, de que este receptor exerce um papel proeminente na morte celular, durante o período de desenvolvimento embrionário, mas é notavelmente regulado de forma negativa em muitos tipos celulares neuronais, uma vez que eles tenham alcançado seus alvos finais (YAN; JOHNSON, 1988).

2.2.2 Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório na retina, usado na transmissão de sinais visuais por fotorreceptores, células bipolares e ganglionares (BRINGAMANN *et al*, 2009). Além do seu papel como neurotransmissor, também está envolvido na sobrevivência neuronal durante os estágios de desenvolvimento da retina (BODNARENKO; JEYARASASINGAM; CHALUPA, 1995). Após ser liberado por exocitose na fenda sináptica, o glutamato ativa seus receptores ionotrópicos para uma rápida neurotransmissão excitatória, e seus receptores metabotrópicos para respostas moduladoras mais lentas na transmissão.

Tabela 2 – Expressão dos receptores de NGF na retina de diferentes espécies em estágios de desenvolvimento e durante a vida adulta.

RECEPTOR	TIPO CELULAR	ESTÁGIO	ANIMAL	CONDIÇÕES	REFERÊNCIA
TrkA	Amácrinas e horizontais	Embrião	Galinha	Normal	Karlsson et al, (2001)
	RGC	Adulto	Rato	Injúria	Cui et al, (2002)
	Astróctios	Adulto	Porco e humano	Normal	Ruiz-Ederra et al, (2003)
	NFL e GCL	Adulto	Porco	Normal	García et al, (2003)
	RGC	Adulto	Rato	Hipertensão ocular	Rudzinski, Wong e Saragovi (2004)
	RGC	Adulto	Rato	Normal	Agarwal et al, (2007)
	RGC	Adulto	Camundongo e rato	Injúria	Lebrun-Julien et al, (2009)
p75NTR	Provável RGC	Embrião	Camundongo	Normal	Frade e Barde (1998)
	Células de Müller	Embrião	Rato	Normal	Ding et al, (2001)
	Células de Müller	Adulto	Porco	Normal	García et al, (2003)
	Células de Müller	Adulto	Camundongo e rato	Normal/Injúria	Lebrun-Julien et al, (2009)
	RGC	Embrião	Galinha	Normal	Morilo et al, (2010)

Para finalizar a ação do glutamato e manter sua concentração extracelular abaixo de níveis excitotóxicos, transportadores dependentes de Na^+ de alta afinidade (transportadores de aminoácidos excitatórios, EAATs), localizados na membrana plasmática de neurônios e células gliais, removem rapidamente o glutamato do espaço extracelular (SLOTBOOM *et al*, 1999).

Até o presente, cinco subtipos de EAAT foram clonados: GLAST/EAAT1 (*Glutamate and Aspartate Transporter* – SLC1A3), GLT-1/EAAT2 (*Glutamate Transporter 1* – SLC1A2), EAAC1/EAAT3 (*Excitatory Amino Acid Carrier 1* – SLC1A1), EAAT4 (SLC1A6), e EAAT5 (SLC1A7) (DANBOLT, 2001).

GLAST e GLT-1 estão localizados primariamente nas células da glia, enquanto que EAAC1 é expresso em neurônios. EAAT4 e EAAT5 são expressos de forma específica nas células de Purkinje e fotorreceptores, respectivamente. Na retina, GLAST (Figura 8a) constitui o principal transportador, localizado nas células da glia de Muller (BRINGMANN *et al*, 2009).

Embora o papel das células gliais no metabolismo de glutamato esteja principalmente associado com a captação do neurotransmissor (BRINGMANN *et al*, 2009), estas células podem ter uma participação ativa na liberação de glutamato, modulando a atividade dos neurônios adjacentes. Por exemplo, diferentes mecanismos de liberação do neurotransmissor foram atribuídos aos astrócitos, incluindo transporte reverso por transportadores dependentes de Na^+ , pela abertura de canais iônicos ativados por volume, exocitose dependente de Ca^{2+} , através do trocador cistina-glutamato ou ainda por hemicanais que tiveram suas conexões enfraquecidas (MALARKEY; PARPURA, 2008).

Dentre estas vias de liberação, destaca-se o papel do transportador independente de Na^+ , o trocador cistina-glutamato (sistema Xc- Figura 8b), pela sua importância na produção do antioxidante glutatona (GSH) (McBEAN, 2002). O sistema Xc- medeia normalmente a captação de cistina com o antiporte de glutamato. A cistina por sua vez, será usada para a produção de GSH.

Uma vez que, Xc- capta cistina utilizando o gradiente transmembrana de glutamato, esse transportador pode também captar glutamato de maneira independente de Na^+ , quando a concentração extracelular deste neurotransmissor estiver alta (BRINGMANN *et al*, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2010).

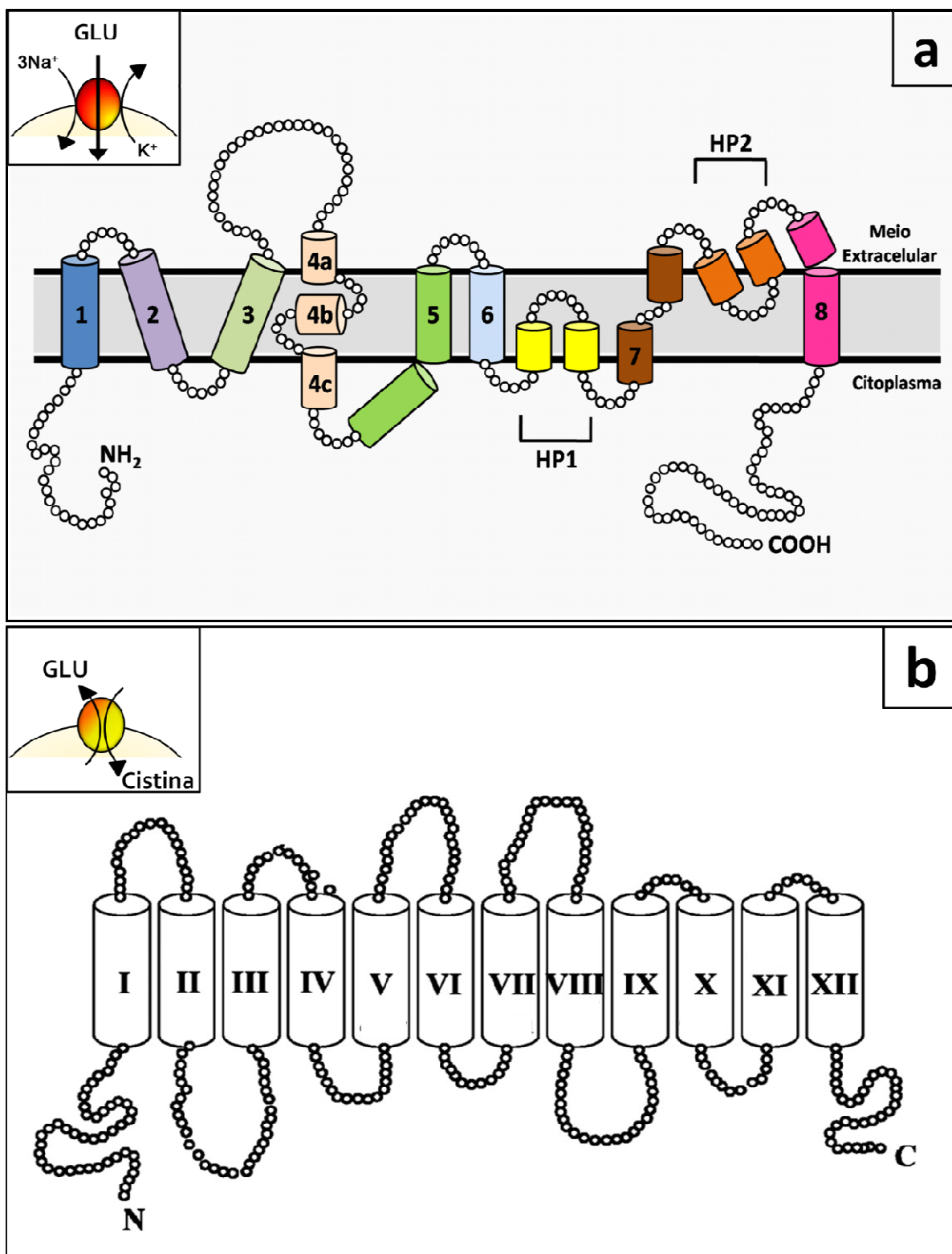


Figura 8 – Transportadores de Glutamato. (A) Transportador dependente de Na^+ . Transportador de glutamato/aspartato (GLAST). Este modelo topológico é baseado na estrutura do transportador de aspartato procariótico, Glt-Ph (Yernool *et al*, 2004). Fonte: Autoria própria. (B) Transportador Independente de Na^+ . Modelo topológico do Trocador cistina-glutamato (sistema Xc-). Fonte: Modificado de Jiménez-Vidal *et al*. (2004).

2.2.3 Compostos Tióis

O enxofre ocorre de maneira estável em vários estados de oxidação, os quais o tornam um componente versátil nos sistemas biológicos. A forma mais reativa e reduzida do enxofre em biomoléculas é o tiol ($-SH$), presente na molécula de cisteína. Este aminoácido é encontrado no sítio ativo de muitas proteínas e em motivos estruturais que podem atuar na regulação enzimática, tráfego de proteínas e controle da expressão gênica (MORIARTY-CRAIGE; JONES, 2004).

Tióis são centrais em muitas reações químicas e farmacológicas e estão entre os compostos mais facilmente metabolizados, sendo oxidados por metais de transição ou participando da troca tiol-dissulfeto (WLODEK, 2002).

Em adição a atividade de enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase, os tióis constituem um eficiente sistema de defesa antioxidante. Este sistema é fundamental para equilibrar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), formadas durante o metabolismo celular normal. Quando há superprodução destas espécies e/ou deficiência na atividade antioxidante, inicia-se o processo de estresse oxidativo (VALKO *et al*, 2007).

A resposta ao estresse, com frequência envolve mudanças no conteúdo tiol celular, o qual é consumido em reações que removem os compostos deletérios. Os biotióis protegem as células contra os danos induzidos por radicais livres, mas para que isto ocorra de forma eficiente, uma interação entre o controle redox extracelular e o controle redox intracelular deve acontecer (WLODEK, 2002).

Dois principais sistemas mantêm o estado redox tiol/dissulfeto celular: GSH e tioredoxina (Trx). Esses sistemas são complementares e eventualmente apresentam atividades similares. GSH é um tripeptídeo tiol de baixo peso molecular presente em concentrações milimolares nas células, enquanto que Trx é uma pequena proteína ditiol encontrada em concentrações micromolares (MORIARTY-CRAIGE; JONES, 2004).

A GSH é considerada o composto tiol não-protéico mais abundante em todas as espécies aeróbias. Está distribuída de forma predominante no meio

intracelular em concentrações relativamente altas. Enquanto que sua concentração extracelular é geralmente de três a quatro vezes menor (WANG; BALLATORI, 1998).

Na retina, a glutatona exerce um papel antioxidante fundamental, dado que, esta região do SNC está continuamente exposta a taxas variadas de intensidade luminosa, tornando-se vulnerável à oxidação. Além da constante exposição à irradiação, a retina tem alta atividade metabólica, com grande consumo de oxigênio, e conteúdo elevado de ácidos graxos insaturados. Isto contribui ainda mais para a formação de ERO (HANDELMAN; DRATZ, 1986). Estes fatores demonstram a necessidade de mecanismos de proteção por antioxidantes contra a injúria oxidativa no tecido retiniano.

De fato, a retina possui quantidades significativas de GSH e estudos imunocitoquímicos, mostraram que grande parte do tripeptídeo está presente nas células gliais de Müller e em células horizontais (SCHUTTE; WERNER, 1998). Enquanto outros neurônios retinianos mostraram um nível muito baixo de GSH. Assim, em condições patológicas, a glia de Müller pode fornecer GSH para os neurônios, sugerindo que as mesmas participam ativamente na proteção neuronal (KANNAN *et al*, 2001).

Sistemas de transporte dependente e independente de Na⁺ foram recentemente implicados no efluxo de GSH em cultura de retina embrionária de galinha. De maneira dependente de Na⁺, a glutatona pode ser liberada por GLAST, com o antiporte de glutamato (GARCIA *et al*, 2011). Mas, a participação de um sistema independente de Na⁺ também foi sugerida na liberação de GSH. Visto que, a própria cisteína pode funcionar como substrato para Xc⁻, é possível que esta propriedade favoreça uma troca cistina-GSH (OLIVEIRA *et al*, 2010).

Observou-se que tanto os níveis de glutamato, relacionados à atividade de GLAST, quanto os níveis celulares de GSH são suscetíveis a regulação mediada por fatores tróficos (GAMBOA; ORTEGA, 2002; DELYFER *et al*, 2005; DRINGEN, 2000). Contudo, até o presente a influência de NGF nos níveis destes compostos não foi analisada na retina. Considerando-se o papel do glutamato durante o desenvolvimento retiniano, torna-se importante investigar o efeito de fatores que regulem a liberação deste neurotransmissor na ontogenia retiniana, bem como, de compostos que protejam o tecido do eventual estresse oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do NGF sobre o transporte de glutamato e tióis em tecido retiniano de embrião de galinha.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o efeito do tratamento com NGF, em diferentes concentrações e tempos de incubação, sobre os níveis extracelulares de glutamato.
- Verificar o efeito do tratamento com NGF, em diferentes concentrações e tempos de incubação, sobre os níveis extracelulares de compostos tióis.
- Averiguar se o efeito de NGF sobre o transporte de glutamato é dependente de Ca^{2+} .
- Investigar se o efeito de NGF sobre o transporte de glutamato e tióis é mediado por GLAST.
- Analisar se o transporte de glutamato e tióis é mediado por um sistema de transporte independente de Na^+ .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO TECIDO RETINIANO DE EMBRIÃO DE GALINHA

Utilizamos como modelo experimental, tecido retiniano de embrião de galinha, como descrito previamente (SAMPAIO; PAES-DE-CARVALHO, 1998). Os ovos Leghorn foram doados por uma empresa local (Makaru Indústria Comércio e Representações LTDA – Ananindeua-PA) e datados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Os embriões foram utilizados entre os dias 10 e 11 de desenvolvimento (E10/11), dentro do período em que ocorre o ponto máximo de atividade neurotrófica na retina (E10-E12), como observado em “explantes” retinianos de embrião de galinha por Ary-Pires et al. (1997).

Os embriões foram colocados em placa de petri, com meio de dissecação livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (CMF), posteriormente decaptados, e os olhos enucleados. Os globos oculares foram abertos na região anterior, possibilitando primeiramente a retirada do cristalino, seguido pelo humor vítreo. O tecido retiniano foi isolado cuidadosamente e submetido a diferentes tratamentos.

4.2 TRATAMENTOS

O tecido retiniano íntegro foi incubado com NGF 2.5 S (10, 50 e 100 ng/ml) diluído em solução de Hank (NaCl 128 mM, KCl 4 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2 mM, Glicose 12 mM e HEPES 20 mM). A escolha das concentrações foi baseada em trabalhos anteriores que mostram um aumento da liberação de glutamato induzido por NGF nas três concentrações (SALA *et al*, 1998; NUMAKAWA *et al*, 2003).

As incubações foram realizadas em placas de cultura mantidas em estufa

ambientada com 5% de CO₂ a 37 °C por 15, 30 ou 120 min.

