



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: FISILOGIA

RENATO JOSÉ LIRA FERREIRA

**EFEITOS DA AUSÊNCIA DE GLICOSE E GLICOSE E
OXIGÊNIO SOBRE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS E
RETINA INTERNA DO PRIMATA DO
NOVO MUNDO *Callithrix jacchus***

Recife-PE

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: FISILOGIA

Renato José Lira Ferreira

**EFEITOS DA AUSÊNCIA DE GLICOSE E GLICOSE E
OXIGÊNIO SOBRE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS E
RETINA INTERNA DO PRIMATA DO
NOVO MUNDO *Callithrix jacchus***

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia.

ORIENTADOR:

Prof^a. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

CO-ORIENTADOR:

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Departamento de Medicina Tropical

Recife-PE

2004

Ferreira, Renato José Lira

Efeitos da ausência de glicose e glicose e oxigênio sobre neurônios gabaérgicos e retina interna do primata do Novo Mundo *Callithrix jacchus* / Renato José Lira Ferreira. – Recife : O Autor, 2004.

98 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Neurofisiologia. 2. Isquemia retiniana – Repercussões sobre a retina interna, neurônios gabaérgicos e células de Müller. 3. Retina interna – Avaliação imunohistoquímica e histopatológica . I. Título.

591.1
573.88

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2004-217

RENATO JOSÉ LIRA FERREIRA

**EFEITOS DA AUSÊNCIA DE GLICOSE E GLICOSE E
OXIGÊNIO SOBRE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS E
RETINA INTERNA DO PRIMATA DO
NOVO MUNDO *Callithrix jacchus***

BANCA EXAMINADORA:


PROF. DR. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E MORFOLOGIA, UFRPE

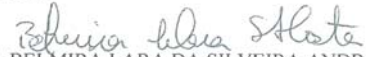

PROF. DR. FRANCISCO DE ASSIS CORDEIRO BARBOSA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA, UFPE


PROF. DR. MOHAMMED SAAD LAHLOU

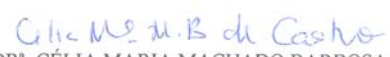
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA, UFPE

ORIENTADOR:


PROFª. DRª. BELMIRA LARA DA SILVEIRA ANDRADE DA COSTA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA, UFPE

CO-ORIENTADOR:


PROFª. DRª. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL, UFPE

ORIENTADOR:

PROFª. DRª. BELMIRA LARA DA SILVEIRA ANDRADE DA COSTA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA, UFPE

CO-ORIENTADOR:

PROFª. DRª. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL, UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos ***Victor*** e ***César***, sempre presentes em meus pensamentos e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Danielle, pelo seu amor, pelo incentivo e pela compreensão pelas horas dedicadas a este trabalho.

Aos meus pais, Joel e Marlene, pelo amor, apoio e exemplo, e aos meus irmãos Rodolfo, Roberta e Rachel, pelo carinho irrestrito.

À Prof^a Belmira, pelas orientações neste trabalho, dedicação à Ciência, pela seriedade, abnegação e paciência. Sua humildade, correção e retidão de princípios foram um exemplo à parte em nossa convivência. Foi no mínimo um privilégio estar sob sua orientação; muito me honra ser objeto de seu respeito e de sua amizade.

Aos colegas de laboratório, pelo saudável e alegre convívio: Bruno César, Jader Macedo, Carlos Figueiroa, Cristina Vilela, Gilberto Oliveira e Esmeraldo Mendonça.

Aos professores Reginaldo Silva, Valdir Luna, Célia Castro, Alex Benício, Diógenes Mota, Saad Lahlou, Glória Duarte, Rubem Guedes, Alexandre Menezes (UFRN), Raul Manhães, Nicodemos Pontes, Luciano Montenegro e Roberto Melo pelas orientações, sugestões e cortesia, e a todos os professores do Dept^o de Fisiologia e Farmacologia.

A todos os funcionários do Dept^o de Fisiologia e Farmacologia.

Às Sras. Zenira Xavier e Fátima Diniz (LIKA), e aos Srs. Roni Evêncio, Luiz Felipe Viegas (LIKA) e Mineo Nakazawa (CPqAM) pela inestimável ajuda e pelo suporte técnico, além dos Srs. Jorge Silva e Flávio Castro pela colaboração no manuseio dos animais.

À Sra. Silvânia Paz pelo grande auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Ao Sr. Raimundo Pimentel pela valiosa orientação e colaboração na confecção do material fotográfico.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra ajudaram, colaboraram e influenciaram na execução deste trabalho, e que não foram citadas; isso não torna menor minha gratidão.

EPÍGRAFE

Enquanto o homem pensa, Deus ri.

Provérbio árabe.

RESUMO

Sob condições fisiológicas o aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da retina, mas em situações patológicas tais como a isquemia ele pode atuar como uma neurotoxina, promovendo despolarização excessiva e dano neuronal a partir da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Neste estudo analisamos os efeitos excitotóxicos agudos induzidos pela ausência de glicose ou ausência de glicose e oxigênio (isquemia simulada *in vitro*) na retina do primata do Novo Mundo *Callithrix jacchus*. Foram utilizadas preparações isoladas de retina, submetidas às condições de controle, ausência de glicose ou isquemia simulada por 45 ou 60 minutos. Na condição isquêmica, foram estudados os efeitos de um inibidor de transportador de GABA (guvacina), da presença de 10 mM de Mg^{2+} no meio extracelular e da adição conjunta de antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos NMDA e não-NMDA. A integridade retiniana foi avaliada a partir de cortes transversais corados com hematoxilina/eosina ou azul de toluidina; cortes transversais da retina foram processados para identificar o padrão imuno-histoquímico de distribuição do GABA e a imunorreatividade à proteína S-100 das células de Müller. Os resultados indicaram que a ausência de glicose no meio extracelular não alterou a estrutura retiniana, mas induziu a liberação de GABA a partir dos neurônios e a recaptação do mesmo pelas células de Müller. A ausência de glicose e oxigênio promoveu desorganização da retina caracterizada pela presença de edema nas camadas nucleares e plexiformes, vacuolização em vários corpos celulares além de uma expressiva liberação de GABA e recaptação pelas células de Müller. Nestas últimas foram evidenciados sinais de edema. A adição conjunta de antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou 200 μ M de guvacina ou ainda a presença de 10 mM de Mg^{2+} no meio extracelular reduziram os efeitos agudos da isquemia simulada sobre a integridade do tecido retiniano mas não foram capazes de prevenir completamente a liberação de GABA a partir dos neurônios. Os resultados sugerem que na retina do *Callithrix jacchus* os efeitos induzidos pela isquemia *in vitro* envolvem a participação aditiva de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, de transportadores de GABA e possivelmente do influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem.

ABSTRACT

Under physiological conditions the amino acid glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the retina, but in ischemia-like situations it acts as a neurotoxin, promoting massive depolarization and neuronal damage via activation of ionotropic glutamate receptors. The present study investigated the acute excitotoxic effects of lack of glucose or glucose and O₂ in the retina of the New World monkey *Callithrix jacchus* and their repercussions on GABAergic neurons. Isolated retinal preparations were submitted during 45 or 60 minutes to glucose or glucose/O₂ deprivation, in the presence of 10 μ M MK-801 plus 50 μ M CNQX or 20 μ M MK-801 plus 100-200 μ M DNQX or 200 μ M guvacine-HCl (an inhibitor of GABA transporter) or 10 mM Mg²⁺ in the perfusion medium. The effects on retinal integrity were evaluated on transverse sections stained with hematoxylin/eosin or toluidine blue and the alterations in the GABA distribution in the tissue were analyzed by an immunocytochemical approach. The identification of Müller cells in ischemic or glucose-deprivation conditions was performed by immunoreactivity to the glial intermediate filament S-100. The results indicated that glucose deprivation did not alter the retina structure but induced GABA release from the neurons and simultaneous uptake by Müller cells. Glucose/O₂ deprivation induced a marked disorganization in retina architecture, especially edema, vacuolization in the nuclear and plexiform layers and expressive GABA release from the neurons. The combined addition of NMDA and non-NMDA antagonists, or 200 μ M guvacine or 10 mM Mg²⁺ were able to greatly reduce the effects of simulated ischemia in the retinal integrity, but were not able to completely prevent the release of GABA from the neurons. Müller cells did not show detectable alterations in their structure but signs of edema were detected. The data suggest that in *Callithrix jacchus* retina the excitotoxic effects of a simulated ischemia involve the additive participation of ionotropic glutamate receptors, GABA transporters and possibly Ca²⁺ influx through voltage-gated channels.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

INTRODUÇÃO	Pág.
Figura 1: imagem digitalizada de corte transversal de retina de <i>Callithrix jacchus</i>	13
Figura 2: esquema de sinapse de neurônio GABAérgico	17
Figura 3: esquema de interação entre neurônio GABAérgico e célula de Müller	19
Figura 4: esquema de fenômenos secundários à isquemia aguda na retina	21
Figura 5: esquema de fenômenos secundários à isquemia e potenciais estratégias terapêuticas	23
 MATERIAIS E MÉTODOS	
Figura 6: olho enucleado de espécime de <i>Callithrix jacchus</i>	88
Figura 7: esquema de dissecação retiniana do S2 – S10	89
Figura 8: esquema de dissecação retiniana do S1	90
Figura 9: imagem digitalizada do sistema de distribuição de gases	93
Tabela 1: número, distribuição e tratamentos aplicados aos segmentos retinianos	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

NA INTRODUÇÃO E MATERIAIS E MÉTODOS

AAT: alanina-aspartato amino transferase

ADN: ácido desoxirribo-nucleico

α -KG: alfa-cetoglutarato

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

ARNm: ácido ribo-nucleico mensageiro

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos

CCDV: canal de cálcio dependente de voltagem

CCG: camada de células ganglionares

CFO: camada de fibras ópticas

CFR: camada de fotorreceptores

CNE: camada nuclear externa

CNI: camada nuclear interna

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

CPE: camada plexiforme externa

CPI: camada plexiforme interna

DAB: diaminobenzidina

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

GABA: ácido gama-aminobutírico

GABA-T: GABA-transaminase

GAD: glutamato descarboxilase

G'ase: glutaminase

GDH: glutamato desidrogenase

GLT1: transportador de GABA tipo 1

GLU: glutamato

GMPC: guanosina-monofosfato cíclico

GS: glutamina sintetase

HE: coloração com hematoxilina-eosina

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

KA: ácido caínico

MK-801: maleato de 5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOSi: sintase do óxido nítrico

PA: paraformaldeído

TF: tampão fosfato

SSADH: succinato-semialdeído-desidrogenase

SST: solução salina tamponada

SUC: succinato

TCA: ácido tricarboxílico

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS	
NA INTRODUÇÃO E MATERIAIS E MÉTODOS	X
SUMÁRIO	12
 I. INTRODUÇÃO	 13
I.1 - Organização morfo-funcional da retina	13
I.2 - Importância dos aminoácidos glutamato e GABA na retina	15
I.2.1 Atuação como neurotransmissores	15
I.2.2 Interações metabólicas entre glutamato e GABA	16
I.3 - Repercussões da isquemia na retina e mecanismos de neurotoxicidade	19
I.4 - Mecanismos de neurotoxicidade induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos durante o insulto isquêmico	24
I.4.1 Em retinas de pintos e mamíferos não primatas	24
I.4.2 Em retinas de primatas	25
I.5 - Efeitos da isquemia sobre o sistema GABAérgico da retina	27
I.6 - Justificativa do presente estudo	30
II. OBJETIVOS	33
II.1 - Objetivo geral	
II.2 - Objetivos específicos	
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
IV. MANUSCRITO SUBMETIDO	53
V. CONCLUSÕES	86
VI. ANEXOS: A) Materiais e Métodos	87
B) Parecer do Comitê de Ética	98

I) INTRODUÇÃO

I.1) ORGANIZAÇÃO MORFO-FUNCIONAL DA RETINA

A retina é o tecido neural responsável pelo processamento inicial dos sinais visuais e por sua transmissão ao cérebro. O arranjo estrutural da retina de vertebrados é largamente conhecido, estando os grupos celulares dispostos em camadas nucleares, alternadas às camadas plexiformes onde as sinapses ocorrem predominantemente. Partindo-se da face escleral em direção à câmara vítrea, encontram-se: a camada de segmentos externos e internos dos fotorreceptores, a camada nuclear externa (onde se encontram os núcleos dos fotorreceptores) e as camadas plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, de células ganglionares e de fibras ópticas (figura 1).

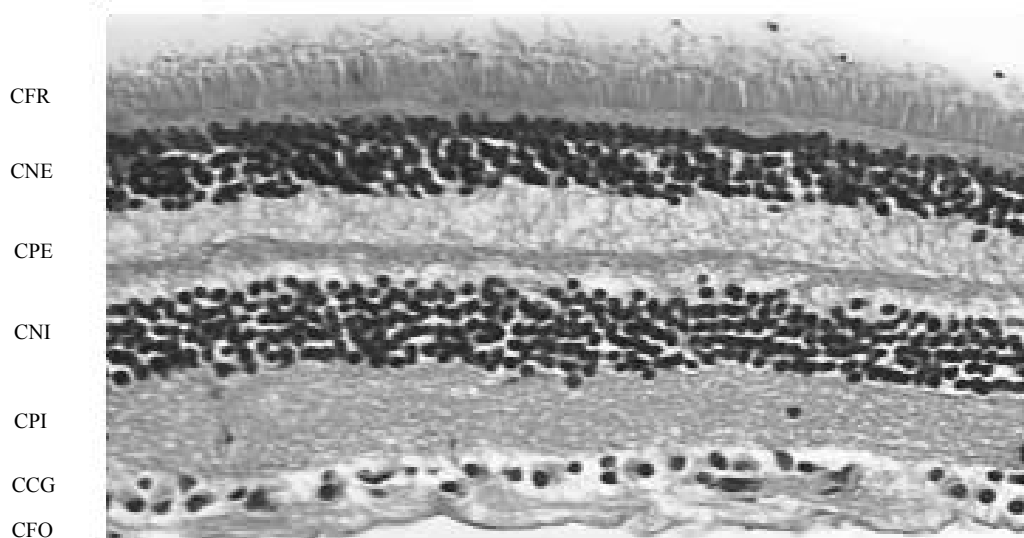


Figura 1. Imagem digitalizada de corte transversal de retina de *Callithrix jacchus*, evidenciando as diversas camadas. CFR: camada de fotorreceptores; CNE: camada nuclear externa; CPE: camada plexiforme externa; CNI: camada nuclear interna; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares; CFO: camada de fibras ópticas.

Os fotorreceptores - cones e bastonetes - efetuam a transdução do estímulo luminoso em impulso elétrico, através de uma cascata de reações químicas que envolvem a participação de fosfodiesterases, com hidrólise do GMPc (MASSEY e MAGUIRE, 1995). Os

fotorreceptores fazem sinapses com neurônios de segunda ordem, que são as células bipolares e as células horizontais. As células bipolares fazem contato sináptico com as células amácrinas, interplexiformes e as células ganglionares, e são os axônios destas últimas que formam a camada de fibras ópticas, que se agrupam para formar o nervo óptico. As células horizontais, interplexiformes e amácrinas atuam como interneurônios envolvidos em mecanismos de feedback e regulação dos sinais.

A camada de fibras nervosas é composta de axônios das células ganglionares e de astrócitos, e a membrana limitante interna não é propriamente uma camada, mas sim uma modificação da superfície da geléia vítrea associada a processos expansivos de um tipo especial de células da glia conhecidas como células de Müller (BLANKS, 1994). As principais funções realizadas na retina compreendem a transdução do sinal luminoso, a codificação através de canais funcionais ativados (“ON”) ou inibidos (“OFF”) pelo estímulo luminoso, sensibilidade cromática, ao contraste e a movimentos e adaptação às diferentes condições de luminosidade (WÄSSLE, 1991; MILLER, 1994 e SCHILLER, 1995).

Os astrócitos, e particularmente as células de Müller desempenham funções importantes na homeostase das sinapses, mantendo as concentrações de neurotransmissores (em especial o glutamato e o ácido γ -aminobutírico - GABA) em níveis fisiológicos no espaço extracelular (NAPPER *et al.*, 1999). Evidências eletrofisiológicas também indicam que as células da glia são capazes de modular a atividade neuronal na retina (NEWMAN e ZAHS, 1998; NEWMAN, 2004) sendo de fundamental importância para a formação e remodelagem das sinapses, para controlar a eficiência sináptica e coordenar a atividade entre grupos de neurônios (ULLIAN *et al.*, 2001; PFRIEGER, 2002).

I.2) IMPORTÂNCIA DOS AMINOÁCIDOS GLUTAMATO E GABA NA RETINA

I.2.1) Atuação como neurotransmissores

Sob condições fisiológicas o aminoácido L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da retina de vertebrados (MASSEY e MAGUIRE, 1995; SUCHER *et al.*, 1997 e ROCHA *et al.*, 1999). O glutamato não ultrapassa a barreira hemato-encefálica (NICHOLLS, 1994 e DINGLELINE e McBAIN, 1999), portanto tem que ser produzido localmente a partir da glicose e outros precursores. As cadeias enzimáticas necessárias para essa produção são encontradas de forma universal nos neurônios cerebrais e células da glia (DINGLELINE e McBAIN, 1999).

O glutamato ativa o processamento da informação retiniana de fotorreceptores a células ganglionares, através dos canais funcionais ON e OFF (vias diretas) que envolvem a participação das células bipolares (SCHILLER, 1992; BARNSTABLE, 1993 e MASSEY e MAGUIRE, 1995). Na grande maioria das espécies, todos os tipos de células bipolares contêm glutamato, tendo como alvos pós-sinápticos, além das células ganglionares, as células amácrinas e interplexiformes, que atuam como interneurônios moduladores capazes de modificar o ganho das vias diretas (MASSEY e MAGUIRE, 1995).