A solução de Hank foi eventualmente alterada em ensaios cujas dependências de íons Na⁺ e Ca²⁺ foram verificadas. Para análise de transporte dependente de Na⁺, o NaCl foi substituído de forma equimolar por LiCl (128 mM). Enquanto que para análise da liberação vesicular de glutamato, CaCl₂ foi omitido da solução de Hank, e 2mM de ácido etilenoglicol tretracético (EGTA) foram adicionados ao tampão, com isso retirando-se o Ca²⁺ residual do sistema. Para o bloqueio de GLAST, as retinas foram incubadas em meio contendo Sulfato de Zinco (ZnSO₄) 100 µM.

Ao final de cada tratamento, o meio de incubação total foi retirado (1 ml), centrifugado e utilizado para a medida de compostos tióis e glutamato. O tecido retiniano foi dissociado em 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS - *Phosphate Buffered Saline*), para ensaios de quantificação de tióis intracelulares e dosagem de proteína.

4.3 MEDIDA DOS NÍVEIS DE GLUTAMATO

A quantificação dos níveis extracelulares de glutamato foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE), a qual nos permite realizar a separação individual dos diversos constituintes de uma determinada amostra. Resumidamente, a amostra é introduzida na coluna cromatográfica preenchida com uma fase estacionária, e um solvente (fase móvel) é bombeado com vazão constante e desloca os componentes da mistura através da coluna. Os constituintes se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades, e ao sair da coluna, passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma.

4.3.1 Instrumentação e Condições cromatográficas

Foi utilizado Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba (LC20-AT), detector de fluorescência (RF-10AxI), degaseificador (DGA-20A5), módulo comunicador (CBM-20A), injetor de amostras *Rheodyne* com alça de injeção de 20 µL, coluna cromatográfica (Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm), um sistema de aquisição de dados *LC-Solution*, e uma microseringa de 50 µl (*Hamilton*),

Adotou-se um sistema CLAE, apresentando fase móvel com gradiente composto por Fase A e Fase B. A corrida começa com fase móvel composta por 100% de Fase A, alcançando a relação 70% A/ 30% B em 10 min de corrida, 50% A/ 50% B em 20 min e novamente 100% de Fase A em 25 minutos.

Foram adotados desde o início dos testes os comprimentos de onda de excitação em 340 nm e emissão em 460 nm. A vazão de fase móvel utilizada foi de 1 ml/min e tempo total dos cromatogramas de 25 min.

4.3.2 Reagentes e Soluções Analíticas

Em todos os experimentos utilizou-se água ultrapura (Sistema Mili-Q Milipore, USA) e metanol grau CLAE. Foi preparada uma solução analítica estoque de ácido glutâmico, e homoserina (padrão interno) 1000 mg/ml (Sigma, Alemanha, pureza 98%). As soluções utilizadas em todos os experimentos em CLAE são mostradas em detalhe na tabela 3.

Tabela 3 – Soluções utilizadas em CLAE

SOLUÇÃO	REAGENTES	QUANTIDADE
TAMPÃO ACETATO pH 5.67	Acetato de Sódio	2,05 g para 0,5 L
FASE A	Tampão Acetato pH 5.67	95%
	Metanol	5%
	Álcool Isopropílico	12,3 ml para 1L
FASE B	Metanol	70%
	Água ultrapura	30%
SOLUÇÃO DERIVATIZANTE	Orto-ftaldeído (OPA)	13 mg
	N-acetil-cisteína	16,3 mg
	Metanol	300 µL
TAMPÃO BORATO pH 9.5	Ácido Bórico 0,1 M	60 ml
	NaOH 1M	40 ml

4.3.3 Preparo das Amostras e Procedimento de Derivatização

Ao final de cada tratamento do tecido retiniano, foram retirados 500 μ l do meio total de incubação para a dosagem de glutamato.

Primeiramente, as proteínas presentes no meio foram precipitadas com a adição de 20 μ l de Ácido Tricloroacético (TCA) 1% aos 500 μ l de amostra. Em seguida, esta mistura foi homogeneizada em agitador *vortex* e centrifugada a 5000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de plástico que foram mantidos em -20 °C até o momento das análises.

Para a quantificação de glutamato, 300 μ l do sobrenadante foram misturados a 20 μ l de homoserina e agitados em seguida. Desta mistura, 60 μ L foram diluídos em 40 μ L de tampão borato e 5 μ L de solução derivatizante. Em seqüência, esta segunda mistura foi agitada e ao final de 5 min de reação, com auxílio de uma seringa *Hamilton*, 40 μ L foram injetados no cromatógrafo.

A quantificação de glutamato através deste procedimento é possível pelo fato da solução derivatizante conter OPA que reage com grupos aminos primários de certos compostos, na presença de grupamento tiol (N-acetil-cisteína), que em meio alcalino gera um produto fluorescente chamado isoindol. Em nossos experimentos, a homoserina foi utilizada como um padrão-interno com o intuito de melhorar a precisão e exatidão da análise.

4.3.4 Quantificação de Glutamato e Curva de Calibração

Estabelecemos uma curva de calibração única, com as mesmas soluções-estoque de glutamato e homoserina utilizadas para a dosagem de glutamato nas amostras.

Para elaboração da curva, foram utilizadas concentrações crescentes de glutamato (6.25, 12.5; 25 e 50 μ M) submetidas ao mesmo processo de preparo das

amostras e procedimento de derivatização. Os cálculos para a quantificação de glutamato foram feitos com base na altura do pico e através da equação da reta obtida com a curva de calibração.

4.4 MEDIDA DOS NÍVEIS DE COMPOSTOS TIÓIS

Os níveis de compostos tióis foram determinados por ensaio colorimétrico com o reagente de Ellman (ELLMAN, 1959 *apud* OWENS; BELCHER, 1965), o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB).

Para a quantificação de tióis livres, partimos do princípio que grupamentos sulfidríla (-SH) possuem a capacidade de reduzir DTNB para ácido nitrobenzóico (TNB), um composto de coloração amarela que pode ser quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm (OWENS; BELCHER, 1965).

O Método utilizado consiste em construir uma curva-padrão com concentrações crescentes de um composto tiol (glutathiona ou cisteína) como base para cálculo dos valores obtidos nas amostras.

Para medição de compostos tióis extracelulares, ao final de cada tratamento, o meio de incubação foi retirado e centrifugado a 5000 rpm durante 10 min. Para quantificação de tióis intracelulares, após a retirada do meio de incubação, as retinas foram dissociadas mecanicamente em 1 ml de PBS. Em seguida, foram submetidas a um aparelho sonicador por 5 seg – para o rompimento de membranas – e centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min.

De ambos sobrenadantes (provenientes do meio de incubação e tecido), 100 µl foram retirados e adicionados em tubos contendo 800 µl de PBS/EDTA 1 mM e 100 µl do reativo DTNB 5mM. Após 5 minutos de reação as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e calculadas de acordo com a equação da reta obtida pela curva-padrão.

4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Os valores de glutamato e tióis quantificados no meio de incubação foram corrigidos pela concentração de proteínas da amostra. Resumidamente, o valor final de glutamato e tiol, presente no meio de incubação de uma determinada retina, foi dividido pelo valor final de proteína presente nesta mesma retina. Este procedimento nos permite obter um valor de glutamato e tiol correspondente ao número de células presente na amostra.

A quantificação de proteínas dos tecidos retinianos, foi obtida através do método descrito anteriormente por Bradford (1976). O corante Azul Brilhante de Comassie presente no reativo de Bradford se liga a resíduos carregados positivamente em proteínas, resultando em um complexo que possui um máximo de absorvância diferente do corante livre.

Em cada experimento, após a retirada de todo o meio de incubação, as retinas foram dissociadas mecanicamente em 1 ml de PBS, e deste conteúdo 100 µl foram diluídos em 300 µl de água destilada e 100 µl de NaOH 1 N. Desta segunda diluição, 100 µl foram adicionados em tubos contendo água destilada (100 µL). Em seguida, 2 ml do reativo de revelação (Azul Brilhante Comassie G-250 dissolvido em etanol 95% e ácido fosfórico 85%) foram adicionados, e ao final de 2 min de reação e agitação os conteúdos foram determinados por espectrofotometria em 595 nm.

Os valores de proteína foram calculados a partir da equação da reta obtida por uma curva-padrão previamente estabelecida com diferentes concentrações de Albumina Bovina Sérica (BSA).

4.6 MEDIDA DOS NÍVEIS DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A lactato desidrogenase (LDH) é um enzima solúvel que é liberada para o meio circundante após a perda da integridade da membrana plasmática, resultante de eventos de morte celular. A enzima LDH está presente em todas as células e a sua atividade pode ser determinada pelo fato de que LDH oxida lactato à piruvato o qual reage com o sal tetrazolium. O resultado desta reação é um composto denominado azul de formazan, que pode ser medido por espectrofotometria. Assim, o aumento na quantidade de formazan produzido no meio é proporcional ao aumento no número de células lisadas.

A liberação de LDH foi determinada através do *kit* comercial *LDH-Cytotoxicity Assay Kit*. Para isto, após o tratamento das retinas, o meio de incubação foi retirado e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. Do sobrenadante, 100 µl foram retirados e misturados a 100 µl de solução reativa (contendo o sal tetrazolium). Após 30 min de reação, a produção do azul de formazan foi quantificada por leitor de microplaca em 490 nm. O valor de LDH liberado foi dividido pelo valor de LDH total presente na amostra, este último foi quantificado após a adição de Triton X-100 1% em cada retina.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o programa estatístico BioEstat 5.0, onde as análises estatísticas foram feitas por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes em duplicata, sendo cada grupo experimental constituído por $n \geq 4$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem do controle.

5 RESULTADOS

5.1 O NGF INDUZ AUMENTO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES BASAIS DE GLUTAMATO E COMPOSTOS TIÓIS NA RETINA EMBRIONÁRIA

A fim de avaliarmos a concentração efetiva de NGF sobre a liberação de glutamato e compostos tióis no tecido retiniano, procuramos caracterizar o efeito de diferentes concentrações desta neurotrofina durante 30 min de exposição, como descrito nos métodos. Nossos resultados demonstraram que a concentração de 50 ng/ml elevou em cerca de 380% os níveis extracelulares de glutamato (Figura 9a) e cerca de 33% os níveis extracelulares de compostos contendo grupamentos sulfidríla (Figura 10a). Baseado nestes dados procuramos utilizar esta concentração de NGF em todos os nossos experimentos posteriores.

Para o estudo do efeito temporal de NGF, os níveis de glutamato e tióis no meio foram dosados após diferentes períodos de incubação com este fator. Notamos que o tratamento com NGF promoveu aumento significativo nos níveis extracelulares basais de glutamato, em 15 min (335%) e 30 min (385%) após o tratamento (Figura 9b). Nossos resultados também demonstram que os níveis de tióis mostraram aumento significativo (30%) somente após 120 min de exposição ao NGF (Figura 10b).

A elevação dos níveis extracelulares de tióis foi acompanhada pela redução de 17% em seus níveis intracelulares (Figura 11), o que nos permite sugerir a possibilidade de NGF estimular o transporte destes compostos do espaço intra para o espaço extracelular.

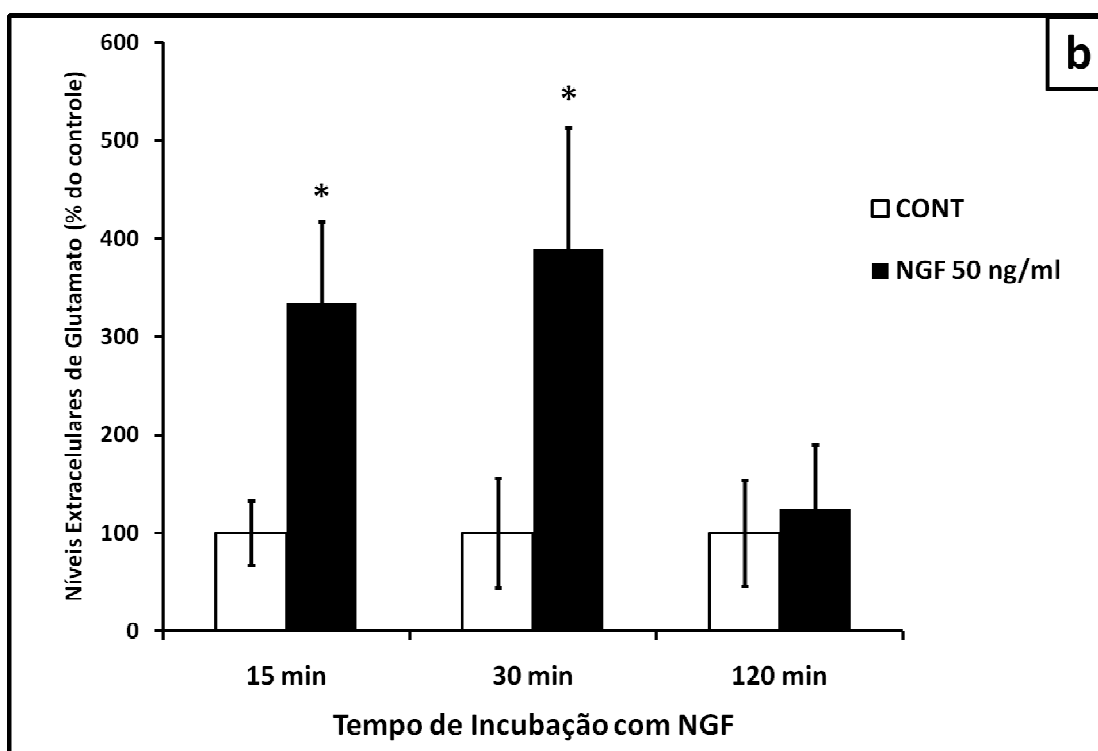
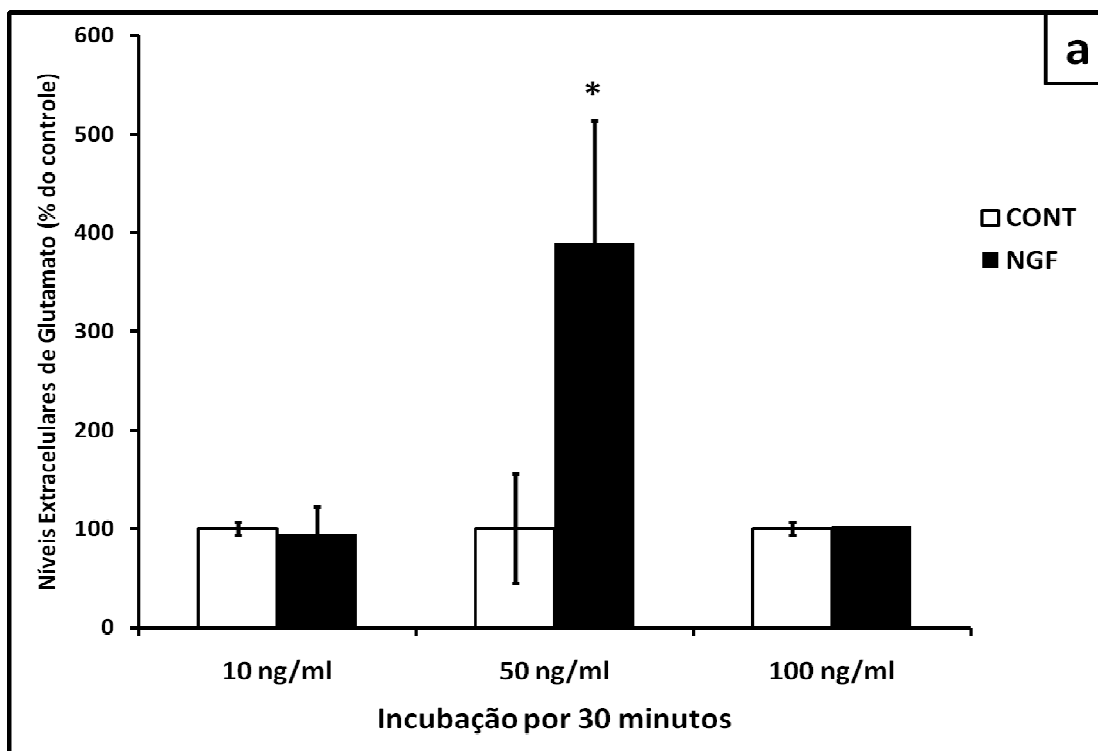


Figura 9. Efeito do NGF sobre os níveis extracelulares de glutamato – (A) Níveis extracelulares de glutamato após a incubação com NGF (10, 50 e 100 ng/ml) por 30 min. (B) Níveis extracelulares de glutamato após a incubação com NGF (50 ng/ml) por 15, 30 e 120 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey $*p < 0.01$ em relação ao controle).

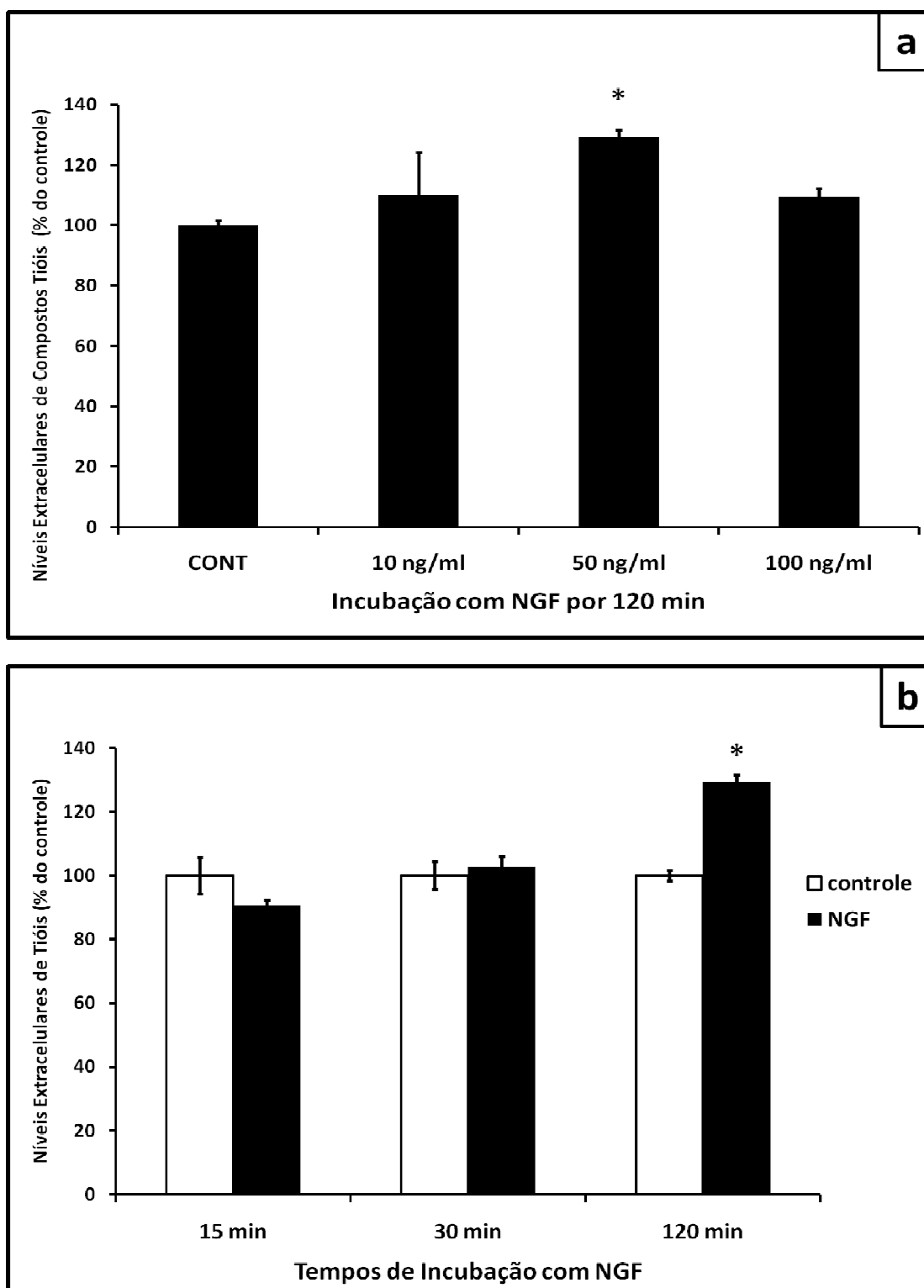


Figura 10: Efeito do NGF sobre os níveis extracelulares de compostos tióis – (A) Níveis extracelulares de Compostos Tióis (–SH) após o tratamento com NGF (10, 50 e 100 ng/ml) por 120 min. (ANOVA-Tukey $*p < 0.05$ em relação ao controle). (B) Níveis extracelulares de Compostos Tióis (–SH) após a incubação com NGF (50 ng/ml) por 15, 30 e 120 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey $*p < 0.01$ em relação ao controle).

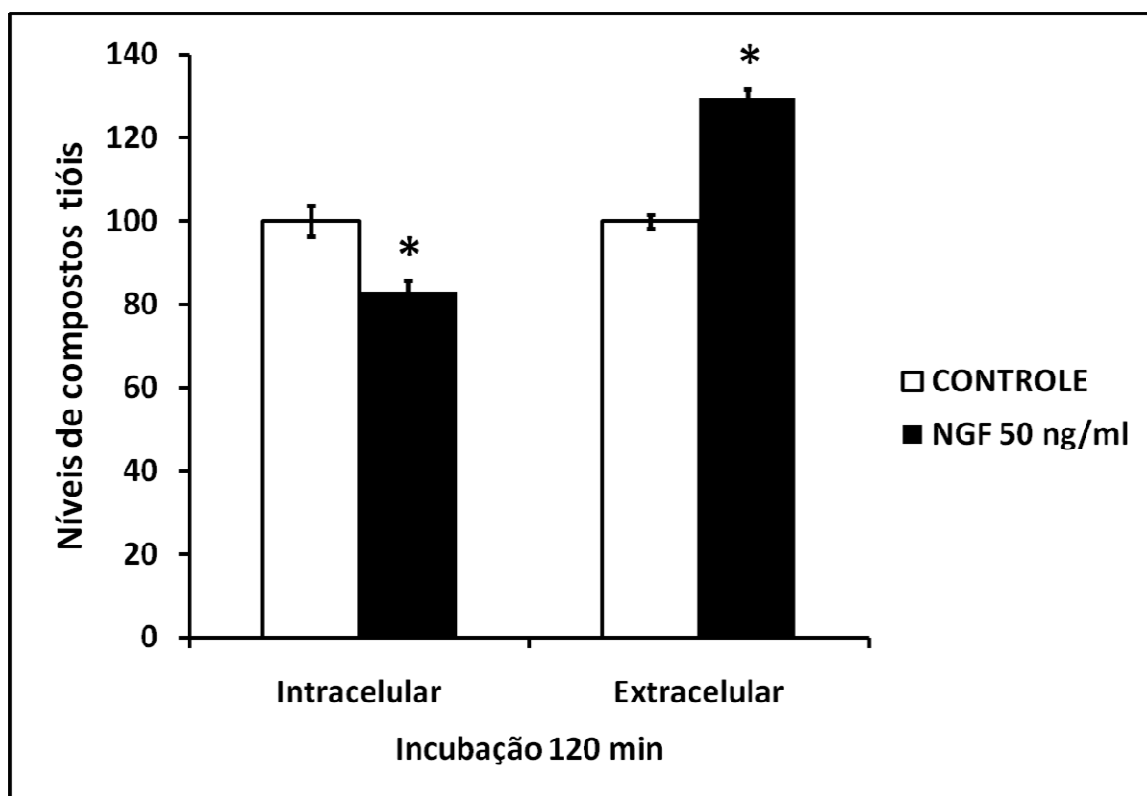


Figura 11. Efeito do NGF sobre os níveis intra e extracelulares de tióis – Níveis intracelulares e extracelulares de Compostos Tióis (–SH) após a incubação com NGF (50 ng/ml) por 120 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey * $p < 0.01$ em relação ao controle).

5.2 MECANISMOS DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO E TIÓIS

Com o objetivo de examinarmos se o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por NGF era resultante de eventos de exocitose vesicular, as retinas foram incubadas com NGF em meio livre de Ca^{2+} . Nesta condição, como pode ser notado na figura 12a, nossos dados demonstraram que em 15 min de incubação, o efeito estimulante de NGF sobre os níveis de glutamato no meio é nitidamente dependente de Ca^{2+} extracelular ($128 \pm 19\%$ Cont vs. $123 \pm 8\%$ NGF). Entretanto, quando a incubação é prolongada para 30 min, o aumento dos níveis extracelulares de glutamato induzido por NGF ocorre de maneira independente de Ca^{2+} (Figura 12b), visto que, NGF elevou os níveis de glutamato no meio em aproximadamente 110%. Esse componente independente de Ca^{2+} foi investigado por sua vez.

Para analisarmos se o aumento da liberação de glutamato induzido por NGF em 30 min seria conseqüente do transporte reverso mediado por GLAST, quantificamos os níveis de glutamato no meio após a incubação com Zn^{2+} 100 μM . Como observado na figura 13, o tratamento com Zn^{2+} não alterou os níveis de glutamato no meio ($231 \pm 32\%$ NGF vs. $215 \pm 8\%$ NGF + Zn^{2+}), sugerindo que a participação de GLAST não é significativa neste processo.

Considerando-se que GLAST também poderia mediar a liberação de GSH, analisamos se o aumento da liberação de tióis induzido por NGF estaria associado com a atividade deste transportador. Contudo, nossos experimentos demonstram que o tratamento com Zn^{2+} não reverteu o efeito estimulante do NGF sobre os níveis extracelulares de tióis ($132 \pm 7\%$ NGF vs. $138 \pm 3\%$ NGF + Zn^{2+}) (Figura 14).

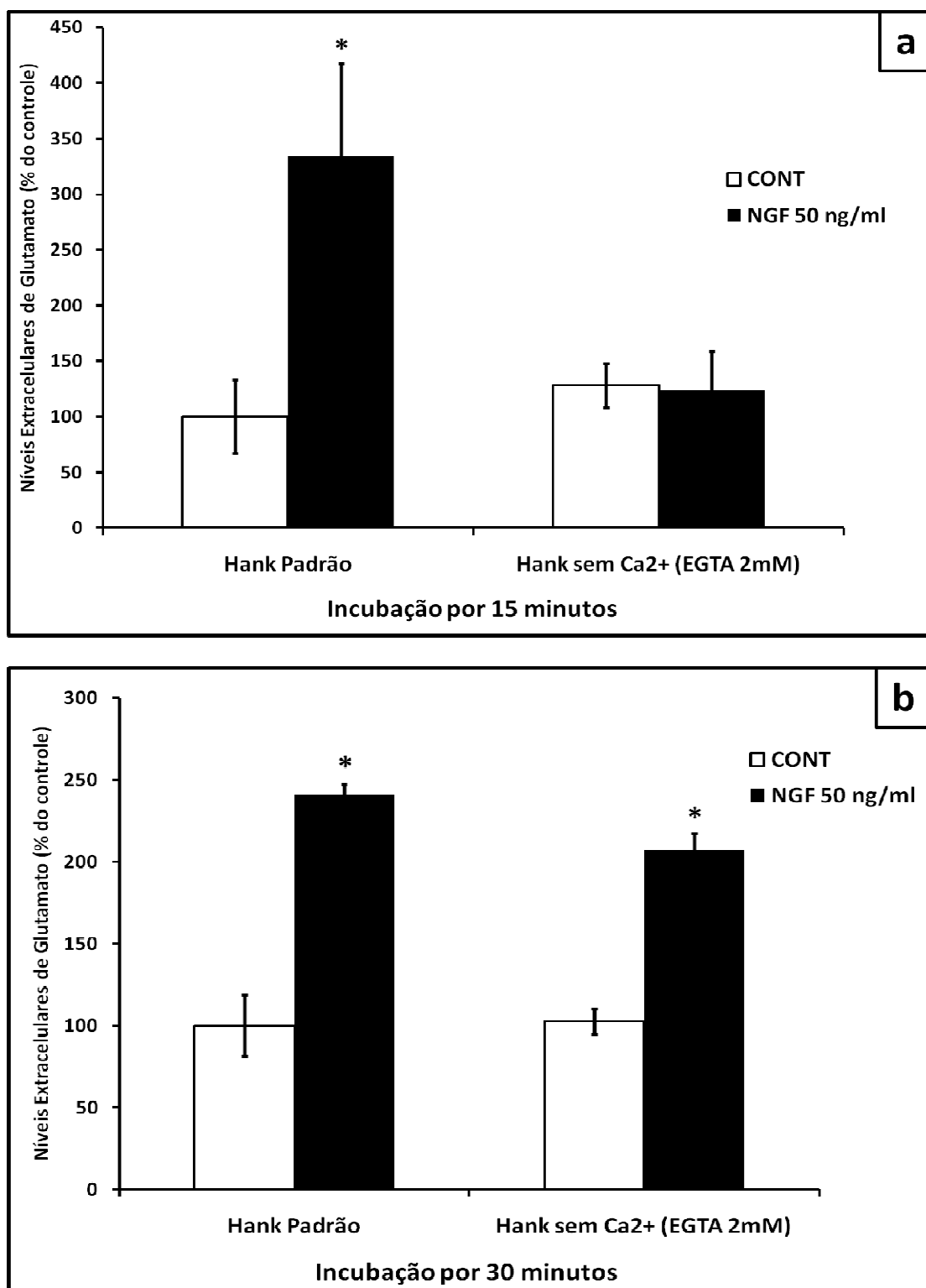


Figura 12. Efeito da remoção dos íons Ca²⁺ sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato estimulado por NGF – Níveis extracelulares de Glutamato em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11), após a incubação com NGF (50 ng/ml) em solução de Hank com ou sem cálcio por 15 min (A) ou 30 min (B). Adicionou-se EGTA 2mM na solução de Hank livre de cálcio para a retirada de cálcio residual. Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey **p* < 0.01 em relação ao controle).