A divisão funcional da retina é iniciada na sinapse entre um fotorreceptor e sua respectiva célula bipolar, e é preservada até atingir centros visuais superiores (MASSEY e MAGUIRE, 1995). Na via OFF, a célula bipolar no escuro encontra-se relativamente despolarizada pelo glutamato liberado pelo fotorreceptor, e ao se incidir o estímulo luminoso ocorre a hiperpolarização do fotorreceptor e a cessação da liberação do neurotransmissor, ocorrendo então a hiperpolarização da célula bipolar OFF; o fenômeno inverso ocorre com as células bipolares ON. Evidências obtidas em vários estudos indicam que essas respostas

antagônicas são devidas à ocorrência de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos distintos (MURAKAMI, 1975; MONAGHAN *et al.*, 1989 e MASSEY e MAGUIRE, 1995).

A ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos em neurônios retinianos induz a liberação de várias substâncias neuroativas incluindo o GABA (revisão em BERNATH, 1992). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório da retina de vertebrados, sendo sua atividade mediada pela ativação de pelo menos três tipos de receptores conhecidos como GABA_A, GABA_B e GABA_C (ZHANG *et al.*, 1998). Estudos bioquímicos, histoquímicos e eletrofisiológicos têm demonstrado que o GABA atua em várias regiões da retina e está envolvido em diferentes funções nos vários estágios de desenvolvimento deste tecido. Como neurotransmissor inibitório, desempenha um papel fundamental na percepção do contraste, sendo um dos moduladores laterais do ganho das vias diretas estimuladas e inibidas pela luz. Adicionalmente, está também envolvido com o estabelecimento dos circuitos sinápticos ao longo destas vias e com a formação de conexões centrais adequadas pelos axônios das células ganglionares retinianas (WÄSSLE e BOYCOTT, 1991; MESSERSMITH e REDBURN, 1993; FRUMKES *et al.*, 1995; NAG e WADHWA, 1997; NGUYEN-LEGROS *et al.*, 1997; LIM e HO, 1998; REDBURN, 1998 e SANDELL, 1998).

1.2.2) Interações metabólicas entre glutamato e GABA

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, o GABA é expresso antes mesmo do processo de sinaptogênese, podendo atuar como um fator trófico envolvido com a sobrevivência neuronal, proliferação e diferenciação (MADTES e REDBURN, 1983; LOTURCO *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 1998 e CALAZA *et al.*, 2000). Na retina em desenvolvimento GABA pode ser inicialmente sintetizado a partir da putrescina (de MELLO, 1976 e YAMASAKI *et al.*, 1999). No entanto, o maior percentual de síntese na retina madura

está diretamente relacionada ao glutamato em uma reação catalizada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD) que apresenta duas isoformas (GAD₆₅ e GAD₆₇) com diferenças regionais de expressão (MARTIN, 1993) e notável eficiência. Além de sua ação como neurotransmissor, o GABA pode ser usado também como um substrato para a produção de energia, mediante a participação das enzimas GABA-transaminase (GABA-T) e succinato semialdeído desidrogenase (SSADH), que promovem a formação de um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (ver figura 2) (BALÁSZ *et al.*, 1970; PATEL *et al.*, 1970; TILLAKARATNE *et al.*, 1995; HASSEL *et al.*, 1998; OLSEN e DeLOREY, 1999).

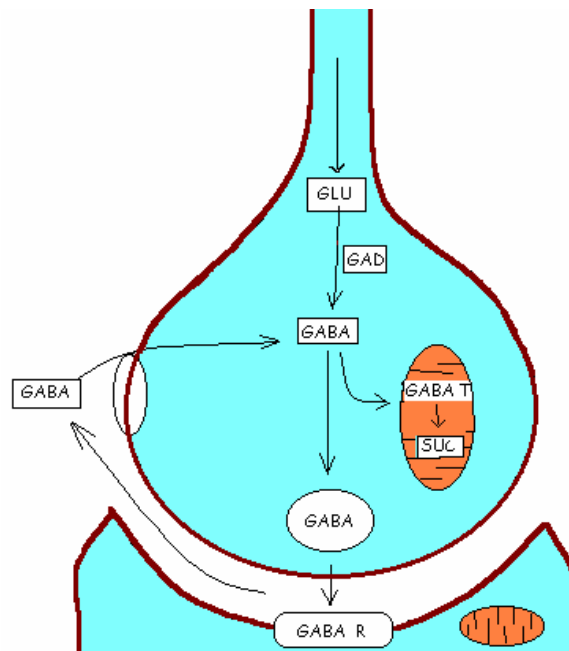


Figura 2: Esquema de sinapse de neurônio GABAérgico, mostrando a formação de GABA a partir de glutamato (GLU), pela ação da glutamato descarboxilase (GAD), e a participação na produção de energia na produção de succinato (SUC), pela ação da GABA-transaminase (GABA-T) e succinato semialdeído desidrogenase (SSADH - não representada).

Como o GABA desempenha ao mesmo tempo atividades como neurotransmissor e como metabólito, admite-se a existência de “compartimentos” funcionais dessas categorias, uma vez que a sua síntese já foi demonstrada ocorrer não só em terminais nervosos, mas também em estruturas como pericário, axônios e dendritos (MARTIN, 1993). As enzimas necessárias ao metabolismo do GABA são encontradas também em células da glia, e na retina

principalmente nas células de Müller (revisão em ROBIN e KALLONIATIS, 1992). Essas células desempenham um importante papel na fisiologia do tecido retiniano, não apenas pelas funções já conhecidas de suporte metabólico, mas também pela relevância da captação do glutamato e do GABA liberados durante a transmissão sináptica, através de sistemas de transportadores de membrana de alta afinidade. A alta eficiência desses sistemas faz com que o rápido *clearance* do glutamato liberado evite seu acúmulo extracelular, minimizando sua ação potencialmente excitotóxica (NAPPER *et al.*, 2001 e KALLONIATIS e NAPPER, 2002). As células de Müller em associação com neurônios permitem a formação de um ciclo bioquímico de síntese e ressíntese de GABA e glutamato, como é possível observar na figura 3. No neurônio, ocorre a formação de glutamato, seja através da glicose ou da glutamina captada; o glutamato é então transformado em GABA pela ação da GAD e liberado pela terminação sináptica, podendo ser recaptado, ativar os receptores pós-sinápticos ou ser captado pela célula de Müller. Nesta célula, o GABA captado sofre a ação da GABA-T, que o transforma em succinato semialdeído, e este é metabolizado a succinato pela ação da sua respectiva desidrogenase. O succinato é um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, que após algumas reações é transformado em α -cetoglutarato e este a glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase. Uma vez formado, o glutamato dentro da célula de Müller pode ser convertido em glutation, glutamina, ou entrar no ciclo do ácido tricarboxílico. A glutamina formada a partir da glutamina sintetase é livre para retornar ao neurônio e novamente formar glutamato, completando o ciclo. O glutation formado atua como um importante antioxidante e na retina é localizado predominantemente nas células de Müller e nas células horizontais. Várias etapas desta interação metabólica entre GABA e glutamato podem ser alteradas em situações de redução de aporte energético, como por exemplo, na isquemia (NAPPER *et al.*, 1999 e KALLONIATIS e NAPPER, 2002).

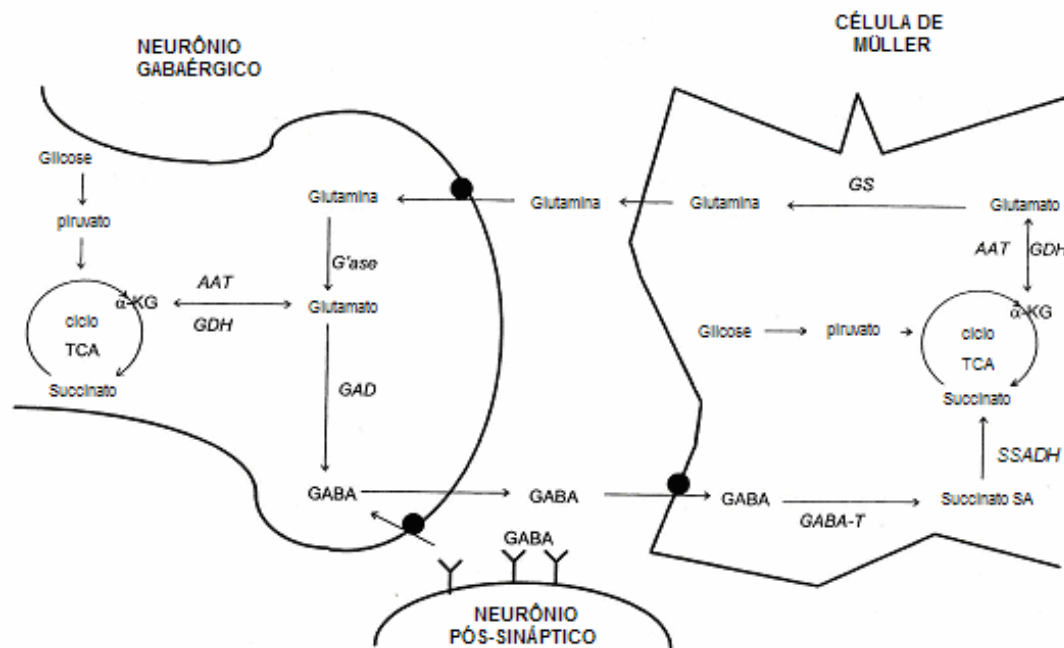


Figura 3: Esquema de interação entre neurônio GABAérgico retiniano e célula de Müller, ressaltando o ciclo bioquímico de síntese e ressíntese de glutamato e GABA (adaptado de UGARTE e OSBORNE, 1998). AAT: alanina-aspartato aminotransferase; α -KG: alfa-cetoglutarato; G'ase: glutaminase; GABA-T: GABA transaminase; GAD: glutamato descarboxilase; GDH: glutamato desidrogenase; GS: glutamina sintetase; SA: semialdeído; SSADH: succinato semialdeído desidrogenase; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico.

I.3) REPERCUSSÕES DA ISQUEMIA NA RETINA E MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE

Além das interações funcionais entre glutamato e GABA na retina, tem sido crescentemente demonstrado na literatura que algumas condições patológicas tais como isquemia, retinopatia diabética, hipertensão ocular e oclusão vascular são capazes de aumentar de forma significativa os níveis de glutamato no meio extracelular, induzindo distúrbios capazes de alterar a função e sobrevivência de neurônios e células da glia (revisão em HICKS *et al.*, 1998). Na maior parte dos vertebrados estudados, os mecanismos de excitotoxicidade induzidos pela liberação excessiva de glutamato na retina parecem envolver a participação efetiva de receptores ionotrópicos. O aumento no influxo de cálcio através destes receptores ionotrópicos parece ser um dos principais mecanismos correlacionados com a neurotoxicidade

aguda (FERREIRA *et al.*, 1996 e SUCHER *et al.*, 1997). No entanto, em algumas situações patológicas, tal neurotoxicidade envolvendo receptores ionotrópicos, influxo de cálcio e morte neuronal pode ocorrer mesmo na ausência de despolarização da membrana (SHEN e SLAUGHTER, 2002). Na retina, foi também demonstrado que a morte celular excitotóxica induzida pela privação de oxigênio e glicose pode também envolver a ativação de receptores para GABA e glicina que mobilizam um fluxo letal de cloreto para o interior das células (CHEN *et al.*, 1998, 1999).

Vários são os mecanismos envolvidos com o processo de morte neuronal induzida por condições patológicas (SUCHER *et al.*, 1997). A seqüência de eventos intracelulares que sobrevêm a condições de redução ou cessação do aporte energético parece ser comum a diversos tipos celulares, entre os quais os neurônios retinianos. A resposta celular à isquemia determina uma redução significativa na produção de ATP mitocondrial, o que acarreta a insuficiência de bombas metabólicas essenciais (Na^+/K^+ -ATPase e bomba de Ca^{2+}) e a ativação de diversos mecanismos lesivos ao metabolismo ou à sobrevivência, afetando diversos componentes celulares interdependentes, tais como as membranas celulares, as mitocôndrias propriamente, o citoesqueleto e o ADN. A produção de dano celular letal ou subletal é dependente do tipo, da intensidade e da duração do evento lesivo, assim como da capacidade resistiva ou regenerativa da célula. Esses fatores podem induzir diferentes danos celulares reconhecidos como necrose e apoptose (OSBORNE *et al.*, 1999 e IENTILE *et al.*, 2001). A participação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos nos mecanismos de neurotoxicidade pode também envolver diferentes mecanismos de ação (ZEEVALK *et al.*, 1995). A transição do glutamato de neurotransmissor para neurotoxina é facilitada quando os níveis de energia celular estão limitados. A omissão de glicose, exclusão de oxigênio ou a inclusão de inibidores da fosforilação oxidativa ou da bomba de sódio e potássio, permitem que o glutamato expresse o seu potencial neurotóxico (NOVELLI *et al.*, 1988 e AMES III e

LI, 1992). Um aumento na concentração extracelular de glutamato diante de um insulto isquêmico reflete não somente um aumento na sua liberação pelo neurônio, mas também um comprometimento no seu sistema de recaptação tanto pelo neurônio como pelas células de Müller (NAPPER *et al.*, 1999; VORWERK *et al.*, 2000 e IZUMI *et al.*, 2003), bem como no seu sistema de degradação. No interior das células de Müller, o glutamato pode ser metabolizado por múltiplas vias; apesar do funcionamento de algumas destas vias ser possível mesmo na ausência de oxigênio, um expressivo percentual desta degradação depende do metabolismo oxidativo (TSACOPOULOS e MAGISTRETTI, 1996 e NAPPER *et al.*, 1999).

A Figura 4 esquematiza alguns dos mecanismos de neurotoxicidade envolvidos na injúria neuronal diante de um insulto isquêmico.

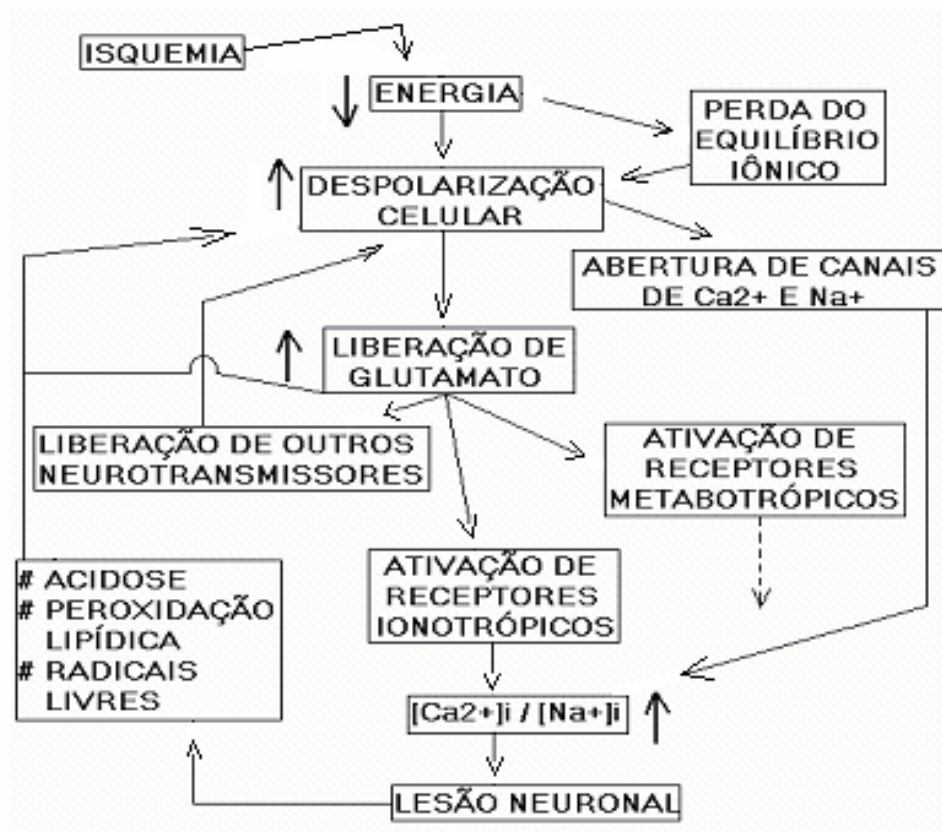


Figura 4: esquema de alterações prováveis secundárias à isquemia aguda na retina; a cascata de fenômenos secundários à ativação de receptores metabotrópicos não está representada

Estratégias de neuroproteção diante de um insulto isquêmico vêm sendo discutidas e estudadas em vários modelos animais (revisões em KAUSHIK *et al.*, 2003 e OSBORNE *et al.*, 1999, 2003). Apesar da enorme complexidade dos fenômenos envolvidos nos mecanismos de preservação neuronal na retina diante de insultos metabólicos, há evidências da participação direta ou indireta de receptores α (LAFUENTE *et al.*, 2001 e WHEELER *et al.*, 2001) e β -adrenérgicos (OSBORNE *et al.*, 1999). A utilização de bloqueadores desses receptores em experimentos com isquemia induzida na retina, e o potencial neuroprotetor demonstrado sugerem haver uma relação funcional e/ou metabólica com receptores NMDA. Adicionalmente, tem sido demonstrado que o efeito neuroprotetor de agonistas adrenérgicos seletivos de receptores β_1 , envolve também um aumento nos níveis de ARNm para o fator neurotrófico derivado do cérebro - BDNF (WOOD *et al.*, 2001) e a redução da atividade da isoenzima neuronal da sintase do óxido nítrico em células ganglionares retinianas (CHEON *et al.*, 2002). Diferentes grupos de agentes neuroprotetores têm sido indicados na literatura. Dentre eles estão a vitamina B6 e derivados (WANG *et al.*, 2002), fatores de crescimento polipeptídicos como o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e gangliosídeos (DREYFUS *et al.*, 1998 e HICKS *et al.*, 1998), peptídeos envolvidos no metabolismo de íons como cobre e zinco (HORNING *et al.*, 2000) e bloqueadores de canais de Ca^{2+} do tipo L, dependentes de voltagem (MELENA e OSBORNE, 2001). De uma maneira geral, as várias estratégias de neuroproteção que vêm sendo discutidas envolvem mecanismos capazes de:

- a) atenuar a excitotoxicidade mediada pelo glutamato;
- b) reduzir os efeitos deletérios dos radicais livres;
- c) reduzir as alterações na homeostase do íon Ca^{2+} ;
- d) reduzir o influxo de Na^+ ;
- e) minimizar a injúria mitocondrial nas células retinianas;
- e) potencializar os mecanismos de neuroproteção endógena.

A figura 5 esquematiza os principais alvos para estratégias de neuroproteção na retina.

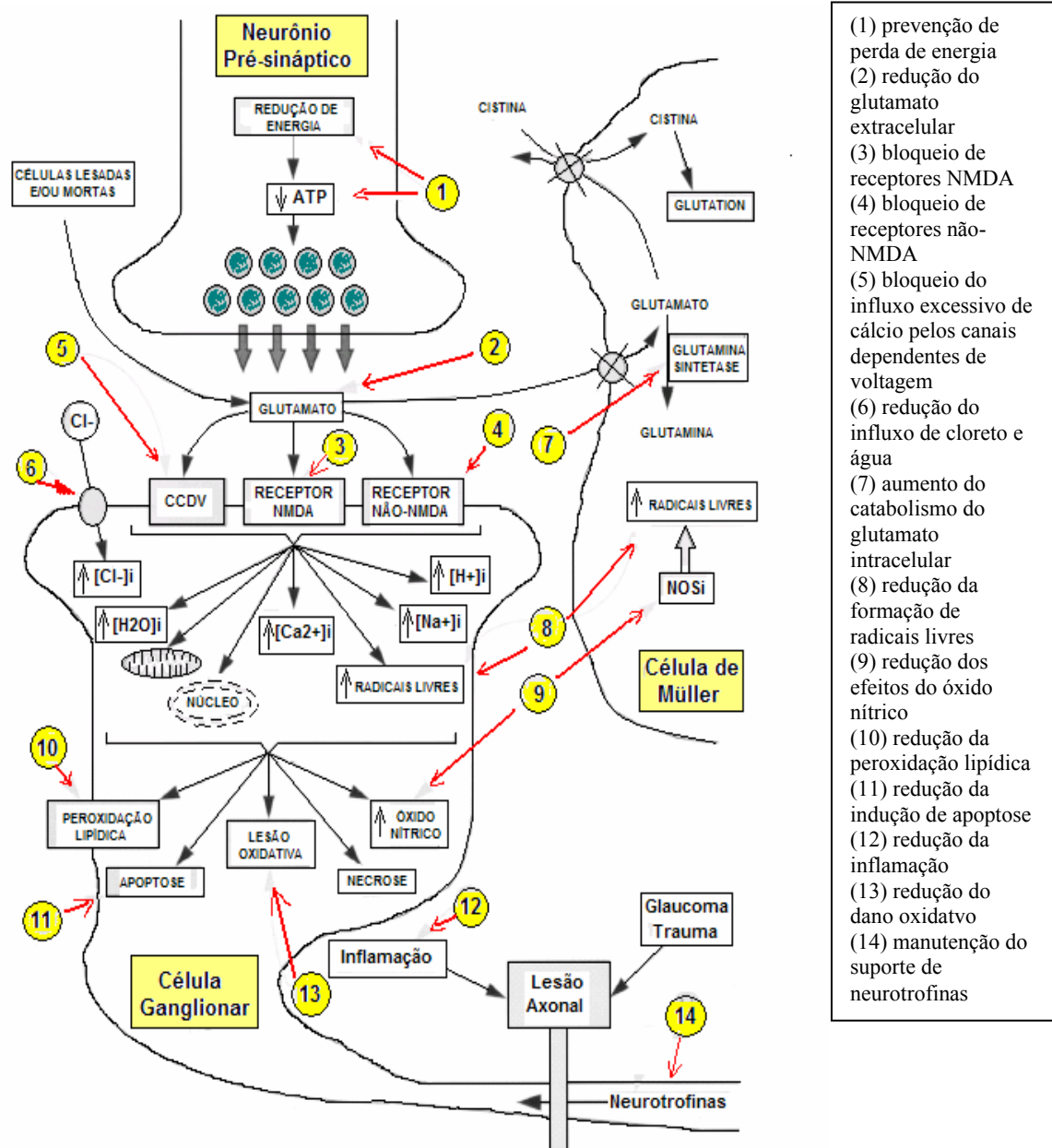


Figura 5: esquema de prováveis eventos secundários à isquemia na retina e potenciais estratégias terapêuticas de neuroproteção de células ganglionares (adaptado de OSBORNE *et al.*, 1999)

I.4) MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DURANTE O INSULTO ISQUÊMICO

I.4.1) Em retinas de pintos e mamíferos não primatas

Tanto na retina de pintos como na de alguns mamíferos, a neurodegeneração consequente a insultos isquêmicos na retina representa um processo excitotóxico que envolve um aumento na ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e não-NMDA e despolarização excessiva das células pós-sinápticas (NOVELLI *et al.*, 1988; MATINI *et al.*, 1997; ROMANO *et al.*, 1998 e NAPPER *et al.*, 2001). Ientile e cols. (2001) sugeriram que na retina de pintos o processo de excitotoxicidade provocaria alterações teciduais por necrose ou por apoptose, com maior susceptibilidade à ativação de receptores do tipo não-NMDA. Zeevalk e Nicklas (1997) mostraram que na retina de pinto, o dano celular agudo induzido por estresse metabólico está ligado à liberação de GABA por transportador. Estes autores sugerem que durante a inibição metabólica, a atividade do transportador de GABA contribui para o edema celular agudo e que inibidores deste transportador são capazes de proteger os neurônios.

Na retina de ratos, a administração sistêmica de um antagonista não-competitivo de receptores do tipo NMDA (MK-801) foi capaz de reverter os efeitos lesivos induzidos por um aumento na pressão intraocular, reduzindo o número de neurônios degenerados pelo processo de necrose (JOO *et al.*, 1999) e apoptose (LAM *et al.*, 1997) bem como se mostrou eficaz como um agente neuroprotetor e antiproliferativo após injúrias retinianas com laser (SOLBERG *et al.*, 1997). A aplicação de antagonistas competitivos de receptores do tipo NMDA bem como inibidores da liberação de glutamato apresentaram efeitos neuroprotetores diante da elevação da pressão intraocular (LAGREZE *et al.*, 1999). Em retina de bovinos, a

ketamina, um potente antagonista de receptores do tipo NMDA foi capaz de inibir a peroxidação lipídica bem como a redução na concentração de glutathione induzidas pela isquemia (ZHOU *et al.*, 1991). Na retina de coelhos, as ações neurotóxicas associadas à ativação dos receptores do tipo NMDA aumentam cerca de 10 x quando o animal atinge a fase adulta. Dentre os potenciais fatores implicados neste aumento de toxicidade, discute-se a possibilidade de uma contribuição das células contendo óxido nítrico (HABERECHT *et al.*, 1997). No entanto, evidências obtidas por alguns autores sugerem que a administração de doadores de NO de forma prévia à isquemia induzida pela elevação da pressão intraocular pode desempenhar um papel neuroprotetor na retina de coelhos (IMAI *et al.*, 1997). Uma modulação bifásica do NO sobre a injúria retiniana induzida por isquemia foi também sugerida (KASHII, 1995). A ativação da sintase do óxido nítrico após a estimulação de receptores do tipo NMDA foi descrita como um dos fatores envolvidos na injúria retiniana induzida pela isquemia/reperfusão em ratos (ADACHI *et al.*, 1998). Em coelhos e ratos, a aplicação intravítrea combinada de antagonistas de receptores do tipo NMDA e não-NMDA mostrou-se eficaz para prevenir, em cerca de 80%, a neurodegeneração retiniana diante de condições isquêmicas (MOSINGER *et al.*, 1991; LOMBARDI *et al.*, 1994; OSBORNE e LARSEN, 1996).

I.4.2) Em retinas de primatas

Os efeitos da isquemia na retina de primatas vêm sendo analisados a partir de vários modelos experimentais *in vivo*, sendo a maioria dos trabalhos realizados principalmente em macacos do Velho Mundo. Em um modelo de isquemia restrita ao nervo óptico foi demonstrada uma redução no fluxo axonal lento preferencialmente relacionado às células ganglionares de regiões perifoveais do macaco Rhesus (LEVY e ADAMS, 1975) bem como

no fluxo axonal rápido do macaco noturno *Aotus trivirgatus* (RADIUS, 1980). Nesta espécie, uma análise comparativa sobre a sensibilidade dos tecidos oculares a um aumento na pressão intraocular durante 8 horas evidenciou uma maior resistência das células de Müller e astrócitos aos efeitos lesivos induzidos pela isquemia em neurônios retinianos (ANDERSON e DAVIS, 1975). A oclusão da artéria retiniana central no macaco Rhesus evidenciou que danos irreversíveis aos neurônios ocorrem apenas a partir de 100 minutos de isquemia (HAYREH *et al.*, 1980). Este tempo de tolerância da retina de primatas à isquemia transiente aguda é bem mais longo que o observado em outras regiões do sistema nervoso central (HAYREH e WEINGEIST, 1980; revisão em OSBORNE *et al.*, 2004) e é preservado mesmo em animais idosos com quadro de arterosclerose e hipertensão (HAYREH *et al.*, 2004). Foi também demonstrado que em primatas do Velho Mundo, pressões intraoculares elevadas aumentam o consumo de glicose na retina com um desvio para o metabolismo anaeróbico (BILL e SPERBER, 1990). Alterações no aporte de glicose e oxigênio também comprometem a adesividade da retina ao epitélio pigmentar. No entanto, uma análise comparativa entre coelhos e espécies de *Macaca* demonstrou que a retina destes primatas é mais resistente à falha de adesão diante de alterações metabólicas (MARMOR e YAO, 1995).

Estudos imuno-histoquímicos realizados em humanos e espécies de *Macaca* evidenciaram que os fotorreceptores são capazes de transportar glicose exógena da circulação, mas apenas cones parecem ser capazes de utilizar os estoques de glicogênio endógeno. Tais resultados sugeriram uma maior resistência dos cones a reduções agudas na glicose circulante (NIHIRA *et al.*, 1995). A indução de isquemia na retina de *Macaca fascicularis* foi capaz de aumentar a expressão do ARNm para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), envolvido com o desenvolvimento de neovascularização ocular (SHIMA *et al.*, 1996). Tal expressão foi reduzida em cerca de 55% na retina isquêmica após 8 horas de hiperóxia sistêmica (POURNARAS *et al.*, 1997). Evidência obtida em um modelo experimental de

glaucoma na retina de *Macaca fascicularis* também sugere que a presença de subunidades de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA não identifica neurônios vulneráveis. Enquanto as células ganglionares foram seletivamente danificadas, populações de células horizontais, bipolares e amácrinas contendo as subunidades acima referidas não foram afetadas pela condição patológica (HOF *et al.*, 1998). Tais resultados apontam para a importância de circuitos neuronais não glutamatérgicos na modulação dos mecanismos de neurotoxicidade na retina.

1.5 EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE O SISTEMA GABAÉRGICO DA RETINA

Glutamato pode exercer efeitos neurotóxicos em diferentes subpopulações de neurônios na retina. Células ganglionares são especialmente vulneráveis e a perda destas células ocorre em patologias como o glaucoma, isquemia retiniana devida à oclusão da artéria central e neuropatia óptica isquêmica anterior, bem como pode ser significativa na neurite óptica e o trauma de nervo óptico (revisões em SUCHER *et al.*, 1997 e OSBORNE *et al.*, 1999). Na retina do rato, submetida à isquemia/reperfusão, uma maior vulnerabilidade da região interna em relação à externa foi observada, sugerindo que diferenças nos mecanismos indutores de morte celular podem ocorrer entre estas duas regiões retinianas (CHEON *et al.*, 2002). Tanto no rato como no coelho, uma vulnerabilidade diferencial ao insulto isquêmico foi demonstrada em subpopulações contendo GABA, acetilcolina, serotonina, calretinina, tirosina hidroxilase e parvalbumina (OSBORNE e HERRERA, 1994; OSBORNE *et al.*, 1995; UGARTE e OSBORNE, 1998; SAFA e OSBORNE, 2000 e CHEON *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que neurônios contendo calretinina e acetilcolina, mas não GABA são mais susceptíveis à isquemia/reperfusão em ratos albinos que em ratos pigmentados (SAFA e OSBORNE, 2000). Células GABAérgicas foram também mais resistentes que as células

dopaminérgicas, considerando que a imunorreatividade à enzima tirosina hidroxilase desapareceu quase completamente em retinas de ratos após 7 dias de reperfusão enquanto que a imunorreatividade ao GABA permaneceu por 28 dias (CHEON *et al.*, 2002).

Isquemia química provocada pela incubação da retina isolada de ratos e coelhos em meio sem glicose e oxigênio é capaz de induzir uma liberação expressiva de glutamato, aspartato e GABA através de mecanismos independentes de Ca^{2+} (NEAL *et al.*, 1994). Resultados similares foram observados na retina de pinto em condições de redução dos níveis de energia (FERREIRA *et al.*, 1997) ou de estresse oxidativo (OLIVEIRA *et al.*, 1994), onde a liberação secundária do GABA acontece em células amácrinas e horizontais (DUARTE *et al.*, 1998). Na retina de pinto foi também demonstrado que a atividade do transportador de GABA contribui para o dano celular agudo produzido pelo comprometimento metabólico (ZEEVALK e NICKLAS, 1997). O metabolismo do GABA através da enzima GABA-transaminase foi reduzido de forma significativa na retina do rato submetida à isquemia (BARNETT e OSBORNE, 1995 e KOBAYASHI *et al.*, 1999).

Estudos realizados em culturas primárias ou em preparações isoladas da retina evidenciaram que em peixe (YAZULLA *et al.*, 1985), sapo (SCHWARTZ, 1982), salamandra (YANG *et al.*, 1997), pinto (Do NASCIMENTO e De MELLO, 1985; MORÁN *et al.*, 1986; FISCHER *et al.*, 1998; KUBRUSLY *et al.*, 1998 e CALAZA *et al.*, 2001), coelho (OSBORNE e HERRERA, 1994) e rato (GOTO *et al.*, 1981; KAMADA, 1981; KAMADA *et al.*, 1984 e NAPPER *et al.*, 2001) mostraram que a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos NMDA e não-NMDA (AMPA e Kainato), induz um efluxo de GABA na retina, podendo este efluxo ocorrer através de mecanismos exocitóticos ou via carreadores presentes na membrana plasmática. Na retina do primata do Novo Mundo *Cebus apella* a liberação de GABA, via carreadores, foi induzida pelo tratamento do tecido com L-glutamato e com ácido caínico, (ANDRADE DA COSTA *et al.*, 2000, 2001), mas não ocorreu após

tratamento do tecido com NMDA (dados não publicados). Tal liberação ocorreu em cerca de 80% dos neurônios presentes na região mais interna da camada nuclear interna.

Durante um insulto isquêmico a redistribuição de GABA na retina, induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, está relacionada aos mecanismos de captação de alta afinidade para esse neurotransmissor, presentes nas células de Müller (JOHNSON *et al.*, 1996). Napper *et al.* (1999) sugerem que mesmo em situações de isquemia (e dentro de certos limites) os transportadores de GABA não seriam significativamente afetados pelos altos níveis de K^+ extracelular. De fato, parece ser de suma importância a atividade das células de Müller nos insultos isquêmicos, uma vez que o comprometimento do metabolismo glial potencializa o dano neuronal (ZEEVALK e NICKLAS, 1997). A oferta de glicose seria um fator relevante na velocidade de acúmulo do GABA por essas células (NAPPER *et al.*, 2001), que poderiam ser também influenciadas pela presença de zinco (UGARTE e OSBORNE, 1998).

São portanto, numerosos os fenômenos e as variáveis envolvidos na neurotoxicidade induzida pela redução de níveis energéticos na retina, e diversas investigações são necessárias para o melhor esclarecimento desses fenômenos. A melhor compreensão da fisiologia da retina e de seu comportamento frente a situações patológicas abre um enorme leque de possibilidades terapêuticas, com implicações clínicas amplas; esperamos que este estudo possa servir de contribuição para a evolução e modernização no tratamento de doenças da retina.

I.6 JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO

A ocorrência de patologias oculares com potencial perda visual definitiva é muito alta em todo o mundo, e podemos citar como exemplos doenças como o glaucoma, retinopatia diabética, retinopatia hipertensiva e oclusões venosas e arteriais, além de outros processos neurodegenerativos da retina, que afetam milhões de pessoas. Embora essas patologias apresentem mecanismos fisiopatológicos diferentes, os incontáveis estudos realizados geralmente apontam para tipos de morte celular que variam entre a necrose e a apoptose. A apoptose é um fenômeno ativo de morte celular programada, que parece envolver a ativação de genes relacionados à sobrevivência, e cuja característica bioquímica mais marcante é a fragmentação do ADN após uma sequência de eventos lesivos (REMÉ *et al.*, 2000). A necrose, por sua vez, pelo menos quando é provocada por um insulto agudo, parece ser caracterizada por uma súbita alteração no equilíbrio iônico e osmótico com rápido rompimento da estrutura das células, resultante da redução dos níveis de energia e ATP (OSBORNE *et al.*, 1999). Apesar dessa suposta dicotomia, muitas vezes há uma superposição nos eventos bioquímicos, não se conhecendo por completo o que determina o surgimento de uma ou outra forma de morte celular. O entendimento dos fenômenos envolvidos nas doenças retinianas que cursam com isquemia permite a busca e o desenvolvimento de agentes neuroprotetores exógenos ou o fortalecimento de sistemas endógenos de neuroproteção.