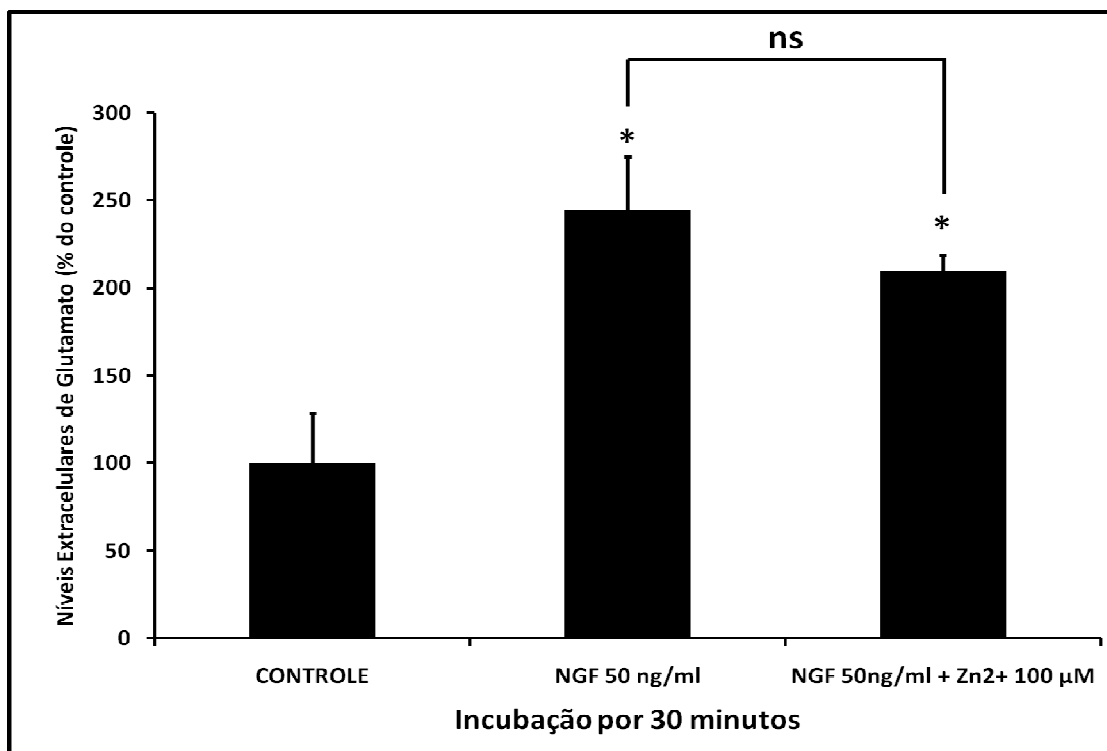


Figura 13. Efeito do íon Zn^{2+} sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato estimulado por NGF – Níveis extracelulares de Glutamato após a incubação com NGF (50 ng/ml) ou co-tratamento NGF + $ZnSO_4$ (100 μ M) por 30 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey * $p < 0.01$ em relação ao controle; n.s. $p > 0.05$).

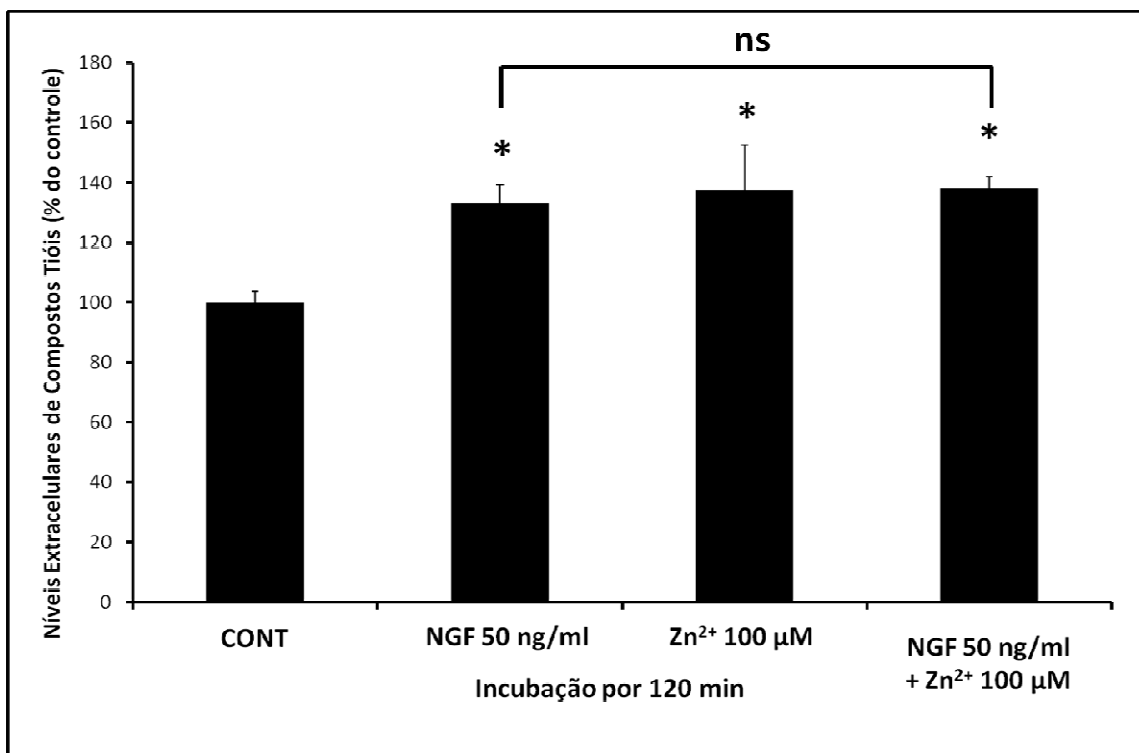


Figura 14. Efeito do íon Zn^{2+} sobre o aumento dos níveis extracelulares de compostos tíois estimulado por NGF – Níveis extracelulares de compostos tíois após a incubação com NGF (50 ng/ml), $ZnSO_4$ (100 μ M), ou co-tratamento NGF + $ZnSO_4$ por 120 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey * $p < 0.01$ em relação ao controle; n.s., $p > 0.05$).

A liberação de glutamato induzida por NGF em 30 minutos apresenta um componente independente de Ca^{2+} e parece não ser mediada diretamente por GLAST, o que nos levou a investigar a participação de um componente independente de Na^+ . Para isso, o glutamato extracelular foi quantificado em meio sem Na^+ após o tratamento com NGF 50 ng/ml. Como ilustrado na figura 15b, o efeito do NGF sobre os níveis extracelulares de glutamato ocorreu de maneira independente de íons sódio. Observamos que NGF promoveu o aumento significativo dos níveis extracelulares de glutamato ainda na ausência de Na^+ ($85 \pm 24\%$ Cont vs. $189 \pm 10\%$ NGF), indicando a possibilidade da liberação de glutamato induzida por NGF ser mediada por carreadores do tipo Xc-.

Para verificarmos se este sistema também estaria envolvido com o aumento da liberação de tióis induzido por NGF, as retinas foram de maneira similar incubadas em Hank sem Na^+ e os níveis de tióis no meio quantificados. A figura 16 mostra que o aumento dos níveis extracelulares de compostos tióis induzido por NGF também é independente de Na^+ , visto que ainda na ausência deste íon, NGF induziu uma liberação de tióis de aproximadamente 40%, sugerindo a participação de Xc- neste processo.

Finalmente, com o intuito de investigarmos se o aumento dos níveis extracelulares de compostos tióis induzido por NGF estaria associado com o seu papel protetor, realizamos ensaios de LDH após o tratamento com esta neurotrofina. Verificamos que ao final 120 min de incubação, aproximadamente 45% de morte celular por necrose ocorre no tecido retiniano. Por outro lado, observamos que NGF atua como um fator de sobrevivência para a retina nestas condições (Figura 17).

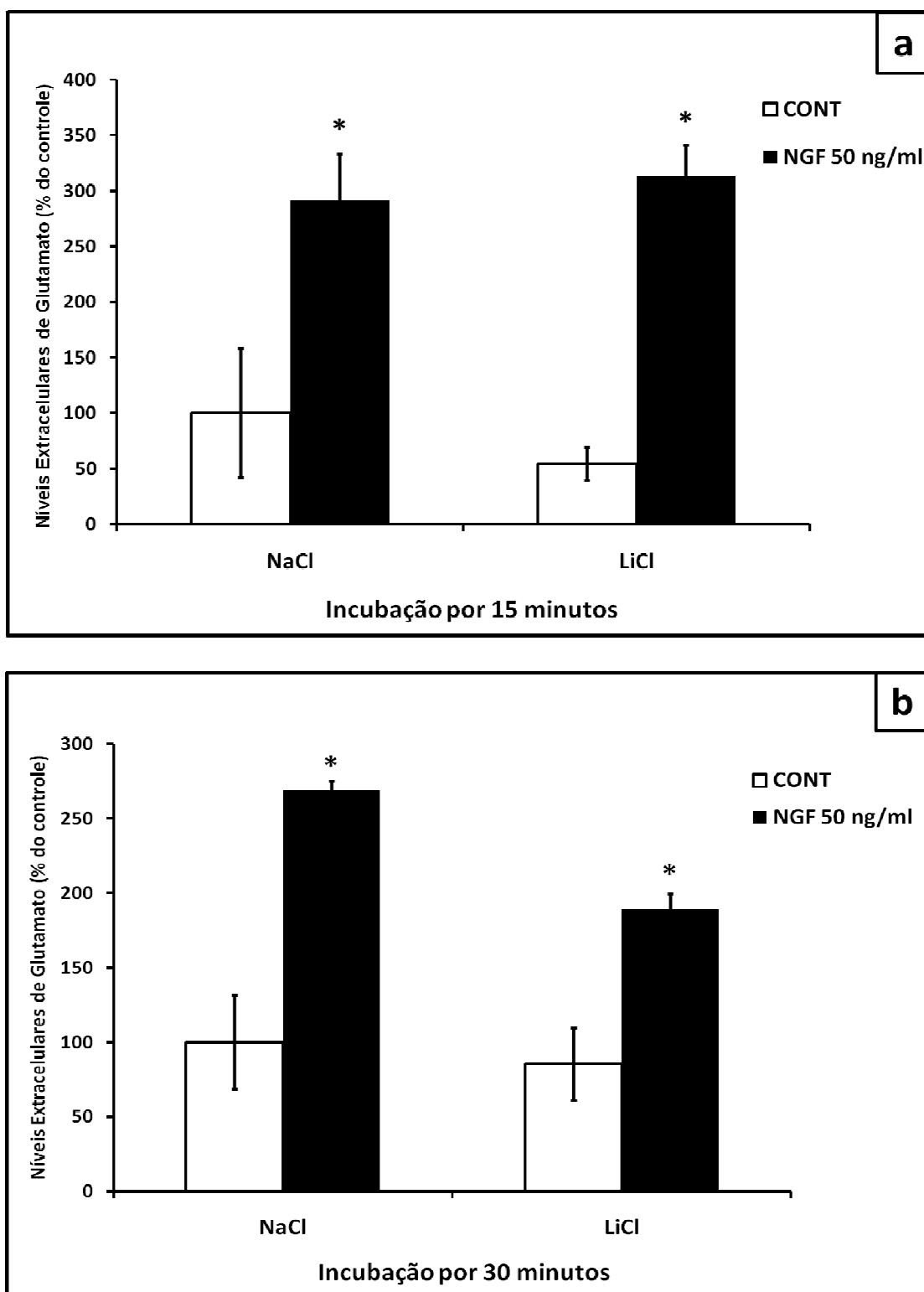


Figura 15. Efeito da remoção de Na^+ sobre o aumento dos níveis extracelulares de glutamato estimulado por NGF – Níveis extracelulares de Glutamato após a incubação com NGF (50 ng/ml) diluído em solução de Hank com ou sem sódio (NaCl x LiCl) por 15 min (A) ou 30 min (B), em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey * $p < 0.01$ em relação ao controle).

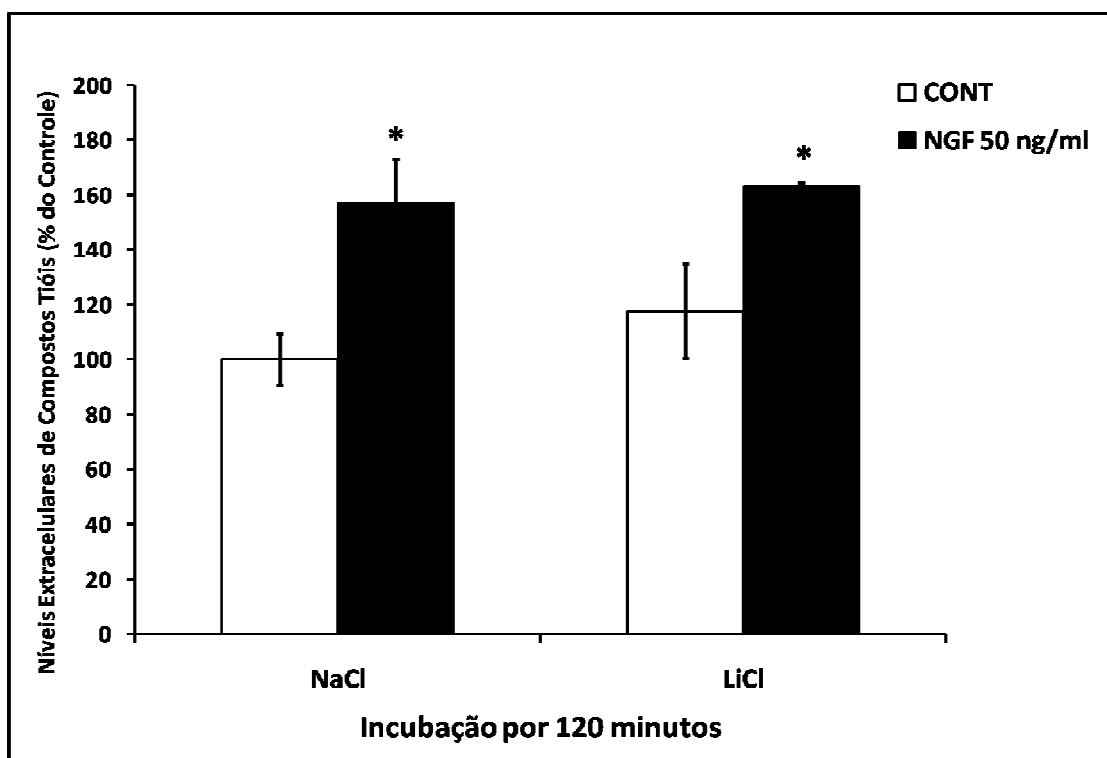


Figura 16. Efeito da remoção de Na^+ sobre o aumento dos níveis extracelulares de compostos tíois estimulado por NGF – Níveis extracelulares de compostos tíois após a incubação com NGF (50 ng/ml) diluído em solução de Hank com ou sem sódio (NaCl x LiCl) por 120 min, em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (ANOVA-Tukey $*p < 0.01$ em relação ao controle).