No nosso estudo, utilizamos a simulação *in vitro* de um evento isquêmico agudo, condição presente em algumas das patologias oculares citadas acima. O modelo utilizado permite a avaliação imediata das alterações encontradas na retina e a participação relativa de receptores glutamatérgicos dos tipos NMDA e não-NMDA, além dos canais de cálcio e sódio dependentes de voltagem. O mesmo modelo quando aplicado a mamíferos não primatas como ratos e coelhos tem indicado que resultados similares são obtidos aos observados em estudos

in vivo de isquemia sem reperusão, enfatizando a sua importância para o entendimento dos mecanismos agudos envolvidos com a neurotoxicidade. A maioria dos estudos realizados sobre os efeitos da isquemia em primatas foram desenvolvidos em primatas do Velho Mundo e em modelos de isquemia experimental *in vivo*. A abordagem deste estudo, valendo-se do uso de primatas do Novo Mundo do gênero *Callithrix*, permite investigar potenciais similaridades ou diferenças de comportamento da retina diante de estímulos isquêmicos.

O primata do Novo Mundo *Callithrix jacchus* vem sendo largamente utilizado como um modelo experimental em estudos comparativos do sistema visual relacionados à organização e função da retina (TOVÉE *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; HUNT *et al.*, 1993; TROILO *et al.*, 1993; GHOSH *et al.*, 1996, 1997; WILDER *et al.*, 1996; CELLERINO e KOHLER, 1997; CHAN e GRÜNERT, 1998; GHOSH e GRÜNERT, 1999; MARTIN e GRÜNERT, 1999; LIN *et al.*, 2000; REYE *et al.*, 2002 e GRÜNERT *et al.*, 2003). Este primata tem boa acuidade visual (ORDY e SAMORAJSKI, 1968), uma fóvea e uma organização visuotópica no córtex visual primário que são qualitativamente similares ao descrito para humanos e outros primatas do Velho Mundo (DICK *et al.*, 1991; TROILO *et al.*, 1993; FRITSCHES e ROSA, 1996 e WILDER *et al.*, 1996).

Embora os primatas de Novo Mundo apresentem um polimorfismo genético relacionado à visão cromática (TOVÉE *et al.*, 1992), vários estudos realizados sobre a organização morfo-funcional da retina do *Callithrix* fornecem evidências capazes de suportar a hipótese de que retinas de primatas diurnos de Velho Mundo e de Novo Mundo são similares em relação aos tipos de conexões neuronais envolvidas nas vias verticais de fotorreceptores a células ganglionares (GHOSH *et al.*, 1997, CHAN e GRÜNERT, 1998; GHOSH e GRÜNERT, 1999 e LUO *et al.*, 1999). Entretanto, estudos realizados no nosso laboratório indicam que a distribuição de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA em células GABAérgicas da retina do *Callithrix jacchus* difere do observado no

macaco-prego *Cebus apella* (HOKOÇ *et al.*, 1999). A possibilidade de uma distribuição diferenciada de receptores do tipo NMDA, em neurônios imunorreativos ao GABA, nas retinas dos primatas *Cebus apella* e *Callithrix jacchus* levanta uma série de questões a respeito da importância relativa deste tipo de receptor na vulnerabilidade de neurônios GABAérgicos em mecanismos de neurotoxicidade. Um estudo comparativo recente também descreveu que entre *Callithrix jacchus* e primatas do Velho Mundo e entre mamíferos não primatas, existem diferenças significantes no padrão de distribuição de transportadores do glutamato do tipo GLT1; considerando que estes transportadores estão envolvidos na regulação dos níveis intra e extracelulares de glutamato, foi sugerido que os padrões distintos na expressão destes transportadores podem indicar propriedades funcionais distintas nas retinas destas espécies (REYE *et al.*, 2002).

Todos em conjunto, todos os trabalhos que analisam neurotoxicidade na retina apontam para uma possível ação terapêutica coadjuvante de antagonistas glutamatérgicos diretos e/ou indiretos em patologias oftalmológicas que induzem neurotoxicidade em humanos. Baseado no entendimento do papel de sistemas de neurotransmissores em processos neurodegenerativos, investigações neurofarmacológicas poderão contribuir para uma terapia racional em várias doenças. O sistema GABAérgico atua como um importante sistema modulatório do ganho das vias ON e OFF retinianas, da liberação de outros neurotransmissores, bem como da atividade dos potenciais de ação gerados em vários tipos de células ganglionares (WÄSSLE e BOYCOTT, 1991; FRUMKES *et al.*, 1995; NGUYEN-LEGROS *et al.*, 1997 e SANDELL, 1998). Dessa forma, consideramos que um estudo visando caracterizar mecanismos de neurotoxicidade na retina de primatas e suas repercussões sobre o sistema GABAérgico pode contribuir para uma análise comparativa no sentido de elucidar similaridades e diferenças nos possíveis mecanismos ativados pela isquemia aguda, em mamíferos filogeneticamente mais próximos aos seres humanos.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

Analisar mecanismos envolvidos com a neurotoxicidade aguda induzida por condições isquêmicas na retina do primata do Novo Mundo *Callithrix jacchus* (sagüi).

II.2 Objetivos específicos

1. Induzir insultos isquêmicos em preparações *in vitro* da retina do *Callithrix jacchus* e analisar potenciais efeitos neurotóxicos capazes de induzir alterações histopatológicas e lesão neuronal após o tratamento agudo.
2. Identificar, a partir de métodos imuno-histoquímicos, de que forma as populações de neurônios GABAérgicos podem ser afetadas pela indução aguda de isquemia, analisando-se a liberação de GABA por transportador.
3. Analisar se antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos são capazes de reverter parcial ou totalmente as alterações retinianas induzidas pela isquemia.
4. Analisar a participação relativa de transportadores de GABA de alta afinidade e dos canais de cálcio dependentes de voltagem nos fenômenos induzidos pela isquemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, K.; FUJITA, Y.; MORIZANE, C.; AKAIKE, A.; UEDA, M.; SATOH, M.; MASAI, H.; KASHII, S. e HONDA, Y. *Inhibition of NMDA receptors and nitric oxide synthase reduces ischemic injury of the retina*. European Journal of Pharmacology, 350, (1), p. 53-57, 1998.
- AMES III, A. e LI, Y. Y. *Energy requirements of glutamatergic pathways in rabbit retina*. Journal of Neuroscience, 12, (11), p. 4234-4242, 1992.
- ANDERSON, D. R. e DAVIS, E. B. *Sensitivities of ocular tissues to acute pressure-induced ischemia*. Archives of Ophthalmology, 93, (4), p. 267-274, 1975.
- ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; DE MELLO, F. G. e HOKOÇ, J. N. *Transporter-mediated GABA release induced by excitatory amino acid agonist is associated with GAD-67 but not GAD-65 immunoreactive cells of the primate retina*. Brain Research, 863, (1-2), p. 132-142, 2000.
- ANDRADE DA COSTA, B. L. S.; HOKOÇ, J. N. e DE MELLO, F. G. *Comparative study of glutamate mediated gamma-aminobutyric acid release from nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase immunoreactive cells of the Cebus apella retina*. Neuroscience Letters, 302, (1), p. 21-24, 2001.
- BALÁSZ, R.; MACHIYAMA, Y.; HAMMOND, B. J.; JULIAN, T. e RICHTER, D. *The operation of the γ -aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro*. Biochemistry Journal, 116, (3), p. 445-467, 1970.

BARNETT, N. L. e OSBORNE, N. N. *Redistribution of GABA immunoreactivity following central retinal artery occlusion*. Brain Research, 677, (2), p. 337-340, 1995.

BARNSTABLE, C. J. *Glutamate and GABA in retinal circuitry*. Current Opinion in Neurobiology, 3, (4), p. 520-525, 1993.

BERNATH, S. *Calcium independent release of amino acid neuro transmitters: fact or artifact?* Progress in Neurobiology, 38, (1), p. 57-91, 1992.

BILL, A. e SPERBER, G. O. *Aspects of oxygen and glucose consumption in the retina: effects of high intraocular pressure and light*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 228, (2), p. 124-127, 1990.

BLANKS, J. C. *Morphology of the retina*, v. 1, cap.4, p. 37-53, 1994. In: RYAN, S. J. **Retina**, 2^a. ed., Mosby, St. Louis, EUA.

CALAZA, K. C.; HOKOÇ, J. N. e GARDINO, P. F. *Neurogenesis of GABAergic cells in the chick retina*. International Journal of Developmental Neuroscience, 18, (8), p. 721-726, 2000.

CALAZA, K. C.; DE MELLO, F. G. e GARDINO, P. F. *GABA release induced by aspartate-mediated activation of NMDA receptors is modulated by dopamine in a selective subpopulation of amacrine cells*. Journal of Neurocytology, 30, (3), p. 181-193, 2001.

CELLERINO, A. e KOHLER, K. *Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina*. Journal of Comparative Neurology, 386, (1), p. 149-160, 1997.

CHAN, T. L. e GRÜNERT, U. *Horizontal cell connections with short wavelength-sensitive cones in the retina: A comparison between New World and Old World primates*. Journal of Comparative Neurology, 393, (2), p. 196-209, 1998.

CHEN, Q.; OLNEY, J. W.; LUKASIEWICZ, P. D.; ALMLI, T. e ROMANO, C. *Ca²⁺-independent excitotoxic neurodegeneration in isolated retina, an intact neural net: a role for Cl⁻ and inhibitory transmitters*. Molecular Pharmacology, 53, (3), p. 564-572, 1998.

CHEN, Q.; OLNEY, J. W.; PRICE, M. T. e ROMANO, C. *Biochemical and morphological analysis of non-NMDA receptor mediated excitotoxicity in chick embryo retina*. Visual Neuroscience, 16, (1), p. 131-139, 1999.

CHEON, E. W.; PARK, C. H.; KANG, S. S.; CHO, G. J.; YOO, J. M.; SONG, J. K. e CHOI, W. S. *Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol*. Neuroscience Letters, 330, (3), p. 265-269, 2002.

DE MELLO, F. G.; BACHRACH, U. e NIRENBERG, M. *Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina*. Journal of Neurochemistry, 27, (4), p. 847-851, 1976.

DICK, A.; KASKE, A. e CREUTZFELDT, O. D. *Topographical and topological organization of the thalamocortical projection to the striate and prestriate cortex in the marmoset (Callithrix jacchus)*. Experimental Brain Research, 84, (2), p. 233-253, 1991.

DINGLELINE, R. e MCBAIN, C. J. *Glutamate and Aspartate*, cap. 15, p. 315-333, 1999. In: SIEGEL, G. J. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 6^a ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, EUA.

DO NASCIMENTO, J. L. e DE MELLO, F. G. *Induced release of gamma-aminobutyric acid by a carrier-mediated, high-affinity uptake of L-glutamate in cultured chick retina cells.*

Journal of Neurochemistry, 45, (6), p. 1820-1827, 1985.

DREYFUS, H.; SAHEL, J.; HEIDINGER, V.; MOHAND-SAID, S.; GUEROLD, B.; MEUILLET, E.; FONTAINE, V. e HICKS, D. *Gangliosides and neurotrophic growth factors in the retina. Molecular interactions and applications as neuroprotective agents.* Annals of the New York Academy of Sciences, 845, (1), p. 240-252, 1998.

DUARTE, C. B.; FERREIRA, I. L.; SANTOS, P. F.; CARVALHO, A. L.; AGOSTINHO, P. M. e CARVALHO, A. P. *Glutamate in life and death of retinal amacrine cells.* General Pharmacology, 30, (3), p. 289-295, 1998.

FERREIRA, I. L.; DUARTE, C. B. e CARVALHO, A. P. *'Chemical ischemia' in cultured retina cells: the role of excitatory amino acid receptors and of energy levels on cell death.* Brain Research, 768, (1-2), p. 157-166, 1997.

FISCHER, A. J.; SELTNER, R. L. P.; POON, J. e STELL, W. K. *Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-Methyl-D-Aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks.* Journal of Comparative Neurology, 393, (1), p. 1-15, 1998.

FRITSCHES, K. A. e ROSA, M. G. *Visuotopic organisation of striate cortex in the marmoset monkey (Callithrix jacchus).* Journal of Comparative Neurology, 372, (2), p. 264-282, 1996.

FRUMKES, T. E.; NELSON, R. e PFLUG, R. *Functional role of GABA in cat retina: II. Effects of GABA_A antagonists.* Visual Neuroscience, 12, (4), p. 651-661, 1995.

GHOSH, K. K.; GOODCHILD, A. K.; SEFTON, A. E. e MARTIN, P. R. *Morphology of retinal ganglion cells in a New World monkey, the marmoset Callithrix jacchus*. Journal of Comparative Neurology, 366, (1), p. 76-92, 1996.

GHOSH, K. K.; MARTIN, P. R. e GRÜNERT, U. *Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World monkey, the marmoset Callithrix jacchus*. Journal of Comparative Neurology, 379, (2), p. 211-225, 1997.

GHOSH, K. K. e GRÜNERT, U. *Synaptic input to small bistratified (blue-On) ganglion cells in the retina of a New World monkey, the marmoset Callithrix jacchus*. Journal of Comparative Neurology, 413, (3), p. 417-428, 1999.

GOTO, M.; INOMATA, N.; ONO, H.; SAITO, K. e FUKUDA, H. *Changes of electroretinogram and neurochemical aspects of GABAergic neurons of retina after intraocular injection of kainic acid in rats*. Brain Research, 211, (2), p. 305-314, 1981.

GRÜNERT, U.; LIN, B. e MARTIN, P. R. *Glutamate receptors at bipolar synapses in the inner plexiform layer of primate retina: light microscopic analysis*. Journal of Comparative Neurology, 466, (1), p. 136-147, 2003.

HABERECHE, M. F.; MITCHELL, C. K.; LO, G. J. e REDBURN, D. A. *N-methyl-D-aspartate-mediated glutamate toxicity in the developing rabbit retina*. Journal of Neuroscience Research, 47, (4), p. 416-426, 1997.

HASSEL, B.; JOHANNESSEN, C. U.; SONNEWALD, U. e FONNUM, F. *Quantification of the GABA shunt and the importance of the GABA shunt versus the 2-oxoglutarate dehydrogenase pathway in GABAergic neurons*. Journal of Neurochemistry, 71, (4), p. 1511-1518, 1998.

HAYREH, S. S.; KOLDER, H. E. e WEINGEIST, T. A. *Central retinal artery occlusion and retinal tolerance time*. Ophthalmology, 87, (1), p. 75-78, 1980.

HAYREH, S. S. e WEINGEIST, T. A. *Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia*. British Journal of Ophthalmology, 64, (11), p. 818-825, 1980.

HAYREH, S. S.; ZIMMERMAN, M. B.; KIMURA, A. e SANON, A. *Central retinal artery occlusion. Retinal survival time*. Experimental Eye Research, 78, (3), p. 723-736, 2004.

HICKS, D.; HEIDINGER, V.; MOHAND-SAID, S.; SAHEL, J. e DREYFUS, H. *Growth factors and gangliosides as neuroprotective agents in excitotoxicity and ischemia*. General Pharmacology, 30, (3), p. 265-273, 1998.

HOF, P. R.; LEE, P.; YEUNG, G.; WANG, R.; PODOS, S. M. e MORRISON, J. H. *Glutamate receptor subunit GluR2 and NMDAR1 immunoreactivity in the retina of macaque monkeys with experimental glaucoma does not identify vulnerable neurons*. Experimental Neurology, 153, (2), p. 234-241, 1998.

HOKOÇ, J. N.; LIMA, V. L. M.; PEREIRA GOMES, R. F.; BEZERRA, E. S. e ANDRADE DA COSTA, B. L. S. *The distribution of glutamate receptors activity in GABAergic amacrine cells differs among primate retinas*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 40, (S438), 1999.

HORNING, M. S.; BLAKEMORE, L. J. e TROMBLEY, P. Q. *Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine*. Brain Research, 852, (1), p. 56-61, 2000.

- HUNT, D. M.; WILLIAMS, A. J.; BOWMAKER, J. K. e MOLLON, J. D. *Structure and evolution of the polymorphic photopigment gene of the marmoset*. Vision Research, 33, (2), p. 147-154, 1993.
- IENTILE, R.; MACAIONE, V.; TELLETA, M.; PEDALE, S.; TORRE, V. e MACAIONE, S. *Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina*. Journal of Neurochemistry, 79, (1), p. 71-78, 2001.
- IKEDA, Y.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H. e KATSUKI, H. *GABA_A receptor stimulation promotes survival of embryonic rat striatal neurons in culture*. Developmental Brain Research, 98, (2), p. 253-258, 1997.
- IMAI, N.; TSUYAMA, Y.; MURAYAMA, K. e ADACHI-USAMI, E. *Protective effect of nitric oxide on ischemic retina*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 101, (8), p. 639-643, 1997.
- IZUMI, Y.; HAMMERMAN, S. B.; KIRBY, C. O.; BENZ, A. M.; OLNEY, J. W. e ZORUMSKI, C. F. *Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina*. Visual Neuroscience, 20, (2), p. 97-107, 2003.
- JOHNSON, J.; CHEN, T. K.; RICKMAN, D. W.; EVANS, C. e BRECHA, N. C. *Multiple γ -aminobutyric acid plasma membrane transporters GAT-1, GAT-2, GAT-3 in the rat retina*. The Journal of Comparative Neurology, 375, (2), p. 212-224, 1996.
- JOO, C. K.; CHOI, J. S.; KO, H. W.; PARK, K. Y.; SOHN, S.; CHUN, M. H.; OH, Y. J. e GWAG, B. J. *Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 40, (3), p. 713-720, 1999.

KALLONIATIS, M. e NAPPER, G. A. *Retinal neurochemical changes following application of glutamate as a metabolic substrate*. Clinical and Experimental Optometry, 85, (1), p. 27-36, 2002.

KAMADA, Y. *The release of GABA from isolated rat retina*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 85, (6), p. 441-450, 1981.

KAMADA, Y.; MIZUNO, A.; MIYAZAKI, H.; TSUNEOKA, H. e MATSUDA, M. *Effects of glutamic acid, kainic acid and aspartic acid on GABA release from rat retina degenerated by kainic acid*. Japanese Journal of Ophthalmology, 28, (1), p. 57-61, 1984.

KASHII, S. *The role of nitric oxide in the ischemic retina*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 99, (12), p. 1361-1376, 1995.

KAUSHIK, S. S.; PANDAV, S. S. e RAM, J. J. *Neuroprotection in glaucoma*. Journal of Postgraduate Medicine, 49, (1), p. 90-95, 2003.

KOBAYASHI, N.; ISHIGURO, S. I.; TOMITA, H.; NISHIKAWA, S. e TAMAI, M. *Changes of GABA metabolic enzymes in acute retinal ischemia*. Experimental Eye Research, 69, (1), p. 91-96, 1999.

KUBRUSLY, R. C.; DE MELLO, M. C. e DE MELLO, F. G. *Aspartate as a selective NMDA receptor agonist in cultured cells from the avian retina*. Neurochemistry International, 32, (1), p. 47-52, 1998.

- LAFUENTE, M. P.; VILLEGAS-PEREZ, M. P.; SOBRADO-CALVO, P.; GARCIA-AVILES, A.; MIRALLES DE IMPERIAL, J. e VIDAL-SANZ, M. *Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 42, (9), p. 2074-2084, 2001.
- LAGREZE, W. A.; OTTO, T. e FEUERSTEIN, T. J. *Neuroprotection in ischemia of the retina in an animal model*. Ophthalmologie, 96, (6), p. 370-374, 1999.
- LAM, T. T.; SIEW, E.; CHU, R. e TSO, M. O. *Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 13, (2), p. 129-137, 1997.
- LEVY, N. S. e ADAMS, C. K. *Slow axonal protein transport and visual function following retinal and optic nerve ischemia*. Investigative Ophthalmology, 14, (2), p. 91-97, 1975.
- LIM, C. H. e HO, S. M. *GABAergic modulation of axonal conduction in the developing rat retinotectal pathway*. Developmental Brain Research, 108, (1-2), p. 299-302, 1998.
- LIN, B.; MARTIN, P. R.; SOLOMON, S. G. e GRÜNERT, U. *Distribution of glycine receptor subunits on primate retinal ganglion cells: a quantitative analysis*. European Journal of Neuroscience, 12, (12), p. 4155-4170, 2000.
- LOMBARDI, G.; MORONI, F. e MORONI, F. *Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage*. European Journal of Pharmacology, 271, (2-3), p. 489-495, 1994.
- LOTURCO, J. J.; OWENS, D. F.; HEATH, M. J.; DAVIS, M. B. e KRIEGSTEIN, A. R. *GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis*. Neuron, 15, (6), p. 1287-1298, 1995.

- LUO, X.; GHOSH, K. K.; MARTIN, P. R. e GRÜNERT, U. *Analysis of two types of cone bipolar cells in the retina of a New world monkey, the marmoset Callithrix jacchus*. Visual Neuroscience, 16, (4), p. 707-719, 1999.
- MADTES, R. e REDBURN, D. A. *GABA as a trophic factor during development*. Life Science, 33, (10), p. 979-984, 1983.
- MARMOR, M. F. e YAO, X. Y. *The metabolic dependency of retinal adhesion in rabbit and primate*. Archives of Ophthalmology, 113, (2), p. 232-238, 1995.
- MARTIN, D. L. *Short-term control of GABA synthesis in brain*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 60, (1), p. 17-28, 1993.
- MARTIN, P. R. e GRÜNERT, U. *Analysis of the short wavelength-sensitive ("Blue") cone mosaic in the primate retina: comparison of New World and Old World monkeys*. Journal of Comparative Neurology, 406, (1), p. 1-14, 1999.
- MASSEY, S. C. e MAGUIRE, G. *The Role of Glutamate in Retinal Circuitry*, cap. 15, p. 201-221, 1995. In: WHEAL, H. V. **Excitatory Aminoacids and Synaptic Transmission**. 2^a ed., Academic Press Limited.
- MATINI, P.; MORONI, F.; LOMBARDI, G.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. e MORONI, F. *Ultrastructural and biochemical studies on the neuroprotective effects of excitatory amino acid antagonists in the ischemic rat retina*. Experimental Neurology, 146, (2), p. 419-434, 1997.
- MELENA, J. e OSBORNE, N. N. *Voltage-dependent calcium channels in the rat retina: involvement in NMDA-stimulated influx of calcium*. Experimental Eye Research, 72, (4), p. 393-401, 2001.

MESSERSMITH, E. K. e REDBURN, D. A. *The role of GABA during development of the outer retina in the rabbit*. *Neurochemical Research*, 18, (4), p. 463-470, 1993.

MILLER, R. F. *The physiology and morphology of the vertebrate retina*, cap. 10, p. 95-123, 1994. In: RYAN, S. J. **Retina**, 2^a. ed., Mosby, St. Louis, EUA.

MONAGHAN, D. T.; BRIDGES, R. J. e COTMAN, C. W. *The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29, p. 365-402, 1989.

MORÁN, J.; PASANTES-MORALES, H. e REDBURN, D. A. *Glutamate receptor agonists release [3H]GABA preferentially from horizontal cells*. *Brain Research*, 398, (2), p. 276-287, 1986.

MOSINGER, J. L.; PRICE, M. T.; BAI, H. Y.; XIAO, H.; WOZNIAK, D. F. e OLNEY, J. W. *Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina*. *Experimental Neurology*, 113, (1), p. 10-17, 1991.

MURAKAMI, M.; OHTSUKA, T. e SHIMAZAKI, H. *Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina*. *Vision Research*, 15, (3), p. 456-458, 1975.

NAG, T. C. e WADHWA, S. *Expression of GABA in the fetal, postnatal, and adult human retinas: an immunohistochemical study*. *Visual Neuroscience*, 14, (3), p. 425-432, 1997.

NAPPER, G. A.; PIANTA, M. J. e KALLONIATIS, M. *Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions*. *Visual Neuroscience*, 16, (1), p. 149-158, 1999.

NAPPER, G. A.; PIANTA, M. J. e KALLONIATIS, M. *Localization of amino acid neurotransmitters following in vitro ischemia in the rat retina*. Visual Neuroscience, 18, (3), p. 413-427, 2001.

NEAL, M. J.; CUNNINGHAM, J. R.; HUTSON, P. H. e HOGG, J. *Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina*. Journal of Neurochemistry, 62, (3), p. 1025-1033, 1994.

NEWMAN, E. A. e ZAHS, K. R. *Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina*. The Journal of Neuroscience, 11, (18), p. 4022-4028, 1998.

NEWMAN, E. A. *Glial modulation of synaptic transmission in the retina*. Glia, 47, (3), p. 268-274, 2004.

NGUYEN-LEGROS, J.; VERSAUX-BOTTERI, C. e SAVY, C. *Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals*. Microscopy Research and Technique, 36, (1), p. 26-42, 1997.

NICHOLLS, D. G. *Amino acids as transmitters*, cap. 9, p. 155-185, 1994. **Proteins, transmitters and synapses**, 1ª ed., Blackwell Science Ltd., Oxford, GB.

NIHIRA, M.; ANDERSON, K.; GORIN, F. A. e BURNS, M. S. *Primate rod and cone photoreceptors may differ in glucose accessibility*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 36, (7), p. 1259-1270, 1995.

NOVELLI, A.; REILLY, J. A.; LYSKO, P. G. e HENNEBERRY, R. C. *Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced*. Brain Research, 451, (1-2), p. 205-212, 1988.

OLIVEIRA, C. R.; AGOSTINHO, P.; CASEIRO, P.; DUARTE, C. B. e CARVALHO, A. P. *Reactive oxygen species on GABA release*. Annals of the New York Academy of Sciences, 738, p. 130-140, 1994.

OLSEN, R. W. e DELOREY, T. M. *GABA and Glycine*, cap. 16, p. 335-346, 1999. In: SIEGEL, G. J. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 6^a ed., Lippincott-Raven, Philadelphia

ORDY, J. M. e SAMORAJSKI, T. *Visual acuity and ERG-CFF in relation to the morphologic organization of the retina among diurnal and nocturnal primates*. Vision Research, 8, (9), p. 1205-1225, 1968.

OSBORNE, N. N. e HERRERA, A. J. *The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina*. Neuroscience, 59, (4), p. 1071-1081, 1994.

OSBORNE, N. N.; WOOD, J. P. M. e MULLER, A. *The influence of experimental ischemia on protein kinase C and the gabaergic system in the rabbit retina*. Neuropharmacology, 34, (p. 1279-1288, 1995.

OSBORNE, N. N. e LARSEN, A. K. *Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists*. Neurochemistry International, 29, (3), p. 263-270, 1996.

OSBORNE, N. N.; UGARTE, M.; CHAO, M.; CHIDLOW, G.; BAE, J. H.; WOOD, J. P. M. e NASH, M. S. *Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma*. Survey of Ophthalmology, 43, (Suppl.1), p. 102-128, 1999.

OSBORNE, N. N.; CASSON, R. J.; WOOD, J. P. M.; CHIDLOW, G.; GRAHAM, M. e MELENA, J. *Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies*. Progress in Retinal and Eye Research, 23, (1), p. 91-147, 2004.

PATEL, A. J.; BALÁSZ, R. e RICHTER, D. *Contribution of the GABA bypath to glucose oxidation, and the development of compartmentation in the brain*. Nature, 226, (5251), p. 1160-1161, 1970.

PFRIEGER, F. W. *Role of glia in synapse development*. Current Opinion in Neurobiology, 12, (5), p. 486-490, 2002.

POURNARAS, C. J.; MILLER, J. W.; GRAGOUDAS, E. S.; HUSAIN, D.; MUNOZ, J. L.; TOLENTINO, M. J.; KUROKI, M. e ADAMIS, A. P. *Systemic hyperoxia decreases vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic primate retina*. Archives of Ophthalmology, 115, (12), p. 1553-1558, 1997.

RADIUS, R. L. *Optic nerve fast axonal transport abnormalities in primates. Occurrence after short posterior ciliary artery occlusion*. Archives of Ophthalmology, 98, (11), p. 2018-2022, 1980.

REDBURN, D. A. e REDBURN, D. A. *GABA as a trophic factor during development*. Life Science, 33, (10), p. 979-984, 1983.

REDBURN, J. D. *GABA as a developmental neurotransmitter in the outer plexiform layer of the vertebrate retina*. Perspectives on Developmental Neurobiology, 5, (p. 261-267, 1998.

REMÉ, C. E.; GRIMM, C.; HAFEZI, F.; WENZEL, A. e WILLIAMS, T. P. *Apoptosis in the retina: the silent death of vision*. News in Physiological Sciences, 15, (3), p. 120-124, 2000.

REYE, P.; SULLIVAN, R.; FLETCHER, E. L. e POW, D. V. *Distribution of two splice variants of the glutamate transporter GLT1 in the retinas of humans, monkeys, rabbits, rats, cats and chickens*. Journal of Comparative Neurology, 445, (1), p. 1-12, 2002.

ROBIN, L. N. e KALLONIATIS, M. *Interrelationship between retinal ischaemic damage and turnover and metabolism of putative amino acid neurotransmitters, glutamate and GABA*. Documenta Ophthalmologica, 80, (4), p. 273-300, 1992.

ROCHA, M.; MARTINS, R. A. P. e LINDEN, R. *Activation of NMDA receptors protects against glutamate neurotoxicity in the retina: evidence for the involvement of neurotrophins*. Brain Research, 827, (1-2), p. 79-92, 1999.

ROMANO, C.; PRICE, M. T.; ALMLI, T. e OLNEY, J. W. *Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 39, (2), p. 416-423, 1998.

SAFA, R. e OSBORNE, N. N. *Retinas from albino rats are more susceptible to ischemic damage than age-matched pigmented animals*. Brain Research, 862, (1-2), p. 36-42, 2000.

SANDELL, J. H. *GABA as a developmental signal in the inner retina and optic nerve*. Perspectives on Developmental Neurobiology, 5, (2-3), p. 269-278, 1998.

SCHILLER, P. H. *The ON and OFF channels of the visual system*. Trends in Neuroscience, 15, (3), p. 86-92, 1992.

SCHILLER, P. H. *The ON and OFF channels of the mammalian visual system*. Progress in Retinal and Eye Research, 15, (1), p. 173-195, 1995.

- SCHWARTZ, E. A. *Calcium-independent release of GABA from horizontal cells of the toad retina*. Journal of Physiology, 323, (1), p. 211-227, 1982.
- SHEN, W. e SLAUGHTER, M. M. *A non-excitatory paradigm of glutamate toxicity*. Journal of Neurophysiology, 87, (3), p. 1629-1634, 2002.
- SHIMA, D. T.; GOUGOS, A.; MILLER, J. W.; TOLENTINO, M.; ROBINSON, G.; ADAMIS, A. P. e D'AMORE, P. A. *Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of Macaca fascicularis*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 37, (7), p. 1334-1340, 1996.
- SOLBERG, Y.; ROSNER, M.; TURETZ, J. e BELKIN, M. *MK-801 has neuroprotective and antiproliferative effects in retinal laser injury*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 38, (7), p. 1380-1389, 1997.
- SUCHER, N. J.; LIPTON, S. A. e DREYER, E. B. *Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells*. Vision Research, 37, (24), p. 3483-3493, 1997.
- TILLAKARATNE, N. J. K.; MEDINA-KAUWE, L. e GIBSON, K. M. *Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues*. Comparative Biochemistry and Physiology, 112A, (2), p. 247-263, 1995.
- TOVÉE, M. J.; BOWMAKER, J. K. e MOLLON, J. D. *The relationship between cone pigments and behavioural sensitivity in a New World monkey (Callithrix jacchus jacchus)*. Vision Research, 32, (5), p. 867-878, 1992.
- TROILO, D.; ROWLAND, H. C. e JUDGE, S. J. *Visual optics and retinal cone topography in the common marmoset (Callithrix jacchus)*. Vision Research, 33, (10), p. 1301-1310, 1993.

TSACOPOULOS, M. e MAGISTRETTI, P. J. *Metabolic coupling between glia and neurons*. Journal of Neuroscience, 16, (3), p. 877-885, 1996.

UGARTE, M. e OSBORNE, N. N. *The localization of endogenous zinc and the in vitro effect of exogenous zinc on the GABA immunoreactivity and formation of reactive oxygen species in the retina*. General Pharmacology, 30, (3), p. 297-303, 1998.

ULLIAN, E. M.; SAPPERSTEIN, S. K.; CHRISTOPHERSON, K. S. e BARRES, B. A. *Control of synapse number by glia*. Science, 291, (5504), p. 657-661, 2001.

VORWERK, C. K.; NASKAR, R.; SCHUETTAUF, F.; QUINTO, K.; ZURAKOWSKI, D.; GOCHENAUER, G.; ROBINSON, M. B.; MACKLER, S. A. e DREYER, E. B. *Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 41, (11), p. 3615-3621, 2000.

WANG, X.; KASHII, S.; ZHAO, L.; TONCHEV, A. B.; KATSUKI, H.; AKAIKE, A.; HONDA, Y.; YAMASHITA, J. e YAMASHIMA, T. *Vitamin B6 protects primate retinal neurons from ischemic injury*. Brain Research, 940, (1-2), p. 36-43, 2002.

WÄSSLE, H. e BOYCOTT, B. B. *Functional architecture of the mammalian retina*. Physiological Reviews, 71, (2), p. 447-480, 1991.

WHEELER, L. A.; GIL, D. W. e WOLDEMUSSE, E. *Role of alpha-2 adrenergic receptors in neuroprotection and glaucoma*. Survey of Ophthalmology, 45, (suppl. 3), p. 290-296, 2001.

WILDER, H. D.; GRÜNERT, U.; LEE, B. B. e MARTIN, P. R. *Topography of ganglion cells and photoreceptors in the retina of a New World monkey: the marmoset Callithrix jacchus*. Visual Neuroscience, 13, (2), p. 335-352, 1996.

- WILLIAMS, A. J.; HUNT, D. M.; BOWMAKER, J. K. e MOLLON, J. D. *The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis*. European Molecular Biology Organization Journal, 11, (6), p. 2039-2045, 1992.
- WOOD, J. P. M.; DESANTIS, L.; CHAO, H. M. e OSBORNE, N. N. *Topically applied betaxolol attenuates ischaemia-induced effects to the rat retina and stimulates BDNF mRNA*. Experimental Eye Research, 72, (1), p. 79-86, 2001.
- YAMASAKI, E. N.; BARBOSA, V. D.; DE MELLO, F. G. e HOKOÇ, J. N. *GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development*. International Journal of Developmental Neuroscience, 17, (3), p. 201-213, 1999.
- YANG, C. Y.; BRECHA, N. C. e TSAO, E. *Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporters in the tiger salamander retina*. Journal of Comparative Neurology, 389, (1), p. 117-126, 1997.
- YAZULLA, S.; CUNNINGHAM, J. e NEAL, M. *Stimulated release of endogenous GABA and glycine from the goldfish retina*. Brain Research, 345, (2), p. 384-388, 1985.
- ZEEVALK, G. D.; SCHOEPP, D. e NICKLAS, W. J. *Excitotoxicity at both NMDA and non-NMDA glutamate receptors is antagonized by aurintricarboxylic acid: evidence for differing mechanisms of action*. Journal of Neurochemistry, 64, (4), p. 1749-1758, 1995.
- ZEEVALK, G. D. e NICKLAS, W. J. *Contribution of glial metabolism to neuronal damage caused by partial inhibition of energy metabolism in retina*. Experimental Eye Research, 65, (3), p. 397-405, 1997.