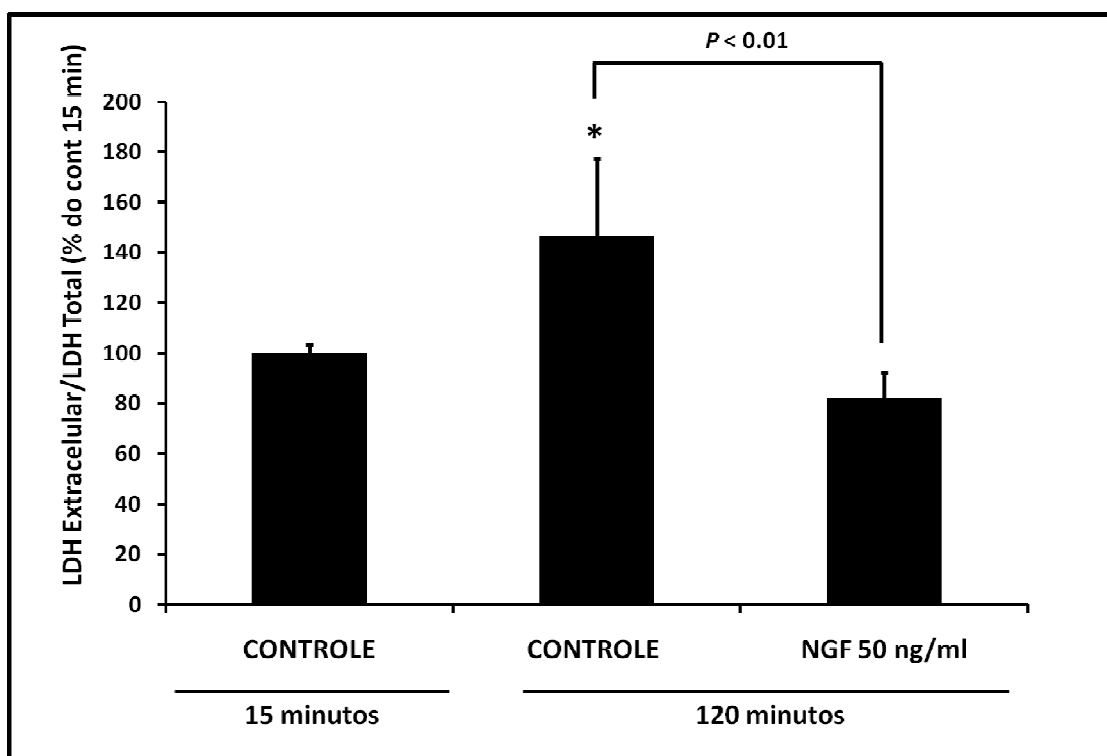


Figura 17. Efeito de NGF sobre a liberação de LDH na retina embrionária de galinha – Liberação de LDH após 120 minutos de tratamento com NGF (50 ng/ml) em tecido retiniano de embrião de galinha (E10/11). Os valores são expressos em porcentagem do controle (teste *t* de Student * $p < 0.001$ em relação ao controle 15 minutos; ANOVA-Tukey $p < 0.01$).

6 DISCUSSÃO

Estudos prévios apontam a importância de fatores que regulam a sobrevivência celular da retina no decurso do desenvolvimento (VECINO; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2004). Dentre eles, NGF e glutamato exercem papéis fundamentais na ontogenia deste tecido (BODNARENKO; JEYARASASINGAM; CHALUPA, 1995; HALLBÖÖK *et al*, 1996). Em nossos experimentos o NGF induziu aumento significativo da liberação de glutamato por células retinianas. Efeitos semelhantes foram descritos previamente em outras áreas do SNC (NUMAKAWA *et al*, 2003; PAREDES; GRANHOLM; BICKFORD, 2007), indicando que de um modo geral o NGF pode regular os níveis de glutamato e de maneira sinérgica estas moléculas poderiam atuar em eventos de sobrevivência e morte, como observado em células de Purkinje (COHEN-CORY; DREYFUS; BLACK, 1991).

Por outro lado, a permanência de glutamato em altas concentrações no meio extracelular gera efeitos excitotóxicos bem reportados (DANBOLT, 2001), culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (KANNAN; JAIN, 2000). No entanto, a formação de ERO normalmente é equilibrada pela síntese e liberação de antioxidantes (WLODEK, 2002), e desta forma o aumento de tióis no meio seria esperado na presença do NGF. De fato, nossos resultados demonstraram que este fator de crescimento induziu aumento significativo dos níveis extracelulares de tióis, efeito que também pode ser observado quando a retina é exposta diretamente ao próprio glutamato (GARCIA *et al*, 2011).

Considerando-se que o desenvolvimento perinatal da retina ocorre em ambiente com altos níveis de glutamato, os quais seriam tóxicos em um animal adulto (REDBURN; ROWE-RENDLEMAN, 1996), a liberação de tióis observada em nossos resultados pode representar um importante mecanismo de neuroproteção, como sugerido por outros autores (DRINGEN, 2000; FRADE *et al*, 2008).

Para ambas as respostas, na liberação de glutamato e na liberação de tióis pela retina, o efeito estimulante do NGF foi observado a 50 ng/ml, contudo o aumento da concentração não promoveu alterações significativas nos níveis de glutamato e tióis no meio. Devido a retina expressar os dois receptores, TrkA e p75NTR, durante o desenvolvimento embrionário (KARLSSON *et al*, 2001; MORILO

et al, 2010), é provável que o NGF em concentrações diferentes esteja ativando receptores distintos. Estudos complementares, com uso de bloqueadores específicos para TrkA e p75NTR, poderão esclarecer a contribuição individual de cada um destes receptores nos fenômenos observados em nosso trabalho.

Independente dos receptores envolvidos, os níveis de glutamato poderiam acumular no meio como resultado do aumento da liberação e/ou reduzida captação do neurotransmissor. No presente estudo, investigamos algumas das principais vias de liberação de glutamato que poderiam mediar o aumento da concentração do neurotransmissor no meio – a sua liberação vesicular, o seu efluxo não convencional através do funcionamento reverso de GLAST, e ainda seu antiporte pelo trocador glutamato-cistina (MALARKEY; PARPURA, 2008).

Primeiramente, observamos que durante 15 min de tratamento, o efeito estimulante do NGF foi totalmente dependente de Ca^{2+} , consistente com investigações prévias, as quais mostraram que a liberação de neurotransmissores induzida tanto por NGF como por BDNF foram dependentes de Ca^{2+} (RAITERI *et al*, 2003; PAREDES; GRANHOLM; BICKFORD, 2007), sugerindo ocorrência de liberação vesicular do neurotransmissor. Contudo, aumentando-se o tempo de incubação para 30 min, o aumento de glutamato no meio induzido por NGF ocorre de maneira independente de Ca^{2+} . Este resultado caracteriza um efeito bifásico do NGF, no qual a primeira fase de atividade está atrelada a eventos de exocitose e a segunda fase provavelmente está relacionada com processo mediado por proteína transportadora.

Recentemente, uma resposta bifásica foi observada para NGF, com duas ondas de atividades acontecendo em tempos diferentes. Paredes *et al*. (2007) notou que na formação hipocampal, a neurotrofina induziu um pico de liberação de glutamato em 30 min e outro em 60 min. De acordo com o autor, esta segunda onda de atividade poderia representar o efeito indireto do NGF mediado por BDNF. Isto poderia ocorrer na retina, visto que, culturas de células de Muller tratadas com glutamato mostraram aumento da expressão e liberação de fatores neurotróficos, incluindo BDNF (TAYLOR *et al*, 2003).

Neste trabalho, para estudarmos a segunda fase de atuação de NGF, nossas investigações direcionaram-se aos possíveis alvos de regulação por este

fator neurotrófico, que resultariam no aumento de glutamato no meio, de maneira independente de Ca^{2+} .

Dentro deste contexto, examinamos se o NGF, no decurso de 30 min, poderia aumentar os níveis extracelulares de glutamato através da modulação do principal e mais abundante transportador de glutamato na retina, GLAST. Apoio para esta hipótese é proveniente do fato de que muitos fatores tróficos podem modular os níveis de glutamato no meio através da regulação de GLAST (DELYFER *et al*, 2005; KOEBERLE; BÄHR, 2008; GAMBOA; ORTEGA, 2002). Além disso, o próprio glutamato liberado em 15 min poderia influenciar na atividade deste carreador, promovendo a posterior liberação de glutamato independente de Ca^{2+} , visto que em diferentes trabalhos, este neurotransmissor se mostrou capaz de alterar a atividade de captação, bem como os níveis de proteína e RNAm para GLAST (LÓPEZ-BAYGHEN; ESPINOZA-ROJO; ORTEGA, 2003; TAYLOR *et al*, 2003; ROSAS *et al*, 2007).

Entretanto, o aumento dos níveis de glutamato no meio induzido por NGF não é mediado diretamente por GLAST, pois o co-tratamento com íons Zn^{2+} não resultou em alterações significativas no efeito da neurotrofina. Este resultado é consistente com o fato de que, ao contrário do que é reportado para GABA na retina de aves, o transporte reverso de glutamato não constitui o principal componente da liberação deste neurotransmissor em condições fisiológicas (do NASCIMENTO; VENTURA; PAES DE CARVALHO, 1998; CALAZA; GARDINO; de MELLO, 2006). Ao contrário, são as condições patofisiológicas que podem favorecer a operação reversa do transportador (MALARKEY; PARPURA, 2008).

Por termos observado recentemente uma participação significativa de GLAST na liberação de GSH em retina de embrião de galinha (GARCIA *et al*, 2011), os níveis de tióis no meio também foram quantificados após o bloqueio deste transportador. No entanto, este componente parece não estar envolvido diretamente com o aumento de compostos tióis induzido por NGF, uma vez que, o bloqueio do transportador de glutamato não alterou os níveis de tióis no meio. De fato, muito do que foi mostrado em termos de transporte de GSH no SNC está relacionado com a atividade de transportadores independentes de Na^+ (MINICH *et al*, 2006; RANA; DRINGEN, 2007; OLIVEIRA *et al*, 2010).

Os dados acima nos permitem inferir que o transporte reverso de GLAST não contribui ativamente para a liberação de glutamato e tióis induzida por NGF, o que indica o envolvimento de uma via alternativa neste fenômeno. Muitos autores propõem que o glutamato extracelular de origem não-vesicular é mantido primariamente por um sistema independente de Na^+ (BAKER *et al*, 2002). Na retina de embrião de galinha o transporte de glutamato independente de Na^+ , mediado pelo sistema Xc- contribui de forma altamente significativa para o transporte do neurotransmissor (OLIVEIRA *et al*, 2010). Ademais, a liberação de glutamato mediada por Xc- está acoplada a entrada de cistina e a resultante deste processo é o aumento na síntese de GSH (PAN; PEREZ-POLO, 1996), o que poderia resultar no aumento posterior da liberação do tiol. Assim, na tentativa de explicarmos que via estaria envolvida com o aumento dos níveis extracelulares de glutamato e tióis induzido por NGF em 30 min, investigamos a possibilidade do componente independente de Na^+ participar deste processo.

Finalmente, verificamos que após 30 min de tratamento, o NGF induziu aumento dos níveis extracelulares de glutamato de maneira independente de Na^+ , uma vez que a remoção destes íons do meio de incubação não impediu a liberação de glutamato. Resultado similar foi observado quando os níveis de tióis foram medidos no meio após a retirada de Na^+ . Juntos estes resultados confirmam que a liberação de glutamato e tióis, estimulada por NGF é independente de Na^+ , indicando que o sistema Xc- pode estar envolvido neste processo. Logo, sugerimos que o aumento da liberação de glutamato por Xc- (30 min), e o conseqüente aumento da captação de cistina poderiam conduzir à síntese aumentada de GSH, com a liberação subseqüente deste tiol, mediada pelo próprio sistema Xc- (120 min).

Contudo, outros sistemas independentes de Na^+ , que foram identificados em cultura e linhagens celulares, não podem ser desconsiderados. Por exemplo, a liberação de GSH pode ocorrer por meio de proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRP), pelo regulador de condutância de transmembrana da fibrose cística (CFTR), bem como por polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) (BALLATORI *et al*, 2009).

Por este motivo, uma análise futura da expressão do transportador Xc- seria bastante elucidativa para o estudo da sua mediação no efeito estimulante do NGF. Dados recentes mostram que eritropoietina, uma citocina a qual atua como

fator de sobrevivência, regula positivamente a atividade e expressão de Xc- (SIMS *et al*, 2010), o que nos leva a questionar se outros sinais de sobrevivência como NGF também poderiam regular a expressão deste carreador.

Por outro lado, 30 minutos de incubação com NGF nos parece um tempo muito curto para envolver a regulação positiva deste transportador independente de Na⁺ em nível de expressão gênica. O efeito do NGF observado em nosso trabalho envolve uma resposta a curto-prazo semelhante ao que já foi observado para este fator neurotrófico em outros modelos (SALA *et al*, 1998; AULD; MENNICKEN; QUIRION, 2001; NUMAKAWA *et al*, 2003; PAREDES; GRANHOLM; BICKFORD, 2007).

Neste caso, NGF poderia estar envolvido na translocação de transportadores Xc- para a membrana, importante mecanismo de regulação pós-transcricional que pode ocorrer dentro de poucos minutos e vem sendo descrito para transportadores de GABA, dopamina, serotonina (DANBOLT, 2001) e para transportadores de glutamato dependentes de Na⁺ (GAMBOA; ORTEGA, 2002). Conseqüentemente, o aumento da expressão de superfície de Xc- poderia resultar no aumento dos níveis de glutamato no meio.

Independente do sistema, que esteja de fato, envolvido na liberação de tióis induzida por NGF, o papel desta neurotrofina no aumento de compostos tióis no meio, em associação com o seu papel protetor é bastante evidente no presente estudo (Figura 17). De maneira consistente com estes resultados, E10-E12 é o período embrionário no qual NGF aumenta consideravelmente a sobrevivência de células amácrinas na retina de pinto (KARLSSON *et al*, 2001). Assim, muito do que já foi reportado para NGF como um sinal de sobrevivência (LENZI *et al*, 2005; SUN *et al*, 2008) pode estar relacionado com a sua atuação na liberação de tióis, como observado previamente (PAN; PEREZ-POLO, 1996).

Em linhas gerais, este trabalho mostrou pela primeira vez, que o NGF aumenta os níveis extracelulares de glutamato e tióis em preparações de tecido retiniano. Este efeito é dependente de Ca²⁺ nos primeiros minutos de tratamento, e é mantido por um sistema independente de Na⁺ em período maior de exposição à neurotrofina. Adicionado a isto, o NGF atua como um sinal de sobrevivência e proteção, induzindo a liberação de compostos tióis pelo tecido retiniano, em um tempo de incubação ainda mais prolongado, quando os níveis de glutamato no meio

já retornaram aos níveis basais. Considerando-se a eficiência de Xc- na retina de embrião de galinha (OLIVEIRA *et al*, 2010), existe grande possibilidade de que este sistema esteja diretamente envolvido em ambos os processos.

O conhecimento mais aprofundado da relação entre o NGF, glutamato e tióis na retina pode ser complementar aos estudos que visem à aplicação farmacológica deste fator de crescimento em retinopatias humanas (LAMBIASE *et al*, 2009), dado que parte delas estão sendo investigadas com base nos níveis de glutamato e a geração de estresse oxidativo (PULIDO *et al*, 2007; KOWLURU; CHAN, 2007).

7 CONCLUSÃO

- O NGF promove aumento significativo nos níveis extracelulares de glutamato em retina de embrião de galinha.
- O NGF induz aumento significativo nos níveis extracelulares de compostos tióis.
- O aumento da liberação de glutamato induzido por NGF é dependente de Ca^{2+} nos primeiros minutos de atividade da neurotrofina.
- O aumento da liberação de glutamato e compostos tióis não é mediado diretamente por GLAST.
- O sistema Xc- pode estar envolvido na liberação de glutamato induzida por NGF quando o componente vesicular desaparece.
- A liberação de tióis é independente de Na^+ e pode representar um mecanismo de proteção neuronal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, N.; AGARWAL, R.; KUMAR, D.M.; ONDRICEK, A.; CLARK, A.F.; WORDINGER, R.J.; PANG, I. Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells. **Mol Vision**. **13**: 1311-8. 2007.

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ANGELETTI, R.H.; BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. **Proc Natl Acad Sci USA**. **68**: 2417–20. 1971.

ARY-PIRES, R.; NAKATANI, M.; REHEN, S.K.; LINDEN, R. Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors in vitro. **Int J Dev Neurosci**. **15**: 239-55. 1997.

ASHCROFT, M.; STEPHENS, R.M.; HALLBERG, B.; DOWNWARD, J.; KAPLAN, D.R. The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth. **Oncogene**. **18**: 4586–4597. 1999.

AULD, D.S.; MENNICKEN, F.; QUIRION, R. Nerve Growth Factor Rapidly Induces Prolonged Acetylcholine Release from Cultured Basal Forebrain Neurons: Differentiation between Neuromodulatory and Neurotrophic Influences. **J Neurosci**. **21**: 3375–3382. 2001.