ZHANG, C.; BETTLER, B. e DUVOISIN, R. M. *Differential localization of GABA_B receptors in the mouse retina*. Neuroreport, 9, (15), p. 3493-3497, 1998.

ZHOU, M.; MA, T. e TSENG, M. T. *Effects of taurine and ketamine on bovine retinal membrane lipid peroxidation*. Neuroscience, 45, (2), p. 461-465, 1991.

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA VISUAL NEUROSCIENCE

**EFFECTS OF THE ABSENCE OF GLUCOSE OR GLUCOSE AND OXYGEN ON
GABAERGIC NEURONS IN THE RETINA OF A NEW WORLD MONKEY, THE
MARMOSET *Callithrix jacchus***

Renato José **Lira** Ferreira¹, Bruno César da **Silva**¹, Carlos Henrique e Melo **Figueirôa**¹, Jader
Salviano **Macedo**¹, Célia Maria Machado Barbosa de **Castro**², Nicodemos Teles de **Pontes**
Filho³, Luciano Tavares **Montenegro**³, Alex Benício da **Silveira**⁴, Belmira Lara da Silveira
Andrade da Costa¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas;

²Departamento de Medicina Tropical, ³Departamento de Patologia, Centro de Ciências da
Saúde; ⁴Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas;

Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Running Title: Retinal ischemia and excitotoxicity in New World primates

Text pages: 30

Figures: 4

Tables: 1

Corresponding author:

Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Laboratório de Neurofisiologia
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB, UFPE
Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária
50670-901 Recife, PE, Brasil.
Phone: 55-81-21268530 Fax: 55-81-21268976 or 21268350
E-mail: bl@ufpe.br

Abstract

Under physiological conditions the amino acid glutamate is the major excitatory neurotransmitter of the retina, but in ischemia-like situations it acts as a neurotoxin, promoting massive neuronal depolarization, via activation of ionotropic glutamate receptors. This study investigated the acute effects of the lack of glucose or glucose and O₂ in the retina of the New World Monkey *Callithrix jacchus* and their repercussions on GABAergic neurons. Isolated preparations of the retina were treated during 45 or 60 minutes in saline solutions with or without glucose or glucose/O₂ (simulated ischemia). The effects of the simulated ischemia were also investigated in the presence of glutamate receptor antagonists (10 μ M MK-801 plus 50 μ M CNQX or 20 μ M MK-801 plus 100 or 200 μ M DNQX) or 200 μ M guvacine-HCl (an inhibitor of GABA transporters) or in saline solution containing 10 mM Mg²⁺. The effects on retinal integrity were evaluated on transverse sections stained with hematoxylin/eosin and the alterations in the GABA-redistribution in the tissue were analyzed by an immunohistochemical approach. Müller cells were identified by immunoreactivity to the glial intermediate filament S-100. The results indicated that the absence of glucose in the extracellular medium did not alter the retina structure but induced GABA release from the neurons and simultaneous uptake by Müller cells. On the other hand, the lack of glucose and O₂ induced a marked disorganization in the retina architecture, especially swelling of neuronal and Müller cell bodies and a fuzzy spongiform appearance of plexiform layers and an expressive GABA release from the neurons. The combined addition of NMDA and non-NMDA antagonists, or 200 μ M guvacine or 10 mM Mg²⁺ were not able to completely prevent the release of GABA from the neurons. The data suggest that in *Callithrix* retina the acute effects of a simulated ischemia involve the additive participation of ionotropic glutamate receptors, GABA-transporters and possibly Ca⁺ influx through voltage-gated channels.

Keywords: Excitotoxicity, GABA uptake, Müller cells, primate retina, retinal ischemia.

Introduction

The amino acid L-glutamate acts as an important neuroactive substance in the central nervous system, involved in protein and other amino acid synthesis as well acts as a major excitatory neurotransmitter in the vertebrate retina (Patel, 1970; Massey & Maguire, 1995; Hassel et al., 1998). Along the On and Off vertical pathways of the retina it has been well established that the glutamatergic information flow involves the activation of ionotropic and metabotropic receptors with distinct repercussions on the electrophysiological properties of cone and rod bipolar cells (Peng et al., 1994; Massey & Maguire, 95, Brandstätter et al., 1998). Under some pathological conditions, such as ischemia, glutamate can acts as a potential endogenous neurotoxin, inducing acute or delayed damage in postsynaptic cells (Novelli et al., 1988; Peruche & Kriegestein, 1993; Robin & Kalloniatis, 1992; Osborne et al., 2004).

Retinal ischemia occurs in a variety of ophthalmic disorders, including glaucoma, diabetic retinopathy, vascular occlusion, retinal neovascularization, retinal detachment and vitreous hemorrhage (Osborne et al., 1999; 2004). Several studies have shown that one of the mechanisms responsible for the neuronal vulnerability to ischemia entails a significant release of glutamate in the extracellular medium and the activation of ionotropic glutamate receptor subtypes classified as N-methyl-D-aspartate (NMDA), S- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-priprionic acid (AMPA) and kainate (KA). The overactivation of these receptors can leads to excessive ion influx, rises in the intracellular Ca^{2+} , osmotic swelling, free radical generation and cell death (Coyle et al., 1993; Duarte et al., 1998; Melena & Osborne, 2001)

Glutamate can exert an excitotoxic effect on different subpopulations of neurons in the inner retina. In vivo studies performed in non-primate mammals have demonstrated that ganglion cells are especially vulnerable (Sucher et al., 1997), but a differential susceptibility was demonstrated in several types of amacrine cells. Subpopulations of GABAergic cells can

be impaired but these cells are more resistant than neurons containing calretinin, acetylcholine and tyrosine hydroxylase after ischemia followed by reperfusion (Osborne and Herrera, 1994; Barnett & Osborne, 1995; Ugarte and Osborne, 1998; Safa and Osborne, 2000; Cheon et al., 2002). Ischemia is able to induce substantial release of GABA from the neurons via Ca^{2+} -independent mechanism involving plasma membrane transporters (Neal et al., 1994). In this condition, this amino acid is taken up by Müller cells but the reduction on the cell energy level induces significant alterations in its metabolism (Zeevalk & Nicklas, 1997; Kobayashi et al., 1999) and in its subsequent re-synthesis within the neurons (Barnett & Osborne, 1995).

In primate retinas, *in vivo* studies showed that transient ischemia produced a considerable reduction in the slow axonal protein flow, especially related to the foveomacular ganglion cells of the Rhesus monkey (*Macaca fascicularis*) (Levy and Adams, 1975) as well as abnormalities in the fast axonal transport in the New World primate *Aotus trivirgatus* (Radius, 1980). In the Rhesus monkey irreparable damage to the neurons was observed only after ischemia of 105 min suggesting a relative resistance of the retina as compared to the brain (Hayreh et al., 1980), even in elderly, atherosclerotic and hypertensive monkeys (Hayreh et al., 2004). A comparative analysis between rabbit and *Macaca* retinas indicated that the primate tissue is more resistant to metabolic failure in the retinal adhesiveness to the pigment epithelium than is rabbit tissue. (Marmor & Yao, 1995). In models of experimental glaucoma, a higher vulnerability of ganglion cells has been demonstrated in specimens of *Macaca* sp. (Wyganski et al., 1995; Hare et al., 2001a, 2001b) as compared to horizontal bipolar and amacrine cells (Hof et al., 1998). Altogether, these studies reveal adaptive and long-term mechanisms triggered by ischemic insults. Nevertheless, to our knowledge, no *in vitro* studies have been performed so far on the acute effects of ischemia in the primate retina and their repercussions on the GABAergic system.

The marmoset *Callithrix jacchus* is a diurnal New World monkey that has been widely used as a suitable experimental model for comparative studies on the anatomical and functional retinal organization (Tovée et al., 1992; Troilo et al., 1993; Wilder et al., 1996; Chan et al., 1997; Ghosh et al., 1997; Chan & Grunert, 1998, Ghosh & Grunert, 1999, Martin & Grunert, 1999; Lin et al., 2000). A recent study reported that among *Callithrix*, *Macaca* and human and among non-primate mammals, there are significant differences on the distribution pattern of two splice variants of the glutamate plasma membrane transporter GLT1. Such results suggested that some differing functional properties of these retinas could occur with regard to the regulation of intra and extracellular levels of glutamate (Reye et al., 2002). Moreover, recent immunohistochemical study made in the *Callithrix* retina demonstrated that all major subgroups of ionotropic glutamate receptors, i.e., AMPA, kainate, and NMDA receptors, are present in presumed amacrine and ganglion cell processes contributing to multiple but distinct glutamate receptor pathways served by cone and rod bipolar cells (Grunert et al., 2003).

Adopting an ex vivo retinal preparation, the purpose of the present study was to analyze the acute effects of the absence of glucose or simulated ischemia induced by the absence of glucose and O₂ in the extracellular medium on the *Callithrix jacchus* retina in vitro. Emphasis was focused in which histopathological changes occur and how the GABA-immunoreactivity can be redistributed in the inner retina. In addition, it was also investigated whether the effects induced by ischemia could be reduced by a GABA transporter inhibitor, by high extracellular Mg²⁺ or by combined addition of ionotropic glutamate receptor antagonists.

Materials and Methods

Animals and anesthesia

In the present study, ten adult marmosets (*Callithrix jacchus*) of both genders (5 males and 5 females) were used. The maintenance and use of the animals complied with the principles regarding the care and use of animals employed by the Society for Neuroscience and to the ethical requirements approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the *Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil. The animals weighing 270-460 g were kept in a 12 h light/dark cycle (lights on at 6 am) environment, with food and water ad libitum. They were obtained from the Center of Primatology of *Universidade Federal do Rio Grande do Norte*, Brazil, and were also used for other experiments unrelated to the present study.

The anesthesia was induced with sodium pentobarbital (20-30 mg/kg, ip, Cristalia®, São Paulo, S.P., Brazil) associated or not with N-methyl atropine (30 mg/Kg) to avoid respiratory suffering. A higher dose of sodium pentobarbital was also used at the end of the experiments to induce euthanasia.

Dissection and treatment of retinal tissue in vitro

After the anesthesia, the eyes were enucleated, opened by encircling cut and the retinas quickly dissected in magnesium-free saline solution containing in mM: 125 NaCl; 2.5 KCl; 2.0 CaCl₂; 1.25 NaH₂PO₄ 25 glucose and 25 NaHCO₃ (type-1 saline solution; osmolarity 287-310 mOsm/Kg H₂O₂), continuously aerated with a gas mixture of 95% O₂ + 5% CO₂ (pH adjusted to 7.3-7.4). Each retina was sectioned in 10 segments: 4 segments were obtained from the horizontal meridian; 3 segments from the superior hemisphere and the others from the inferior hemisphere.

Four series of experiments were performed by incubation of retinal segments in 5 ml of saline solutions with or without glucose for 45 or 60 min at 37°C. In the first series, retinal segments were incubated in the type-1 saline solution, continuously aerated with a gas mixture of 95% O₂ + 5% CO₂ in order to simulate the control condition. In the second series, the retinal pieces were incubated in saline solution without glucose (type-2 saline solution), continuously aerated with a gas mixture of 95% O₂ + 5% CO₂ in order to investigate the effect of glucose deprivation in the presence of oxygen. In the third series, the retinal tissue was incubated in the type-2 saline solution continuously aerated with a gas mixture of 95% N₂ + 5% CO₂ in order to simulate the ischemic insult (absence of glucose and O₂). In the fourth series, was employed a modified type-1 saline solution by addition of 10 mM MgCl₂ (type-3 saline solution) in order to prevent or reduce the activation of NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels under ischemic condition. Osmolarity and pH of type-3 saline solution were kept constant by modifying the concentrations of NaCl and NaHCO₃ for 110 mM and 30 mM respectively. Each experimental treatment was repeated at least 5 times (Table 1).

The time elapsed between eye removal and immersion of retinal segments into the incubation media was never longer than 5 min. Ten retinal segments were incubated in the type-2 saline solution containing 50 µM 6-Cyano-2,3, hydroxy-7-nitroquinoline (CNQX), or 100-200 µM 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) , antagonists of AMPA / KA glutamate ionotropic receptors plus 10-20 µM 5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK-801), antagonist of NMDA receptor. Other segments were incubated in type-2 saline added with 200 mM guvacine-HCl, in order to block the plasma membrane GABA transporters. In these experiments, retinal pieces were first incubated in the presence of CNQX, MK-801 or guvacine-HCl for 10 min in type-1 saline solution and then for 45 min under ischemic condition. Dissections and treatment of all retinal segments were

conducted under ambient light (25.9 cd/m²). All pharmacological agents above cited were obtained from Research Biochemicals International (RBI, Natick, MA, U.S.A.).

Tissue fixation, histological and immunohistochemical procedures

After the incubation period, the retinal segments were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PA) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) for 2 h. In order to investigate potential histopathological changes, retinal segments representative of each experimental condition were dehydrated in ascending concentrations of ethyl alcohol, embedded in paraffin and 5-6 μ m transverse sections were stained with hematoxylin-eosin (HE).

The other segments, immediately after the fixation, were rinsed in PB, cryopreserved in increasing concentrations of sucrose (10, 20 and 30% in PB) and sectioned in order to analyze the effects of the different experimental conditions on the GABA distribution in the inner retina, adopting an immunohistochemical approach. Transverse sections of the retina (20 μ m) perpendicular to the vitreous surface were obtained by cryostat (Cryostat Microtome CM 1100, Leica Instruments, Germany) and mounted in gelatin-coated slides. These sections were processed for GABA-immunohistochemistry by using a polyclonal guinea-pig antiserum against GABA (Protos Biotech Incorporation, NY, U.S.A.) diluted 1:2,000 in tris-saline solution (TBS) + 0.3% triton X-100 (TBST), during 24 h at 22°C. Then, these sections were treated with a goat anti-guinea-pig biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), diluted 1:200 in TBST for 1 h and processed for immunoperoxidase staining using avidin-biotin-horseradish peroxidase (ABC kit, Vector) and 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma) + 0.01% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris-HCl-saline (TBS, pH 7.6) for 10 min. In the control sections, the primary antibody was omitted. The slides were mounted using 40% glycerol in PB.

Retinal transverse sections embedded in paraffin or sectioned by cryostat were also processed for identify Müller cells. The identity of these cells was investigated by immunohistochemistry, by using a polyclonal antibody against the intermediate filament of astrocytes S-100 (DAKO rabbit anti-cow S100 diluted 1:200 in TBS). The sections were processed for immunoperoxidase staining by using the LSAB-plus kit (DAKO).

A Leica DMLS microscope (Leica Instruments, Germany) coupled to Samsung high level colour camera (model SHC-410NAD) was employed to analyze and obtain digitized images of the transverse sections. In four distinct retina segments submitted to control or ischemic condition, the soma sizes of S100-immunoreactive Müller cells were measured from digitized images of the transverse sections. Cell soma perimeters were outlined and area calculations were generated for each cell using Scion® Image for Windows software, release Beta: 4.0.2 (NIH-USA, 2000). At least 100 cells for each segment and a total of 400-500 cells for each experimental condition were measured at peripheral and central eccentricities.

Results

Histological analysis of the retina integrity

Retinal transverse sections (6 μ m) stained with HE and obtained from retinal segments incubated under control conditions showed a similar aspect to that observed in retinal segments immediately fixed after enucleation, with preservation of nuclear and plexiform layers morphology (Fig. 1A). The incubation of the retina in glucose-free medium for 60 min (Fig. 1B) did not induce any change in the retinal architecture as compared to control condition. On the other hand, the simulated ischemic insult induced by the absence of glucose and oxygen in the extracellular medium for 45 or 60 min was able to provoke

histopathological changes indicative of tissue injury. Such injury was characterized by a fuzzy spongiform appearance of both inner and outer plexiform layers; swelling of several cell bodies characterized by vacuolar appearance in the ganglion cell layer and especially in the inner nuclear layer (INL) (Fig. 1C). Such signs of damage were variable within the same region and between distinct retinal regions being more pronounced at peripheral eccentricities as compared to central ones.

During the sectioning of 20 μm transverse sections in the cryostat was also observed the higher fragility of the retinal segments submitted to ischemic conditions during the freezing procedure, especially at peripheral regions. This fragility as well the edema signs and vacuolar appearance were reduced when the simulated ischemia was induced with simultaneous addition of NMDA and non-NMDA receptor antagonists (Fig. 1D) or in the presence of 10 mM Mg^{2+} (Fig. 1E) or 200 μM guvacine-HCl (Fig. 1F).

Immunohistochemical characterization of GABA-redistribution in the retina

The retinal treatment in glucose-free medium or under simulated ischemic condition induced remarkable changes in the GABA-immunoreactivity pattern as can be observed in Figure 2. Compared to control condition, where stained cell bodies were visualized in the INL and GCL and throughout the extension of the IPL (Fig. 2A), a reduced staining in the INL, and GCL was detected after 60 min of incubation in glucose-free medium (Fig 2B). In this case, only few neuronal cell bodies were GABA-stained and in some regions, 3 immunoreactive bands were seen in the sublaminae 1, 3 and 5 of the IPL. In addition, numerous well-stained polygonal cell bodies were apparent in the mid-INL, with processes traversing the IPL and cell endfeet in the optical fiber layer (OFL) (arrowheads in Fig. 2B). These cells are presumed Müller cells, which have taken up GABA from the extracellular

medium. The identity of these cells was confirmed by immunohistochemistry for S-100 in successive transverse sections of the retina. After 45 min (Fig. 2C) or 60 min (Fig. 2D) of simulated ischemia the reduction on the GABA-immunoreactivity pattern in the INL and GCL was more expressive as compared to that observed when glucose was lacking in the extracellular medium and no immunoreactive bands were seen in the IPL. GABA-immunoreactivity was detected only in presumed Müller cells (arrows in Figs. 2C and 2D).

Effects of high extracellular Mg^{2+} , GABA-transporters blocker and ionotropic glutamate receptor antagonists during simulated ischemia

Figure 3 illustrates representative transverse sections processed for GABA-immunohistochemistry (20 μ m), obtained from midperipheral retinal segments submitted to the several treatments carried out under ischemic conditions for 45 minutes. As can be seen, the treatment of the *Callithrix* retina under simulated ischemia in the extracellular medium containing 10 mM Mg^{2+} did not prevent the GABA release from the neurons and reuptake by Müller cells (Fig. 3C) compared to the GABA-immunoreactivity pattern observed under ischemic condition alone (Fig. 3B). This result suggests that even in conditions where the activation of NMDA receptor or Ca^{2+} -gated channels can be impaired, ischemia was able to induce depolarizing effects on GABAergic cells.

The combined addition of MK-801 plus CNQX or DNQX also did not completely prevent the GABA release from the neurons. Observe that even in the presence of high concentrations of MK-801 (20 μ M) plus DNQX (200 μ M), a reduced number of neuronal cell bodies and processes are immunostained for GABA (Fig. 3D) as compared to control condition (Fig. 3A). On the other hand, GABA-stained endfeet from presumed Müller cells in the OFL can be visualized (arrows in Fig. 3D).

The presence of 200 μM guvacine-HCl during simulated ischemia modified the GABA-redistribution in the tissue (Fig. 3E) as compared to the ischemic condition alone (Fig. 3B) or to control condition (fig. 3A). In figure 3E one can see that in the INL GABA staining is present in several presumed horizontal cells (arrows), amacrine cells (arrowheads) and interplexiform cells (double arrows) but was also evident in Müller cells (double arrowheads). In the IPL, GABA-immunoreactivity was more evident in sublaminae 1, 3 and 5 and several cell bodies were also stained in the GCL (dashed arrows).

Appearance of Müller cells during the ischemic condition

The identification of Müller cells by immunohistochemistry for S-100 showed that compared to the neurons located in the INL, this type of glial cell was apparently less damaged by the simulated ischemia. Figure 4A shows S-100 immunoreactivity in representative 6 μm transverse sections of *Callithrix* retina treated in the control (Fig. 4A) and ischemic (Fig. 4B) conditions. Figure 4C illustrates in higher magnification S-100 immunoreactive Müller cells in transverse section counterstained with hematoxylin in order to compare their aspect with the vacuolar appearance observed in several neuronal perikarya in the INL and GCL. The quantitative analysis of the soma size of S-100 immunoreactive Müller cells showed a significant (Student's *t* test; $p < 0,05$) increase in the soma area of these cells in retinas submitted to the ischemic condition as compared to control ones (Fig. 4B). The soma area found in retinas after ischemia ranged between 7.868 and 53.621 μm^2 (mean of $20.82 \pm 7.05 \mu\text{m}^2$; $n = 500$ cells) while in control retinas ranged between 8.116 and 48.411 μm^2 (mean of $16.32 \pm 5.23 \mu\text{m}^2$; $n = 400$ cells).

Discussion

Repercussions of the absence of glucose in the extracellular medium

The present study demonstrated that in the *Callithrix jacchus* retina, no vacuolar appearance in perikarya, edema signs or fragility of the tissue during freezing were observed when the tissue was treated in the absence of glucose in the extracellular medium. In spite of this, redistribution on the GABA-immunoreactivity pattern was detected, suggesting that a depolarizing effect on GABAergic neurons was induced. In this aspect the *Callithrix* retina appears to be more resistant than the rat retina, where the incubation in glucose-free medium disrupted both retinal morphology and GABA-immunoreactivity pattern (Kalloniatis & Napper, 2002). It has been established that vitreous contains considerable amounts of glucose and there is a species-dependent store of glycogen in the retina (review in Osborne et al., 2004). Although this issue was not investigated in the present study, one could speculate that in the *Callithrix* retina endogenous glucose or glycogen was sufficient to minimize the neuronal injury, even considering that the vitreous amount was reduced by the dissecting procedure.

On the other hand, the histopathological changes induced by the absence of glucose and O₂ for 45 or 60 min, in the *Callithrix* retina were qualitatively similar to those described in chick, rabbit and rat retinas either in vivo or in vitro studies (Mosinger et al., 1991, Zeevalk & Nicklas, 1992, 1997, Osborne & Herrera, 1994, Chen et al., 1998, Izumi et al., 2003). Although the changes indicative of neuronal damage were more pronounced at peripheral eccentricities, as compared with central ones, variability in these changes was seen in different sections from a defined retinal area in a similar way to what was observed in the rabbit retina (Marmor and Dalal, 1993; Osborne et al., 1995).

In the presence of high extracellular concentration of Mg²⁺ the activity of NMDA receptors

as well as voltage-dependent calcium channels can be significantly reduced or blocked (Bernath, 1992). Considering that in this experimental condition we detected a decrease on the swelling and vacuolar appearance induced by the simulated ischemia, it is possible that this data can be discussed considering at least 2 aspects: (1) a potential Ca^{2+} influx either by NMDA receptors or voltage-dependent channels may be one of the mechanisms involved in the acute neuronal damage in the *Callithrix* retina. Studies on isolated rat retinas showed that L-type voltage-dependent $[\text{Ca}^{2+}]$ channels contribute to up to 50% to the influx of Ca^{2+} elicited by NMDA receptor stimulation (Melena and Osborne, 2001); (2) NMDA receptor activity during ischemic conditions could be also related with disruption in the membrane integrity. In bovines, for example, the presence of ketamine (a NMDA receptor antagonist) during simulated retinal ischemia for 60 min was able to inhibit the lipid peroxidation as well the glutathione depletion induced by this type of insult (Zhou et al., 1991).

The reduced histological changes, observed in the *Callithrix* retina treated with guvacine-HCl, appear to be similar to what was observed in the chick retina treated with NNC-711 (a derivative of guvacine), under conditions of glycolytic inhibition. This similarity reinforces the hypothesis that the activity at GABA transporters contributes to acute cellular damage produced by the metabolic impairment (Zeevalk & Nicklas, 1997). It is possible that this mechanism can be a conserved feature in the retina of vertebrates, independent of their position at the phylogenetic scale or of the peculiarities of their retinal organization, vascularization or tolerance during ischemic-like insults.

It has been shown that antagonists of glutamate ionotropic receptors (NMDA and AMPA/kainate types) have a protective effect on the ischemic retina. In the rat retina, in vivo studies adopting dye/photothrombosis ischemia model, showed that 80-90% of protection of the neurons, with regard to histopathological changes was provided when intravitreal administration of NMDA plus non-NMDA glutamate receptors was performed before the

insult (Mosinger et al., 1991). In the *Callithrix* retina, either at central or peripheral regions, the presence of MK-801 plus CNQX or DNQX was able to prevent the dendritic and cytoplasmic swelling as well the edema, but a slight fragility of the tissue during freezing procedure was still observed. Preliminary results obtained in our laboratory also indicated that the addition of MK-801 alone was not sufficient to prevent the neuronal damage (data not shown). Even considering that the effects of ischemia may differ when the results of in vivo and in vitro studies are compared, the findings obtained in the present work suggest that the presence of both NMDA and non-NMDA antagonists are required to produce an effective reduction on the effects evoked by ischemia, although some degree of lesion is still observed, mainly in internal retina.

GABA-redistribution induced by glucose or glucose/O₂ deprivation

The ischemia-induced redistribution on the GABA-immunoreactivity pattern, observed in the present study was similar to what was described in the rat (Kobayashi et al., 1999; Napper et al., 2001; Barnett and Osborne, 1995; Safa and Osborne, 2000) and distinct from that reported for the albino rabbit. In this latter mammal, GABA-immunoreactivity in Müller cells under a simulated ischemic condition was only reported when the tissue was treated in the presence of vigabatrin, a GABA-transaminase inhibitor (Ugarte and Osborne, 1998).

In the *Callithrix jacchus* retina, it was suggested that rod and cone bipolar cell types contribute to multiple but distinct glutamate receptor pathways present in presumed amacrine and ganglion cells processes (Grunert et al., 2003). Evidence obtained in our laboratory also indicates that in this primate, AMPA, kainate or NMDA in retinal isolated preparations were able to induce GABA release from the most of GABA-containing cells in the inner retina and that the combined addition of NMDA and kainate or AMPA, did not enhance the effects

induced by each one of these agonists. Some amacrine and presumed ganglion cells stratifying in the sublaminae 1, 3 and 5 of the IPL were not responsive to these glutamatergic agonists (unpublished results). In the present study we have shown that the simulated ischemia for 45 min or 60 min almost abolished the GABA-immunoreactivity in neuronal cell bodies and processes being the GABA-staining restricted to Müller cells. These findings suggest that in addition to glutamate-induced changes, the ischemia provoked neuronal damage in several GABA-containing cell bodies that under physiological conditions can be or not responsive to glutamate ionotropic receptor activation.

The presence of high extracellular Mg^{2+} during the simulated ischemia did not prevent the GABA-release from the neurons and reuptake by Müller cells. Considering that in this condition, the exocytotic mechanism of neurotransmitter release can be significantly reduced or blocked, the redistribution of GABA in the inner retina indicates the expressive participation of non-vesicular glutamate release and non-NMDA receptors activation in to promote depolarization of GABA-containing neurons. The combined addition of 10 μM MK-801 plus 50 μM CNQX or 20 μM MK-801 plus 100 or 200 μM DNQX also did not reverted completely the GABA-release induced by the simulated ischemia in the *Callitrix* retina. Some hypotheses can be arisen in order to discuss these results. Synaptic communication between amacrine cells has been described in primates (Koontz & Hendrickson, 1990). It is possible that mediators other than glutamate were released during ischemia and had a direct effect on the GABA-containing cells but their isolated actions were not sufficient to induce an expressive acute cellular damage. A second hypothesis is that the ischemia itself inducing dissipation on the membrane gradient ionic would be able to induce a Na^+ influx by activation of voltage-gated channels that could depolarize neurons and cause an increased release of GABA. Evidence obtained in cultures of chick embryo retinal cells indicated that independent mechanisms of GABA release can be induced by opening of voltage-dependent Na^+ channels

or activation of glutamate receptors (do Nascimento et al., 1992, 1998). It would be interesting to investigate in future studies whether combined addition of specific Na^+ or Ca^{2+} channel blockers plus non-NMDA and NMDA glutamate receptor antagonists would be effective to completely prevent the GABA release in the *Callitrix* retina under ischemic condition.

The partial effect of glutamate receptor antagonists in the *Callithrix* retina was distinct from what was obtained in the rabbit retina under ischemia induced by elevation of intraocular pressure for 60 min followed by a reperfusion time of 45 min. In this latter study, intraocular injections of 1 μM MK-801 and 10 μM CNQX, previous to the insult, were able to totally prevent GABA-release in the tissue as assessed by GABA-immunohistochemistry (Osborne & Herrera, 1994).

One of the findings of the current work is that the blockade of GABA transporter with guvacine-HCl, during the ischemic insult, reduced acute cellular swelling and the concomitant GABA release in the extracellular medium. It is well established that guvacine is an inhibitor of GABA- transporter with higher affinity for GAT-1 than for GAT-2 and GAT-3 subtypes (Borden et al., 1992; Soudijn & Wijngaarden, 2000). In the rat, mouse and guinea pig retinas, GAT-1 is expressed by orthotopic and displaced amacrine cells, interplexiform cells and weakly expressed by Müller cells which contain predominantly GAT-3 (Johnson et al., 1996; Ruiz et al., 1994; Biedermann et al., 2002). In species of *Macaca*, Trasarti & Brecha (1999) reported that GAT-1 is mainly expressed by a heterogeneous population of amacrine cells but not in Müller cells.

The results obtained in the present study under ischemic condition suggest that in the *Callithrix* retina, GAT-1 GABA-transporter may be predominantly expressed in horizontal cells and in some subtypes of presumed amacrine and interplexiform cells that stratify predominantly in sublaminae 1, 3 and 5 of the IPL but not in several Müller cells. This data

suggest that multiple GABA-transporter subtypes are present in the *Callithrix* retina but their patterns of distribution may be distinct.

Concluding Remarks

The present series of experiments provides evidence that the absence of glucose, even during 60 min in the *Callithrix* retina was not able to induce acute neuronal damage, although depolarizing effects were observed in GABAergic cells. On the other hand, the lack of glucose and oxygen in the extracellular medium provoked neuronal damage associated to GABA-redistribution through the combined activation of ionotropic glutamate receptors and additional mechanisms involving the influx of Na^+ and Ca^{2+} . The data also indicated that in this primate, Müller cells can be more tolerant to ischemic insult as compared to the neurons and that the activity of GABA transporter contributes to the neuronal acute damage produced by metabolic impairment, especially in the absence of oxygen.

Acknowledgements

The authors are grateful to Zenira. C. Xavier, Silvania T. Paz, Rony E. de Araújo, Maria de Fátima A. Diniz, Luiz F. W. Viegas, for technical assistance in the several laboratories where this study was performed; to Dr. Eridan de Medeiros Coutinho who gently authorized the use of Cryostat Microtome CM 1100, Leica and to Dr. José Luiz M. do Nascimento and Fernando Garcia de Mello for helpful comments on the manuscript.. The collaboration of Department of Anatomy, UFPE for the use of the image acquisition system, the Laboratory of Cellular Biology and Ultrastructure of Fundação Oswaldo Cruz for the use of Axiophot and of Raimundo N. C. Pimentel for assistance in the photomicrographs are gratefully appreciated. Some reagents used in this work were partially supported by Coordenação de perfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to B.L.S.A.C and by CNPq to C. M.B.C.

REFERENCES

- Anderson, D. & Davis, E. (1975). Sensitivities of ocular tissues to acute pressure-induced ischemia. *Archives of Ophthalmology*, 93, 264-274.
- Barnett, N.L. & Osborne, N.N. (1995). Redistribution of GABA immunoreactivity following central retinal artery occlusion. *Brain Research*, 677, 337-340.
- Barnstable, C.J. (1993). Glutamate and GABA in retinal circuitry. *Current Opinion in Neurobiology*, 3, 520-525.
- Bernath, S. (1992). Calcium independent release of amino acid neuro transmitters: fact or artifact? *Progress in Neurobiology*, 38, 57-91.
- Biedermann, B., Bringmann, A. & Reichenbach, A. (2002). High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia*, 39, 217-228.
- Borden, LA, Smith, K., Hartig, P., Branchek, T. & Weinshank, R. (1992). Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 21098-21104.
- Brandstätter, J., Koulen, P. & Wässle, H. (1998). Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research*, 38, 1385-1397.
- Chan, T.L., Goodchild, A. & Martin, P.R. (1997). The morphology and distribution of horizontal cells in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*: a comparison with macaque monkey. *Visual Neuroscience*, 14, 125-140.

- Chan, T.L. & Grünert, U. (1998). Horizontal cell connections with short wavelength-sensitive cones in the retina: A comparison between New World and Old World primates. *Journal of Comparative Neurology*, 393, 196-209.
- Chen, Q., Olney, J.W., Lukasiewicz, P., Almlı, T. & Romano, C. (1998). Fenamates protect neurons against ischemic and excitotoxic injury in chick embryo retina. *Neuroscience Letters*, 242, 163-166.
- Cheon, E.W., Park, C.H., Kang, S.S., Cho, G.J., Yoo, J.M., Song, J.K. & Choi, W.S. (2002). Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol. *Neuroscience Letters*, 330, 265-269.
- Coyle, J.T. & Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689-695.
- do Nascimento, J.L., Ventura, A.L.M. & Paes de Carvalho, R. (1992). Evidence for two independent mechanisms of GABA release induced by veratridine and glutamate in monolayer cultures of chick embryo retinal cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25, 379-383.
- do Nascimento, J. L., Ventura, A.L.M. & Paes de Carvalho, R. (1998). Veratridine- and glutamate-induced release of [3H]-GABA from cultured chick retina cells: possible involvement of a GAT-1-like subtype of GABA transporter. *Brain Research*, 798, 217-222.
- Duarte, C.B., Ferreira, I.L., Santos, P.F., Carvalho, A.L., Agostinho, P.M. & Carvalho, A.P. (1998). Glutamate in life and death of retinal amacrine cells. *General Pharmacology*, 30, 289-295.

- Ghosh, K.K., Martin, P.R. & Grünert, U. (1997). Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *Journal of Comparative Neurology*, 379, 211-225.
- Ghosh, K.K. & Grünert, U. (1999). Synaptic input to small bistratified (blue-On) ganglion cells in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *Journal of Comparative Neurology*, 413, 417-428.
- Grünert, U., Lin, B. & Martin, P.R. (2003). Glutamate receptors at bipolar synapses in the inner plexiform layer of primate retina: light microscopic analysis. *Journal of Comparative Neurology*, 466, 136-147.
- Hare, W., Ton, H., Ruiz, G., Feldmann, B., Wijono, M. & WoldeMussie, E. (2001). Characterization of retinal injury using ERG measures obtained with both conventional and multifocal methods in chronic ocular hypertensive primates. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42, 127-136.
- Hare, W., WoldeMussie, E., Lai, R., Ton, H., Ruiz, G., Feldmann, B., Wijono, M., Chun, T. & Wheeler, L. (2001). Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Survey of Ophthalmology*, 45, S284-S289.
- Hassel, B., Johannessen, C.U., Sonnewald, U. & Fonnum, F. (1998). Quantification of the GABA shunt and the importance of the GABA shunt versus the 2-oxoglutarate dehydrogenase pathway in GABAergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 71, 1511-1518.