AYER-LELIEVRE, C.S.; EBENDAL, T.; OLSON, L.; SEIGER, A. Localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in rat nervous tissue. **Med Biol**. **61**: 296–304. 1983.

BAKER, D.A.; XI, Z-X.; SHEN, H.; SWANSON, C.J.; KALIVAS, P.W. The Origin and Neuronal Function of In Vivo Nonsynaptic Glutamate. **J Neurosci**. **22**: 9134–9141. 2002.

BALLATORI, N.; KRANCE, S.N.; MARCHAN, R.; HAMMOND, C.L. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. **Mol Aspects Med**. **30**: 13-28.2009.

BARKER, P.A. High affinity not in the vicinity? **Neuron**. **53**: 1–4. 2007.

BLÖCHL, A.; SIRRENBORG, C. Neurotrophins Stimulate the Release of Dopamine from Rat Mesencephalic Neurons via Trk and p75^{L^{ntf}} Receptors. **J Biol Chem.** **271**: 21100–21107, 1996

BODNARENKO, S.R.; JEYARASASINGAM, G.; CHALUPA, L.M. Development and Regulation of Dendritic Stratification in Retinal Ganglion Cells by Glutamate-Mediated Afferent Activity. **J Neurosci.** **15**: 7037–7045. 1995.

BRADFORD, 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochem.** **72**: 248-254. 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**: 143–160. 2009.

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

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways. **Nat Rev Neurosci.** **4**: 299–309. 2003.

CHAO, M.V.; RAJAGOPAL, R.; LEE, F.S. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clinical Sci.** **110**: 167–173. 2006.

CHAPMAN, B.S. A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. **FEBS Lett.** **374**: 216–220. 1995.

CHAUM, E. Retinal Neuroprotection by Growth Factors: A Mechanistic Perspective. **J Cellular Biochem.** **88**: 57–75. 2003.

CHEN, X. et al. A chemical-genetic approach to studying neurotrophin signaling. **Neuron.** **46**: 13–21. 2005.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A nerve growth stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. **Proc Natl Acad Sci USA.** **40**: 1014-18. 1954.

COHEN-CORY, S.; DREYFUS, C.F.; BLACK, I.B. NGF and Excitatory Neurotransmitters Regulate Survival and Morphogenesis of Cultured Cerebellar Purkinje Cells. **J Neurosci.** **17**: 462-471. 1991.

COWAN, W.M. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: The Path to the Discovery of Nerve Growth Factor. **Annu Rev Neurosci.** **24**: 551–600. 2001.

CUI, Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. **Mol Neurobiol.** **33**: 155–179. 2006.

CUI, Q.; TANG, L.S.; HU, B.; SO, K.; YIP, H.K. Expression of trkA, trkB, and trkC in Injured and Regenerating Retinal Ganglion Cells of Adult Rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **43**: 1954–1964. 2002.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog in Neurobiol.** **65**: 1–105. 2001.

DELCROIX, J.D. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. **Neuron.** **39**: 69–84. 2003.

DELYFER, M.; SIMONUTTI, M.; NEVEUX, N.; LÉVEILLARD, T.; SAHEL, J. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? **Mol Vision.** **11**: 677–87. 2005.

DING, J.; HU, B.; TANG, L.S.; YIP, H.K. Study of the Role of the Low-Affinity Neurotrophin Receptor p75 in Naturally Occurring Cell Death during Development of the Rat Retina. **Dev Neurosci.** **23**: 390–398. 2001.

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

DONOVAN, S.L.; DYER, M.A. Regulation of proliferation during central nervous system development. **Seminars in Cell & Developmental Biol.** **16**: 407-421. 2005.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol** **62**: 649-671. 2000.

DUDEK, H.; DATTA, S.R.; FRANKE, T.F.; BIRNBAUM, M.J.; YAO, R.; COOPER, G.M. et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science**. **275**: 661–665. 1997.

EBENDAL, T.; PERSSON, H. Detection of nerve growth factor mRNA in the developing chicken embryo. **Development**. **102**: 101–6. 1988.

EDWARDS, R.H.; SELBY, M.J.; GARCIA, P.D.; RUTTER, W.J. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. **J Biol Chem**. **263**: 6810–6815. 1988.

EINARSDOTTIR, E.; CARLSSON, A.; MINDE, J.; TOOLANEN, G.; SVENSSON, O.; SOLDERS, G.; HOLMGREN, G.; HOLMBERG, D.; HOLMBERG, M. A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception. **Human Mol Genetics**. **13**: 799–805. 2004.

FRADE, J.; BOVOLENTA, P.; RODRÍGUEZ-TÉBAR, A. Neurotrophins and Other Growth Factors in the Generation of Retinal Neurons. **Microscopy Res Tec**. **45**: 243–251. 1999.

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

FRADE, J.M.; BARDE, Y.A. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. **Bioessays**. **20**: 137–145. 1998.

FREUND-MICHEL, V.; FROSSARD, N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. **Pharmacol & Therapeutics**. **117**: 52–76. 2008.

FURUKAWAZ, Y.; FURUKAWA, S.; SATOYOSHI, E.; HAYASHI, K. Nerve Growth Factor Secreted by Mouse Heart Cells in Culture. **J Biol Chem**. **259**: 1259–1264. 1984.

GAMBOA, C.; ORTEGA, A. Insulin-like growth factor-1 increases activity and surface levels of the GLAST subtype of glutamate transporter. **Neurochem Int**. **40**: 397–403. 2002.

GARCÍA, M.; FORSTER, V.; HICKS, D.; VECINO, E. In Vivo Expression of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors Is Conserved in Adult Porcine Retina In Vitro. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** **44**: 4532–4541. 2003.

GARCIA, T.B.; OLIVEIRA K,R.; DO NASCIMENTO, J.L.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; PIKANÇO-DINIZ, D.L.; MOTA, T.C.; HERCULANO, A.M. Glutamate induces glutathione efflux mediated by glutamate/aspartate transporter in retinal cell cultures. **Neurochem Res.** **36**: 412-8. 2011.

HALLBÖÖK, F.; BÄCKSTRÖM, A.; KULLANDER, K.; EBENDAL, T.; CARRI, N.G. Expression of neurotrophins and Trk receptors in the avian retina. **J Comp Neurol.** **364**: 664–676. 1996.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H.L. A series of the normal stages in the development of the chick embryo. **J Morpholol.** **88**: 49-92. 1951.

HANDELMAN, G.J.; DRATZ, E.A. The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant induced damage. **Adv Free Rad Biol Med.** **2**: 1-89. 1986.

HENDRY, I.A.; STOECKEL, K.; THOENEN, H.; IVERSEN, L.L. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. **Brain Res.** **68**: 103-121. 1974.

HEUMANN, R. Neurotrophin signalling. **Curr Opin Neurobiol.** **4**: 668-79. 1994.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Trk receptors: roles in signal transduction. **Annu Rev Biochem.** **72**: 609–642. 2003.

HUH, C.Y.L.; DANIK, M.; MANSEAU, F.; TRUDEAU,L.; WILLIAMS, S. Chronic Exposure to Nerve Growth Factor Increases Acetylcholine and Glutamate Release from Cholinergic Neurons of the Rat Medial Septum and Diagonal Band of Broca via Mechanisms Mediated by p75NTR. **J Neurosci.** **28**: 1404 –1409. 2008.

JIMÉNEZ-VIDAL, M.; GASOL, E.; ZORZANO, A.; NUNES, V.; PALACÍN, M.; CHILLARON, J. Thiol Modification of Cysteine 327 in the Eighth Transmembrane Domain of the Light Subunit xCT of the Heteromeric Cystine/Glutamate Antiporter Suggests Close Proximity to the Substrate Binding Site/Permeation Pathway. **J Biol Chem.** **279**: 11214–11221. 2004.

KANNAN, K.; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiol.** **7**: 153–163. 2000.

KANNAN, R.; TANG, D.; HU, J.; BOK, D. Glutathione transport in Human Retinal Pigment Epithelial (HRPE) cells: apical localization of sodium-dependent GSH transport. **Exp Eye Res.** **72**: 661-666. 2001.

KARLSSON, M.; MAYORDOMO, R.; REICHARDT, L.F.; CATSICAS, S.; HARVEY J. KARTEN, H.J.; HALLBÖÖK, F. Nerve growth factor is expressed by postmitotic avian retinal horizontal cells and supports their survival during development in an autocrine mode of action. **Development.** **128**: 471–479. 2001.

KOEBERLE, P.D.; Bähr, M. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. **Cell Death and Differentiation.** **15**: 471–483. 2008.

KOWLURU, R.A.; CHAN, P.S. OXIDATIVE STRESS AND DIABETIC RETINOPATHY. **Exp Diabetes res.** **43**: 603. 2007.

LAMBIASE, A.; MICERA, A.; SGRULLETTA, R.; BONINI, S.; BONINI, S. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** **4**: 425–430. 2004.

LAMBIASE, A.; COASSIN, M.; TIRASSA, P.; MANTELLI, F.; ALOE, L. Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. **Ann Ist Super Sanità.** **45**: 439-442. 2009.

LEBRUN-JULIEN, F.; MORQUETTE, B.; DOUILLETTE, A.; SARAGOV, U.S.; DI POLO, A. Inhibition of p75NTR in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. **Mol Cellular Neurosci.** **40**: 410–420. 2009.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais.** 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

LENZI, L.; COASSIN, M.; LAMBIASE, A.; BONINI, S.; AMENDOLA, T.; ALOE, L. Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. **Vision Res.** **45**: 1491-500. 2005.

LEVI-MONTALCINI, R. Developmental Neurobiology and the Natural History of Nerve Growth Factor. **Ann Rev Neurosci.** **5**: 341-62. 1982.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science.** **237**: 1154–62. 1987.

LEVI-MONTALCINI, R.; SKAPER, S.D.; TOSO, R.D.; PETRELLI, L.; LEON, A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. **Trends Neurosci.** **19**: 514–520. 1996.

LÓPEZ-BAYGHEN, E.; ESPINOZA-ROJO, M. ORTEGA, A. Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. **Mol Brain Res.** **115**: 1–9. 2003.

MALARKEY, E.B.; PARPURA, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochem Int.** **52**: 142–154. 2008.

MARCHISIO, P.C.; CIRILLO, D.; NALDINI, L.; CALISSANO, P. Distribution of nerve growth factor in chick embryo sympathetic neurons in vitro. **J Neurocytol.** **10**: 45-55. 1981.

McBEAN, G. J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. **Trends in Pharmacol Sci.** **23**: 299-302. 2002.

McDONALD, N.Q.; CHAO, M.V. Structural determinants of neurotrophin action. **J Biol Chem.** **270**: 19669–19672. 1995.

MICERA, A.; LAMBIASE, A.; ALOE, L.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFERD, F.; BONINI, S. Nerve growth factor involvement in the visual system: implications in allergic and neurodegenerative diseases. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** **15**: 411–417. 2004.

MICERA, A.; LAMBIASE, A.; STAMPACHIACCHIERE, B.; BONINI, S.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFER, F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. **Cytokine Growth Factor Rev.** **18**: 245–56. 2007.

MINICH, T.; RIEMER, J.; SCHULZ, J.B.; WIELINGA, P.; WIJNHOLDS, J. & DRINGEN, R. The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. **J Neurochem.** **97**: 373–384. 2006.

MORIARTY-CRAIGE, S.E.; JONES, D.P. Extracellular Thiols and Thiol/Disulfide Redox Inmetabolism. **Annu Rev Nutr.** **24**: 481–509. 2004.

MORILLO, S.M.; ESCOLL, P.; de la HERA, A.; FRADE, J.M. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. **PNAS.** **107**: 109–114. 2010.

NUMAKAWA, T.; NAKAYAMA, H.; SUZUKI, S.; KUBO, T.; NARA, F.; NUMAKAWA, Y.; YOKOMAKU, D.; ARAKI, T.; ISHIMOTO, T.; OGURA, A.; TAGUCHI, T. Nerve Growth Factor-induced Glutamate Release Is via p75 Receptor, Ceramide, and Ca²⁺ from Ryanodine Receptor in Developing Cerebellar Neurons. **J Biol Chem.** **278**: 41259–41269. 2003.

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. **Neurochem Int** **56**: 59–66. 2010.

OWENS, C.W.I.; BELCHER, R.V. A Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione. **Biochem J.** **94**: 705-711. 1965

PAN, Z.; PEREZ-POLO, R. Increased uptake of L-cysteine and L-cystine by nerve growth factor in rat pheochromocytoma cells. **Brain Res.** **740**: 21-6. 1996.

PAPA, S.; ZAZZERONI, F.; PHAM, C.G.; BUBICI, C.; FRANZOSO, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. **J Cell Sci.** **117**: 5197–5208. 2004.

PAREDES, D.; GRANHOLM, A.-CH.; BICKFORD., P.C. Effects of NGF and BDNF on baseline glutamate and dopamine release in the hippocampal formation of the adult rat. **Brain Res.** **1141**: 56–64. 2007.

PULIDO, J.E.; PULIDO, J.S.; ERIE, J.C.; ARROYO, J.; BERTRAM, K.; LU, M-J.; SHIPPY, S.A. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. **Exp Diabetes Res.** 36150. 2007.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D. KATZ, L.C.; LAMANTIA, A-S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. **Neuroscience.** **4th Ed.** Sinauer Associates, Sunderland, EUA. 2008.

RACKE, M.M.; MASON, P.J.; JOHNSON, M.P.; BRANKAMP, R.G.; LINNIK, M.D. Demonstration of a second pharmacologically active promoter region in the NGF gene that induces transcription at exon 3. **Brain Res Mol Brain Res.** **41**: 192–199. 1996.

RAITERI, L.; GIOVEDÌ, S.; BENFENATI, F.; RAITERI, M.; BONANNO, G. Cellular mechanisms of the acute increase of glutamate release induced by nerve growth factor in rat cerebral cortex. **Neuropharmacol.** **44**: 390–402. 2003.

RANA, S.; DRINGEN, R. Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. **Neurosci Lett.** **415**: 45–48. 2007.

REDBURN, D.A.; ROWE-RENDLEMAN, C. Developmental Neurotransmitters. Signals for Shaping Neuronal Circuitry. **Invest Ophthalmol Visual Sci.** **37**: 1479-1482. 1996.

REICHARDT, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Phil Trans R Soc. B.** **361**: 1545–1564. 2006.

ROSAS, S.; VARGAS, M.A.; LÓPEZ-BAYGHEN, E.; ORTEGA, A. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. **J Neurochem.** **101**: 1134-1144. 2007.

ROUX, P.P.; BARKER, P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. **Prog Neurobiol.** **67**: 203–233. 2002.

RUDZINSKI, M.; WONG, T.; SARAGOVI, H.U. Changes in Retinal Expression of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors Induced by Ocular Hypertension. **Wiley Periodicals, Inc J Neurobiol.** **58**: 341–354. 2004.

RUIZ-EDERRA, J.; HITCHCOCK, P.F.; VECINO, E. Two classes of astrocytes in the adult human and pig retina in terms of their expression of high affinity NGF receptor (TrkA). **Neurosci Lett.** **337**: 127–130. 2003.

SALA, R.; VIEGI, A.; ROSSI, FM.; PIZZORUSSO, T.; BONANNO, G.; RAITERI, M.; MAFFEI, L. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. **Eur J Neurosci.** **10**: 2185-91. 1998.

SAMPAIO, L.F.S.; PAES-DE-CARVALHO, R. Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. **Neurochem Int.** **33**: 367-374. 1998.

SCHECTERSON, L.C.; BOTHWELL, M. Neurotrophin Receptors: Old Friends with New Partners. **Develop Neurobiol.** **70**: 332–338. 2010.

SCHUETTE, M.; WERNER, P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. **Neurosci Lett.** **246**: 53-6. 1998.

SIEGEL, G.J. **Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7th Ed.** Philadelphia: Lippincott-Raven. 2006.

SIMS, B.; CLARKE, M.; NJAH, W.; HOPKINS, E.S.; SONTHEIMER, H. Erythropoietin-induced neuroprotection requires cystine glutamate exchanger activity. **Brain Res. 1321**: 88-95. 2010.

SLOTBOOM, D.J.; KONINGS, W.N. & LOLKEMA, J.S. Structural Features of the Glutamate Transporter Family. **Microbiology Mol Biol Rev. 63**: 293–307. 1999.

SORKIN, A.; von ZASTROW. Signal Transduction and Endocytosis: Close Encounters of Many Kinds. **Nature. 3**: 600-614.2002.

STOOP, R.; POO, M-N. Synaptic Modulation by Neurotrophic Factors: Differential and Synergistic Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor. **J Neurosci. 76**: 3256-3264. 1996.

SUN, X.; XU, X.; WANG, F.; ZHANG, X.; HO, P.C.P.; LIU, H.; QIAN, J.; YU, Z.; LU, H.; XU, W. Nerve Growth Factor Helps Protect Retina in Experimental Retinal Detachment. **Ophthalmologica. 222**: 58–61. 2008.

TAYLOR, S.; SRINIVASAN, B.; WORDINGER, R.J.; ROQUE, R.S. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. **Mol Brain Res. 111**: 189-197. 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol. 39**: 44–84. 2007.

VECINO, E.; HERNÁNDEZ, M.; GARCÍA, M. Cell death in the developing vertebrate retina. **Int J Dev Biol. 48**: 965-974. 2004.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacol Rev. 50**: 335-356. 1998.

WIESMANN, C.; de VOS, A.M. Nerve growth factor: structure and function. **Cell Mol Life Sci. 58**: 748–759. 2001.

WLODEK, L. Beneficial and harmful effects of thiols. **Pol J Pharmacol. 54:** 215–223. 2002.

YAN, Q.; JOHNSON, Jr. E.M. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. **J Neurosci. 8:** 3481–3498. 1988.

YARSKI, M.A.; BRADSHAW, R.A. **Nerve Growth Factor (NGF)**. Baker Heart Research Institute, Melbourne, Australia. University of California, Irvine. 2003.

YERNOOL, D.; BOUDKER, O.; JIN, Y.; GOUAUX, E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. **Nature. 431:** 811-818. 2004.

YOCHKOVA, S.D.; VOUCHIDOLOVA, D.M.; GERASIMOV, I.K. Localization of Nerve Growth Factor During Postnatal Development of the Rat Retina. **J Biomed Clin Res Suppl. 2:** 55-57. 2009.

ZHANG, Y.; MOHEBAN, D.B.; CONWAY, B.R.; BHATTACHARYYA, A.; SEGAL, R.A. Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation. **J Neurosci. 15:** 5671–5678. 2000.

ZWEIFEL, L.S.; KURUVILLA, R.; GINTY, D.D. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. **Nat Rev Neurosci. 6:** 615–625. 2005.

APÊNDICE

Artigo completo publicado em periódico internacional durante o curso de mestrado:

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. *Neurochemical Research*, v. 36, p. 412-418, 2011.

Glutamate Induces Glutathione Efflux Mediated by Glutamate/Aspartate Transporter in Retinal Cell Cultures

T. B. Garcia · K. R. M. Oliveira · J. L. M. do Nascimento ·
M. E. Crespo-López · D. L. W. Picanço-Diniz ·
T. C. Mota · A. M. Herculano

Accepted: 2 December 2010 / Published online: 16 December 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract This study was undertaken in order to characterize the role of the glutamate/aspartate transporter (GLAST) in the glutathione (GSH) efflux induced by glutamate. Our results demonstrated that retinal cell cultures exhibit two mechanisms of GSH release, one Na⁺-independent and other Na⁺-dependent. Glutamate and aspartate induced GSH efflux only in presence of Na⁺. Treatment with PCD (L-trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylate), a transportable glutamate uptake blocker, increased GSH release indicating that GSH can be carried by glutamate transporters in retinal cell cultures. Added to this, treatment with zinc ion cultures, a recognized inhibitor of GLAST blocked GSH efflux evoked by glutamate. Treatment with NMDA antagonist (MK-801) did not have any effect on the GSH release induced by glutamate. These results suggest that glutamate induces GLAST-mediated release of GSH from retinal cell cultures and this could represent an important mechanism of cellular protection against glutamate toxicity in the CNS.

Keywords Glutamate transporters · Glutathione transport · Retina · Zinc ion

T. B. Garcia · D. L. W. Picanço-Diniz · A. M. Herculano (✉)
Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá,
Av. Augusto Corrêa, 01, Belém, Pará 66075-900, Brazil
e-mail: herculano@ufpa.br

K. R. M. Oliveira · J. L. M. do Nascimento · T. C. Mota
Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brazil

M. E. Crespo-López
Laboratório de Farmacologia Molecular; Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

Abbreviations

BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTNB	5,5,8-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
FBS	Fetal bovine serum
GLAST	Glutamate-aspartate transporter
MK-801	(5 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(1)-5-methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> - dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate
PDC	L-trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylate
TNB	Nitrobenzoic acid

Introduction

Under physiological conditions, the regulation of extracellular glutamate levels within the central nervous system (CNS), including the retina, is achieved by a number of high-affinity glutamate transporters located in the cell membrane of neurons and principally, the surrounding glial cells. Five different glutamate transporters GLAST (EAAT1), GLT-1(EAAT2), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 and EAAT5 have already been identified and characterized in distinct areas of CNS. Moreover, it is generally believed that the glial glutamate transporter GLAST mediates the bulk of retina Na⁺- dependent glutamate transport [1–6].

Although there are few works about the involvement of glutamate transporters in the transport of other compounds, previous work, as described by Bouvier et al. [7], have reported that in addition to L-glutamate and D-aspartate, GLAST also mediates the transport of compounds containing sulphhydryl groups (–SH) such as cysteine and cysteinesulphinic acid. Once cysteine is the rate-limiting

substrate of reduced glutathione (GSH) synthesis, we hypothesized the existence of a relationship between GLAST transporter activity and GSH metabolism in the CNS. In this way, the present work aimed to demonstrate that GLAST is able to release GSH into the extracellular environment suggesting an alternative role of GLAST in the GSH metabolism.

GSH is characterized as an endogenous antioxidant and its role as a free radical scavenger is particularly important in the retina since this tissue is extremely vulnerable to oxidative stress because of its high oxygen consumption, high unsaturated fatty acid and exposure to light [8, 9]. Previous studies also have showed that disturbances in GSH homeostasis are implicated in the progression of a number of CNS diseases such as retinal dystrophy, diabetic retinopathy and glaucoma [10–13].

GSH is synthesized intracellularly from its amino acids precursor, glutamate, cysteine and glycine by the ATP requiring cytosolic enzymes, γ -glutamylcysteine synthetase and GSH synthetase. In the intracellular environment, GSH exists mainly as a thiol-reduced form (GSH), however, some is also present in the thiol-oxidized form (GSSG). In contrast to its synthesis, GSH degradation occurs exclusively in the extracellular space by action of the ectoenzyme γ -glutamyl transpeptidase (gGT). Although export of GSH to extracellular space represents the initial and regulatory step for GSH turnover in the CNS, including the retina, the mechanism of GSH release in the CNS is not fully understood.

Several groups have demonstrated that astrocytes export GSH to extracellular space; however, the transporter(s) involved in this process have not been identified yet [14–18]. Studies performed in cultured human retinal pigmented epithelial cells have demonstrated that GSH efflux could be mediated by two different mechanisms, one Na^+ -dependent and another Na^+ -independent. Added to this, Frade et al. [19] reported that glutamate is able to induce increases in the GSH efflux from astrocytes in culture; however, the mechanism that mediates this transport is not still clarified. Based in these reports, we use chick retinal cells cultures as experimental model to demonstrate, for the first time, the possible involvement of GLAST in the GSH release induced by glutamate in early stages of retinal cell cultures development.

Experimental Procedure

Materials

Fertilized White Leghorn chicken eggs were obtained from a local hatchery and incubated at 37°C in a humidified atmosphere. Fetal bovine serum (FBS), penicillin and

streptomycin were supplied by Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), glutamine, trypsin, bovine serum albumin (BSA), glutamic acid, aspartic acid, NADPH, Glutathione reductase, 5,5,8-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), MK-801, PDC and [^3H]-D-aspartate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). GSH and EDTA were from Calbiochem (Los Angeles, Calif., U.S.A). Zinc Sulfate (analytical grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of zinc sulfate in Hank's solution were made up fresh on day of use. All other reagents were of analytical grade.

Retinal Cell Cultures

To perform retinal cell cultures chick embryos were used in accordance with animal ethics guidelines [20, 21]. Eyes from 7-day-old chick embryos were removed and transferred to a calcium and magnesium free salt solution (128 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 12 mM Glucose). Retinas were dissected and the tissue was mechanically dissociated and cell suspension was homogeneously distributed on 6-well plastic culture dishes containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin-penicillin. The retinal cells were maintained in an incubator at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air during 2 (C2), 4 (C4), 6 (C6) and 8 (C8) days in culture, until the time of experiments.

Treatment

To study GSH efflux, retinal cells were maintained in the cell incubator at 37°C in sodium-containing or sodium-free Hank's solution (NaCl 128 mM; KCl 4 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 2 mM; Glucose 12 mM; and HEPES 20 mM). In the sodium free solution, NaCl was substituted on equimolar bases by lithium chloride. The cultured cells (C2) were then treated for 1 h with different chemicals, such as amino acids glutamate and aspartate (100 and 500 μM); inhibitors of glutamate transporters, PDC (10, 50 and 500 μM) and ZnSO_4 (100 μM); and NMDA receptor antagonist, (5*R*,2*S*)-(1)-5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK 801; 50 μM). After incubation time, the GSH content in the extracellular medium was determined.

Determination of Glutathione Levels

Extracellular GSH levels in C2, C4, C6 and C8 cultures were determined after the incubation with Hank's solution (pH 7.4) for 1 h in accordance with the method described by Anderson [22] with few modifications. This procedure

allows to measure spectrophotometrically the total GSH content by the reduction of 5,5,8-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in nitrobenzoic acid (TNB). In this reaction, the buffer removed from the cells is incubated with PBS/EDTA (1 mM); GSH reductase (100U/ml) and NADPH (enzyme cofactor; 4 mM). After 15 min, DTNB (5 mM) was added to the reaction to measure the total levels of GSH produced. In order to evaluate the Na⁺-dependent or Na⁺-independent GSH release, sodium chloride (NaCl) was replaced by lithium chloride (LiCl) in Hank's solution as described above. In our results, GSH level was determined in nmol per mg of protein and the values expressed in percent of the control. Total protein was measured by Lowry's method [23].

³H-D-Aspartate Uptake

In order to evaluate if zinc treatment was able to block aspartate transport in retinal cultures, we performed ³H-D-aspartate uptake assay. In this way, after the treatment with zinc sulfate (100 μM) for 1 h, retinal cell cultures (C2) were incubated with ³H-aspartate (1 μCi/mL) during 5 min. All uptake assays were performed at 37°C and the transport was stopped by rapidly raising the cells three times with ice-cold Hank's solution. After that, cells were lysed with 5% TCA and the radioactivity presented into the cells was determined by liquid scintillation (18 mM Difenyloxazol + 0,27 mM 1,4 bis 2-5-difenyloxazol-benzen + 1L toluene) and the values expressed as percentage of control (CPM range:1,000–8,000 counts per minutes).

Statistical Analysis

All experiments were conducted in duplicate or triplicate repeated 3–4 times. Data were expressed as means ± SD of percent of control. Statistical analysis was performed by ANOVA one way followed by Tukey–Kramer post-test. The analyses were performed by BIOSTAT 4.0.

Results

GSH Efflux in Different Periods of In Vitro Retinal Cell Development

To characterize the presence of different GSH release systems during in vitro retinal cells development, we measured GSH levels in the media of cultures with 2 (C2), 4 (C4), 6 (C6) and 8 (C8) days in the presence or absence of sodium as described in methods. Our results demonstrated the presence of two mechanisms of GSH efflux, one Na⁺-dependent and other Na⁺-independent in all evaluated periods (Fig. 1). We also observed that the total levels of

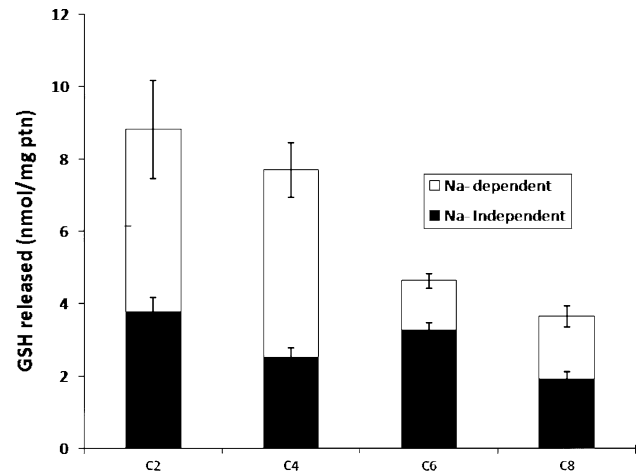


Fig. 1 Time course of the GSH release from retinal cells maintained for 2 (C2), 4 (C4), 6 (C6) and 8 (C8) days in vitro. Culture cells were incubated in Na⁺-containing (NaCl) or Na⁺-free (LiCl) incubation buffers for 1 h and extracellular GSH levels were expressed in nmol/mg of protein

GSH released in the extracellular media decreased significantly during retinal culture development. Analysis of Na⁺-dependent and Na⁺-independent components in different stages of retinal culture showed a decrease in the Na⁺-dependent efflux and minor changes in Na⁺-independent efflux. Once Na⁺-dependent efflux was more abundant in early stages, C2 was selected to run out all the next experiments that aimed to characterize the nature of GSH Na⁺-dependent release.

GSH Efflux After Treatment With Glutamate or Aspartate

In order to evaluate the effect of glutamate (Glu) or aspartate (Asp) in the GSH efflux, retinal cultures were treated with 100 μM and 500 μM of Glu or Asp (Fig. 2). Our results demonstrated that Glu or Asp at 100 μM induced a significant increase in GSH release (about 25%), this effect was more intense after treatment with Glu and Asp at 500 μM (about 40%).

We also analyzed whether glutamate treatment was able to evoke changes in GSH efflux through of Na⁺-independent glutamate transporter. As observed in Fig. 3, Glu treatment did not alter the GSH efflux in media without sodium, suggesting that GSH release induced by Glu is mediated by a Na⁺-dependent transport.

Since it was demonstrated that glutamate-induced GSH efflux is mediated by Na⁺-dependent mechanism, we performed a treatment of retinal cell cultures (C2) with different concentrations of PDC (10, 50 and 500 μM), a transportable inhibitor of Na⁺-dependent glutamate transport. Our results have demonstrated that PDC induced a dose-dependent increase of GSH efflux, but had no effect

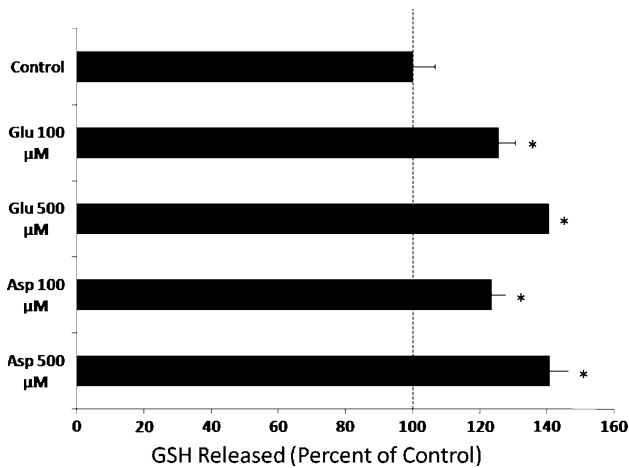


Fig. 2 Glutamate or aspartate induced increase in extracellular GSH in primary retinal cell cultures. Retinal cells (C2) were incubated with or without 100 and 500 μM glutamate or aspartate in Hank’s solution for 1 h. Glutamate or aspartate induced a marked increase in extracellular GSH when compared with control cells. Results were expressed in percent of control (n = 3–6 different cell culture, ANOVA post-test Tukey **P* < 0.05 glutamate or aspartate conditions vs control)

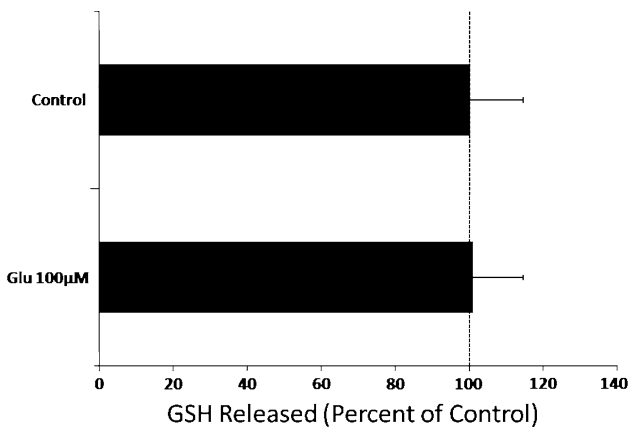


Fig. 3 Effect of glutamate treatment in GSH release from retinal cell cultures maintained in media without sodium. Glutamate did not have any effect on extracellular GSH levels in chick embryo retina cells, when cells were incubated in the absence of sodium. Retinal cells (C2) were incubated with or without 100 μM glutamate in Na⁺-free (LiCl) incubation buffers for 1 h and extracellular GSH quantified (n = 3–6 different cell culture, ANOVA post-test Tukey **P* < 0.05 control vs. glutamate)

on cell death (data not showed), suggesting that glutamate transporters are able to release GSH in retinal cell cultures (Fig. 4).

Evaluation of GLAST on GSH Efflux

Many studies have described that GLAST represents the main glutamate transporter in the CNS, in this way; we treated retinal culture (C2) with zinc sulfate a known

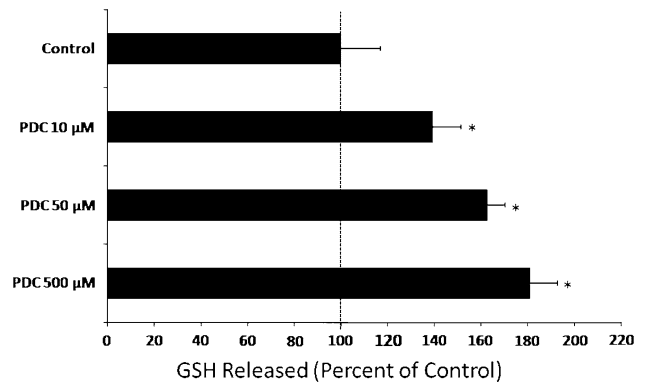


Fig. 4 Effect of PDC on the GSH release from chick embryo retina cells after 1 h of incubation. Data demonstrated a concentration-dependent effect of PDC treatment in the GSH release from cell cultures. (n = 6 separate wells from the same retinal culture, ANOVA post-test Tukey **P* < 0.05 control vs. PDC conditions)

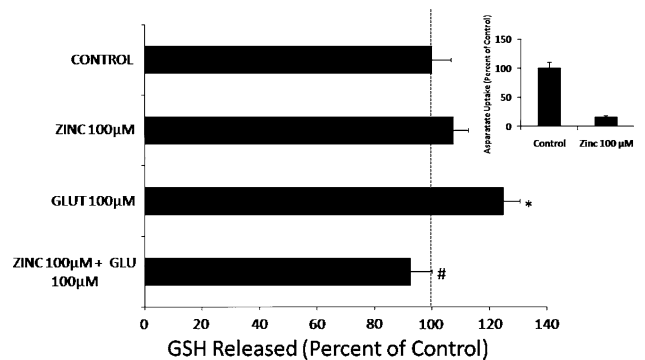


Fig. 5 Effect of Zn²⁺ on glutamate-induced GSH release from retinal cells. In A primary cultures were incubated with 100 μM glutamate for 1 h in the absence or presence of 100 μM Zn²⁺ as described in the methods and B represents the effect of Zn²⁺ treatment in the [³H]-aspartate uptake. (n = 6 separate wells from the same retinal culture, ANOVA post-test Tukey **P* < 0.05 control vs. treatment)

inhibitor of GLAST activity. Our experiments demonstrated that zinc treatment blocked the GSH release induced by glutamate in retinal cultures (Fig. 5). As a positive control of the zinc effect in glutamate uptake, ³H- aspartate assay uptake was carried out in retinal cultures and the results were demonstrated in the insert of Fig. 5.

We also analyzed a possible relation of NMDA glutamate receptor activation in the GSH release induced by glutamate. As observed in Fig. 6, treatment with antagonist of NMDA receptors, MK-801, did not revert the glutamate effect in GSH release.

Discussion

Several works in the literature point out to the importance of antioxidant defense in the retina by exogenous and endogenous compounds against oxidative injuries

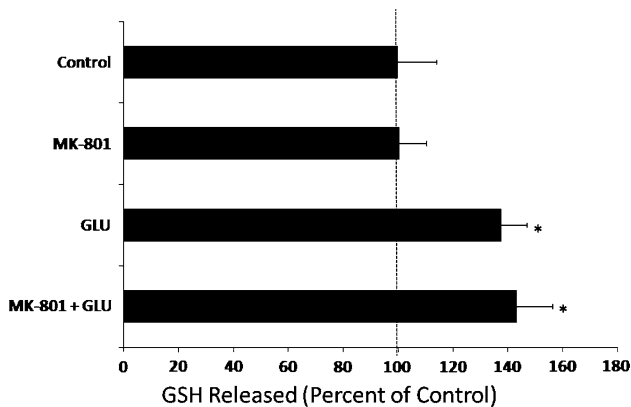


Fig. 6 Effect of NMDA glutamate receptor antagonist, MK-801, on the GSH release. Data showed no effect of MK-801 on the GSH release induced by glutamate in retinal cell cultures. ($n = 6$ separate wells from the same retinal culture, ANOVA post-test Tukey $*P < 0.05$ control vs. treatment)

[8, 24–26]. Among these, the endogenous antioxidant GSH, which is present in the retina in high concentrations, plays an important function [27].

GSH transport has been studied extensively in several tissues such as liver, lung, kidney, intestine, brain and these studies have shown that GSH transport occurs by a carrier-mediated process [28–31]. In reference to visual system, the present work has identified the presence of Na^+ -independent and Na^+ -dependent GSH transport in different *in vitro* retinal cell stages. These observations are in agreement with a couple of works performed by Kannan et al. [32, 33] which demonstrated the presence of two mechanisms of GSH transport, one Na^+ -independent and other Na^+ -dependent, in cultured human retinal pigment epithelial cells (HRPE). Similar mechanisms were described to the transport of cystine in the CNS, which turns to be essential to the synthesis of the intracellular GSH [34].

Added to this, we also evaluated the GSH release in different stages of *in vitro* retinal cell development. Curiously, our data showed that only GSH efflux mediated by Na^+ -dependent component changes in the analyzed periods. These results suggest that activity or expression of Na^+ -dependent GSH transporter could be regulated during retinal development, however, additional experiments need to be performed to clarify this hypothesis.

Previous reports describe the importance of GSH in extracellular environment for the *de novo* synthesis in neurons [35, 36], however, no study described the nature of Na^+ -dependent GSH transporter in the central nervous system. Frade et al. [19] have recently demonstrated that glutamate is able to induce GSH release in cultured astrocytes, being this effect independent of GSH synthesis or glutamate receptor activation. These results led us to take into consideration the involvement of Na^+ -dependent

glutamate transporters in the GSH release induced by glutamate in the central nervous system, since our results demonstrated that glutamate treatment induces GSH release in retinal cell cultures only in the presence of sodium. One additional finding that strengthened our hypothesis was that PDC, a transportable blocker (competitive inhibitor) of Na^+ -dependent glutamate transporter, induced an increase in GSH efflux from the retinal cell cultures [37]. Data reported above suggest that an exchange between glutamate and GSH across the Na^+ -dependent glutamate transporters could happen during glutamate treatment. In fact, studies performed by Ohta et al. [38] have shown that PDC is able to evoke glutamate release from astrocytes in culture, but not in neurons. These findings corroborated to our idea that PDC evoked GSH release across Na^+ -dependent glutamate transporters in retinal cultures.

In addition, compounds known as substrates/inhibitors of glutamate transporters such as D-aspartate, PDC, and DL-TBOA have been implicated in the redistribution of GLAST from cytoplasm to the cell membrane [39]. Hypothetically, such changes in the distribution of GLAST could also be induced by glutamate and increase GSH efflux. Whether this regulation of GLAST expression contributes to the elevated GSH release from retinal cells in the presence of glutamate remains to be elucidated.

In reference to glutamate transport in the retinal cells, many studies describe that astrocytes and Muller cells remove the majority of glutamate from extracellular sites [40]. Based in these reports, the present work investigated the role of GLAST in the GSH release induced by glutamate in retinal cultures, since previous studies also have demonstrated that GLAST or EAAT1 represents major glutamate transporter in retinal Muller cells [1]. In fact, our results showed that zinc ion, a potent inhibitor of GLAST [41–43], blocks GSH release induced by glutamate in retinal cells cultures suggesting the involvement of GLAST in this phenomenon. In accordance with Frade et al. [19] we also showed that GSH release induced by glutamate or aspartate was not associated with N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor stimulation in retinal cell cultures.

In summary, our results describe that GSH efflux can be mediated by Na^+ -dependent transporter which change its activity during retinal culture development. We also showed, for the first time, that glutamate induces GSH efflux in the early stages of retinal cell cultures across GLAST glutamate transporter suggesting a possible anti-transport of glutamate and GSH. The capacity of GLAST to transport GSH induced by glutamate elucidate an important mechanism of cellular protection against oxidative stress associated with glutamate toxicity in the central nervous system including retina.

Acknowledgments We would like to thank Makarú LTDA for supplying chicken eggs used in this work. This project was financially supported by CNPq and FAPESPA.

References

- Otori Y, Shimada S, Tanaka K et al (1994) Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 27: 310–314
- Derouiche A, Rauen T (1995) Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42:131–143
- Rauen T, Rothstein JD, Wässle H (1996) Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 286:325–336
- Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC (1997) Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res* 744:129–137
- Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K et al (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 291:19–31
- Rauen T (2000) Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19:53–62
- Bouvier M, Müller BA, Szatkowski M et al (1991) Electrogenic uptake of sulphur-containing analogues of glutamate and aspartate by Müller cells from the salamander retina. *J Physiol* 444:441–457
- Handelman GJ, Dratz EA (1986) The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant induced damage. *Adv Free Rad Biol Med* 2:1–89
- Tanito M, Nishiyama A, Tanaka T et al (2002) Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photo-oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2392–2400
- Smythies JR (1997) Oxidative reactions and schizophrenia: a review-discussion. *Schizophr Res* 24:357–364
- Jenner P (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13:24–34
- Jenner P, Olanow CW (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:72–84
- Jellinger KA (1999) The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14:115–140
- Yudkoff M, Pleasure D, Cregar L et al (1990) Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N]glutamate. *J Neurochem* 55:137–145
- Sagara J, Makino N, Bannai S (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 66:1876–1881
- Dringen R, Kranich O, Hamprecht B (1997) The gamma-glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res* 22: 727–733
- Hirrlinger J, Schulz JB, Dringen R (2002) Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 69: 318–326
- Stewart VC, Stone R, Gegg ME et al (2002) Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J Neurochem* 83:984–991
- Frade J, Pope S, Schmidt M et al (2008) Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes: a possible neuroprotective mechanism? *J Neurochem* 105:1144–1152
- Kubrusly RCC, de Mello MC, de Mello FG (1998) Aspartate as a selective NMDA receptor agonist in cultured cells from the avian retina. *Neurochem Int* 32:47–52
- de Almeida OMMS, Gardino PF, Santos NEL et al (2002) Opposite roles of GABA and excitatory amino acids on the control of GAD expression in cultured retina cells. *Brain. Research* 925: 89–99
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113: 548–555
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Hayes KC (1974) Retinal degeneration in monkeys induced by deficiencies of vitamin E or A. *Invest Ophthalmol* 13:499–510
- Organisciak DT, Wang HM, Li ZY et al (1985) The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. *Invest Ophthalmol* 26:1580–1588
- Sternberg P Jr, Lopez PF, Capone A Jr et al (1992) Management of threshold retinopathy of prematurity. *Retina* 12:60–63
- Winkler BS, Giblin FJ (1983) Glutathione oxidation in retina: effects on biochemical and electrical activities. *Exp Eye Res* 36:287–297
- Lash LH, Jones DP (1984) Renal glutathione transport. Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane. *J Biol Chem* 259:14508–14514
- Hagen TM, Jones DP (1987) Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat. *Am J Physiol* 252:607–613
- Kannan R, Kuhlmann JF, Jeandier E et al (1990) Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest* 85:2009–2013
- Ballatori N, Dutczak WJ (1994) Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* 269: 19731–19737
- Kannan R, Mittur A, Bao Y et al (1999) GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *J Neurochem* 73:390–399
- Kannan R, Tang D, Hu J et al (2001) Glutathione transport in human retinal pigment epithelial (HRPE) cells: apical localization of sodium-dependent gsh transport. *Exp Eye Res* 72:661–666
- McBean GJ (2002) Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol Sci* 23:299–302
- Wang XF, Cynader MS (2000) Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem* 74:1434–1442
- Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *J Biol Chem* 384:505–516
- Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW et al (1991) Conformationally Defined Neurotransmitter Analogues. Selective Inhibition of Glutamate Uptake by One Pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate Diastereomer. *J Med Chem* 34:717–725
- Ohta K, Nomura T, Kanno T et al (2002) L-trans-PDC enhances hippocampal neuronal activity by stimulating glial glutamate release independently of blocking transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 295:376–381
- Shin J-W, Nguyen KTD, POWDV et al (2009) Distribution of Glutamate Transporter GLAST in Membranes of Cultured Astrocytes in the Presence of Glutamate Transport Substrates and ATP. *Neurochem Res* 34:1758–1766

40. Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B et al (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54:143–160
41. Spiridon M, Kamm D, Billups B et al (1998) Modulation by zinc of the glutamate transporters in glial cells and cones isolated from the tiger salamander retina. *J Physiol* 506:363–376
42. Vandenberg RJ, Mitrovic AD, Johnston GA (1998) Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. *Mol Pharmacol* 54:189–196
43. Gether U, Andersen PH, Larsson OM et al (2006) Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 27:375–383