- Hayreh, S.S. & Weingeist, T.A. (1980). Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia. *British Journal of Ophthalmology*, 64, 818-825.
- Hayreh, S.S., Kolder, H.E. & Weingeist, T.A. (1980). Central retinal artery occlusion and retinal tolerance time. *Ophthalmology*, 87, 75-78.
- Hayreh, S.S., Zimmerman, M.B., Kimura, A. & Sanon, A. (2004). Central retinal artery occlusion. Retinal survival time. *Experimental Eye Research*, 78, 723-736.
- Hof, P.R., Lee, P., Yeung, G., Wang, R., Podos, S.M. & Morrison, J.H. (1998). Glutamate receptor subunit GluR2 and NMDAR1 immunoreactivity in the retina of macaque monkeys with experimental glaucoma does not identify vulnerable neurons. *Experimental Neurology*, 153, 234-241.
- Izumi, Y., Hammerman, S., Kirby, C., Benz, A., Olney, J.W. & Zorumsky, C. (2003). Involvement of glutamate in ischemic neurodegeneration in isolated retina. *Visual Neuroscience*, 20, 97-107.
- Johnson, J., Chen, T.K., Rickman, D.W., Evans, C. & Brecha, N.C. (1996). Multiple γ -aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 375, 212-224.
- Kalloniatis, M. & Napper, G.A. (2002). Retinal neurochemical changes following application of glutamate as a metabolic substrate. *Clinical and Experimental Optometry*, 85, 27-36.

- Kobayashi, N., Ishiguro, S., Tomita, H., Nishikawa, S. & Tamai, M. (1999). Changes of GABA metabolic enzymes in acute retinal ischemia. *Experimental Eye Research*, 69, 91-96.
- Koontz, M.A. & Hendrickson, A.E. (1990). Distribution of GABA-immunoreactive amacrine cell synapses in the inner plexiform layer of macaque monkey retina. *Visual Neuroscience*, 5, 17-28.
- Levy, N.S. & Adams, C.K. (1975). Slow axonal protein transport and visual function following retinal and optic nerve ischemia. *Investigative Ophthalmology*, 14, 91-97.
- Lin, B., Martin, P.R., Solomon, S.G. & Grünert, U. (2000). Distribution of glycine receptor subunits on primate retinal ganglion cells: a quantitative analysis. *European Journal of Neuroscience*, 12, 4155-4170.
- Lombardi, G., Moroni, F. & Moroni, F. (1994). Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *European Journal of Pharmacology*, 271, 489-495.
- Marmor, M.F. & Dalal, R. (1993). Irregular retinal and RPE damage after pressure-induced ischemia in the rabbit. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34, 2570-2575.
- Marmor, M.F. & Yao, X.Y. (1995). The metabolic dependency of retinal adhesion in rabbit and primate. *Archives of Ophthalmology*, 113, 232-238.
- Martin, P.R. & Grünert, U. (1999). Analysis of the short wavelength-sensitive ("Blue") cone mosaic in the primate retina: comparison of New World and Old World monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 406, 1-14.

- Massey, S.C. & Maguire, G. (1995). The Role of Glutamate in Retinal Circuitry. In *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*, ed. Wheal, H. & Thomson, A., pp. 201-221, California, USA: Academic Press Limited
- Melena, J. & Osborne, N.N. (2001). Voltage-dependent calcium channels in the rat retina: involvement in NMDA-stimulated influx of calcium. *Experimental Eye Research*, 72, 393-401.
- Mosinger, J.L., Price, M.T., Bai, H.Y., Xiao, H., Wozniak, D.F. & Olney, J.W. (1991). Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the *in vivo* adult mammalian retina. *Experimental Neurology*, 113, 10-17.
- Napper, G.A. & Kalloniatis, M. (1999). Neurochemical changes following postmortem ischemia in the rat retina. *Visual Neuroscience*, 16, 1169-1180.
- Napper, G.A., Pianta, M.J. & Kalloniatis, M. (2001). Localization of amino acid neurotransmitters following *in vitro* ischemia in the rat retina. *Visual Neuroscience*, 18, 413-427.
- Neal, M., Cunningham, J., Hutson, P. & Hogg, J. (1994). Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *Journal of Neurochemistry*, 62, 1025-1033.
- Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G. & Henneberry, R.C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Research*, 451, 205-212.

- Osborne, N.N. & Herrera, A.J. (1994). The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience*, 59, 1071-1081.
- Osborne, N.N., Larsen, A. & Barnett, N.L. (1995). Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36, 1692-1700.
- Osborne, N.N., Wood, J. & Muller, A. (1995). The influence of experimental ischemia on protein kinase C and the GABAergic system in the rabbit retina. *Neuropharmacology*, 34, 1279-1288.
- Osborne, N.N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J.H., Wood, J.P.M. & Nash, M.S. (1999). Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 43, S102-S128.
- Osborne, N.N., Casson, R., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Graham, M. & Melena, J. (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23, 91-147.
- Patel, A.J., Balász, R. & Richter, D. (1970). Contribution of the GABA bypath to glucose oxidation, and the development of compartmentation in the brain. *Nature*, 226, 1160-1161.
- Peng, Y.W., Blackstone, C., Huganir, R. & Yau, K.W. (1995). Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience*, 66, 483-497.

- Peruche, B. & Kriegestein, J. (1993). Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischaemia - an overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 17, 21-70.
- Radius, R.L. (1980). Optic nerve fast axonal transport abnormalities in primates. Occurrence after short posterior ciliary artery occlusion. *Archives of Ophthalmology*, 98, 2018-2022.
- Reye, P., Sullivan, R., Fletcher, E. & Pow, D. (2002). Distribution of two splice variants of the glutamate transporter GLT1 in the retinas of humans, monkeys, rabbits, rats, cats and chickens. *Journal of Comparative Neurology*, 445, 1-12.
- Robin, L. & Kalloniatis, M. (1992). Interrelationship between retinal ischemic damage and turnover and metabolism of putative amino acid neurotransmitters, glutamate and GABA. *Documenta Ophthalmologica*, 80, 273-300.
- Ruiz, M., Egal, H., Sarthy, V., Qian, X. & Sarkar, H. (1994). Cloning, expression and localization of a mouse retinal gamma-aminobutyric acid transporter. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35, 4039-4048.
- Safa, R. & Osborne, N.N. (2000). Retinas from albino rats are more susceptible to ischemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Research*, 862, 36-42.
- Soudijn, W. & van Wijngaarden, I. (2000). The GABA transporter and its inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 1063-1079.
- Sucher, N.J., Lipton, S.A. & Dreyer, E.B. (1997). Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Research*, 37, 3483-3493.

- Tovée, M.J., Bowmaker, J.K. & Mollon, J.D. (1992). The relationship between cone pigments and behavioural sensitivity in a New World monkey (*Callithrix jacchus jacchus*). *Vision Research*, 32, 867-878.
- Trasarti, N. & Brecha, N.C. (1999). GABA transporter-1 immunoreactive amacrine cells in the monkey retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40, S438-
- Troilo, D., Howland, H.C. & Judge, S.J. (1993). Visual optics and retinal cone topography in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vision Research*, 33, 1301-1310.
- Ugarte, M. & Osborne, N.N. (1998). The localization of endogenous zinc and the *in vitro* effect of exogenous zinc on the GABA immunoreactivity and formation of reactive oxygen species in the retina. *General Pharmacology*, 30, 297-303.
- Wilder, H.D., Grünert, U., Lee, B.B. & Martin, P.R. (1996). Topography of ganglion cells and photoreceptors in the retina of a New World monkey: the marmoset *Callithrix jacchus*. *Visual Neuroscience*, 13, 335-352.
- Wyganski, T., Desatnik, H., Quigley, H. & Glovinsky, Y. (1995). Comparison of ganglion cell loss and cone loss in experimental glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 120, 184-189.
- Zeevalk, G. & Nicklas, W. (1992). NMDA receptors, cellular edema and metabolic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 648, 368-370.
- Zeevalk, G. & Nicklas, W. (1997). Activity at the GABA transporter contributes to acute cellular swelling produced by metabolic impairment in retina. *Vision Research*, 37, 3463-3470.

Zhou, M., Ma, T. & Tseng, M.T. (1991). Effects of taurine and ketamine on bovine retinal membrane lipid peroxidation. *Neuroscience*, 45, 461-465.

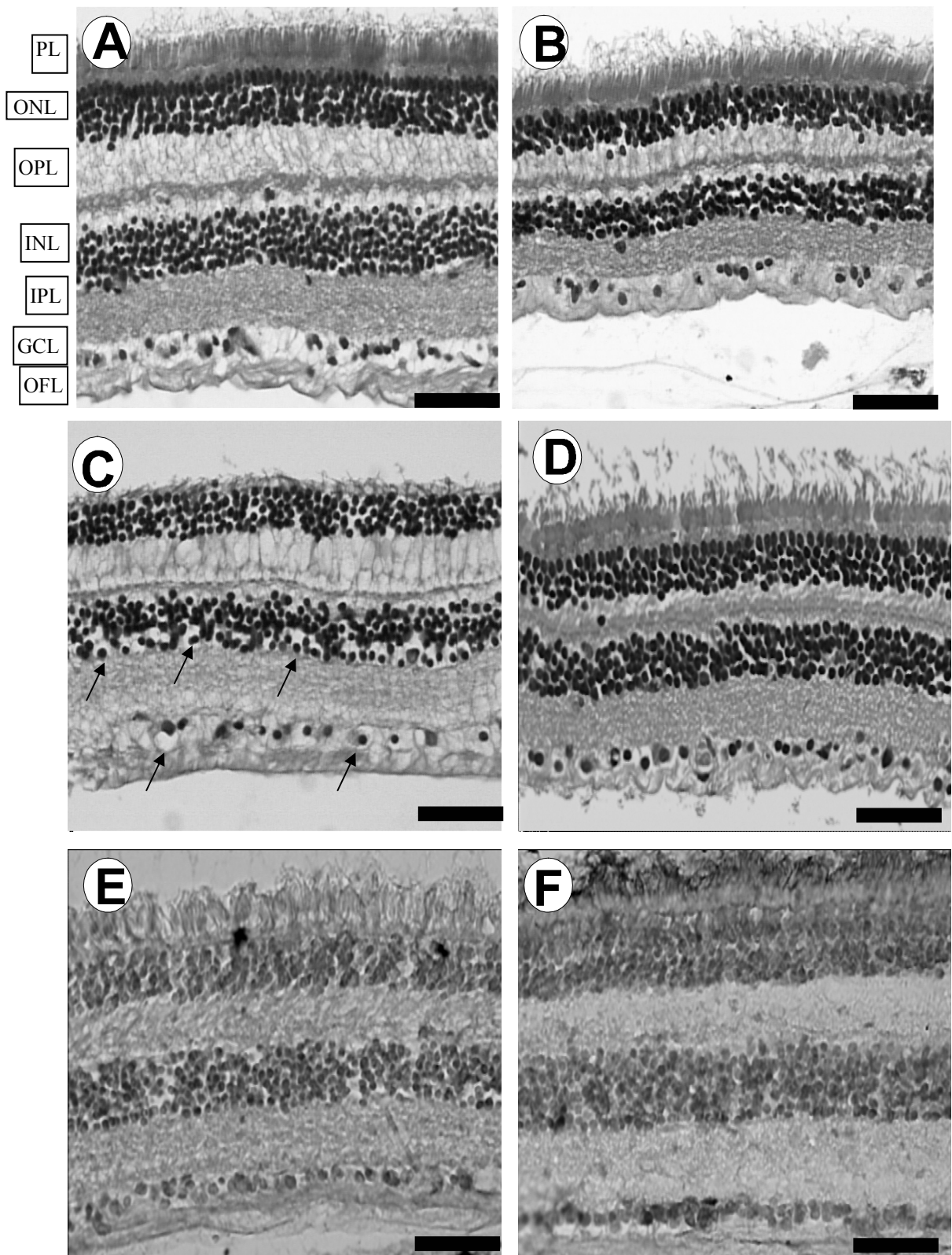


FIGURE 1: Digitized images of transverse sections of *Callithrix jacchus* retina stained by hematoxylin-eosin (A – D, 6 μ m) and toluidine blue (E – F, 20 μ m) obtained from retinal segments incubated under control condition (A), in the absence of glucose (B) or in the absence of glucose and oxygen (C) in the extracellular medium for 60 min. Note in (C) the apparent tissue injury characterized by a spongy appearance of inner and outer plexiform layers, swelling of several cell bodies and bull's eye formation in the innermost region of the inner nuclear layer and in ganglion cell layer (arrows). In simulated ischemia, attenuation of edema signs and vacuolar appearance occurred with addition of 20 μ M MK-801 + 200 μ M DNQX (D) or in the presence of 10 mM Mg^{2+} (E) or 200 μ M guvacine-HCl (F). PL = photoreceptor layer; ONL = outer nuclear layer; OPL = outer plexiform layer; INL = inner nuclear layer; IPL = inner plexiform layer; GCL = ganglion cell layer; OFL = optic fiber layer. Scale bar = 50 μ m.

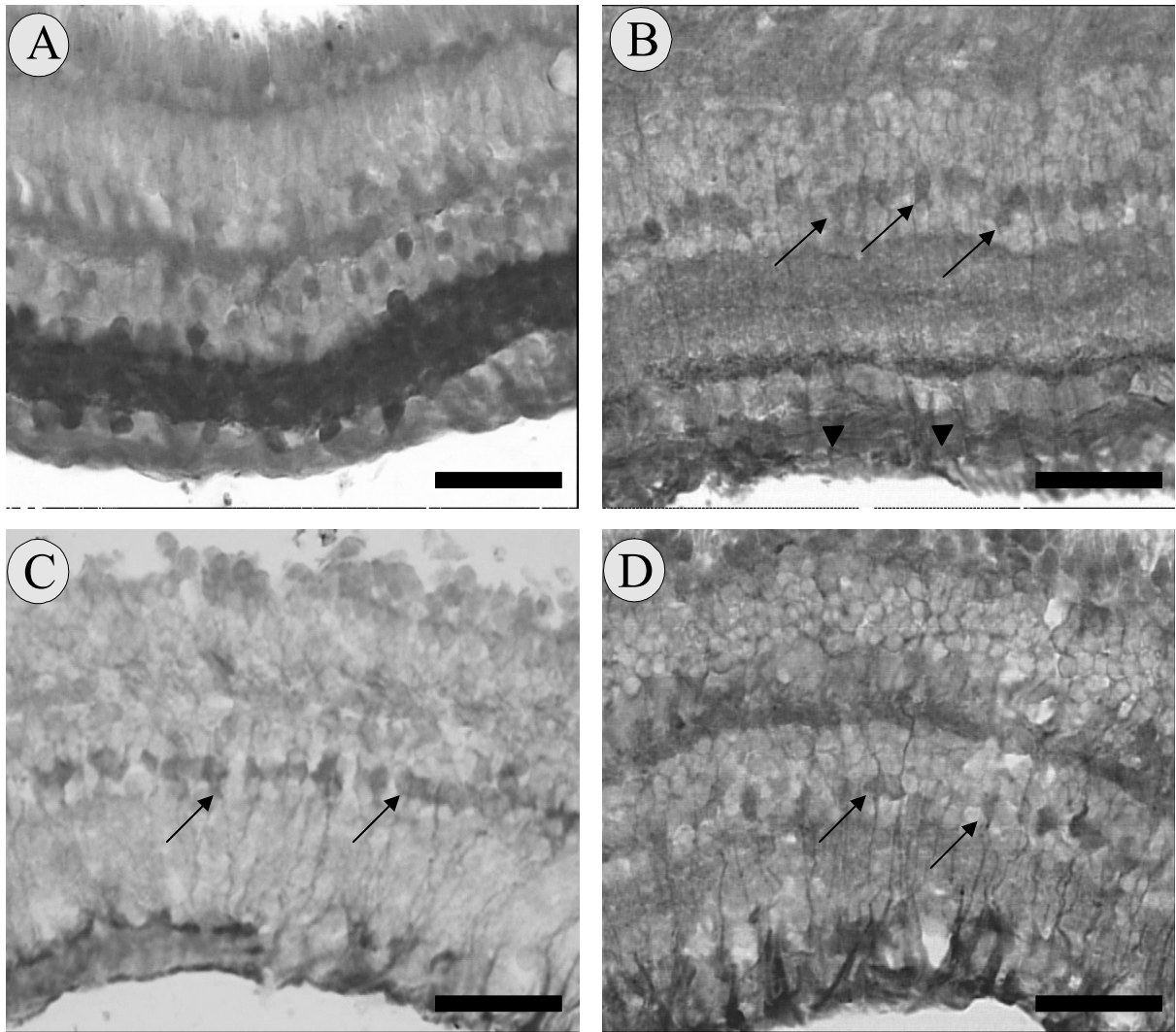


FIGURE 2. Digitized images showing the distribution of GABA-immunoreactivity (GABA-IR) in transverse sections (20 μm) of *Callithrix jacchus* retina submitted to the control condition (A), to lack of glucose (B) or to lack of glucose and oxygen in the extracellular medium for 45 min (C) and 60 min (D). In the control retina (A), GABA-IR is associated with cell bodies distributed in the inner nuclear and ganglion cell layers with their processes in the inner and outer plexiform layers. The lack of glucose in the extracellular medium (B) reduced the number of stained neuronal cell bodies, but in this condition GABA-IR is associated with the Müller cell perikarya in the inner nuclear layer (arrows) and processes in the optic fiber layer (arrowheads). In the inner plexiform layer, 3 immunoreactive bands are defined in the sublaminae 1, 3 and 5. Even under different periods of simulated ischemia (C – 45 min and D – 60 min), GABA-IR is restricted to the Müller cells (arrows in C and D) and no neuronal cell bodies and processes can be visualized. Scale bar = 50 μm .

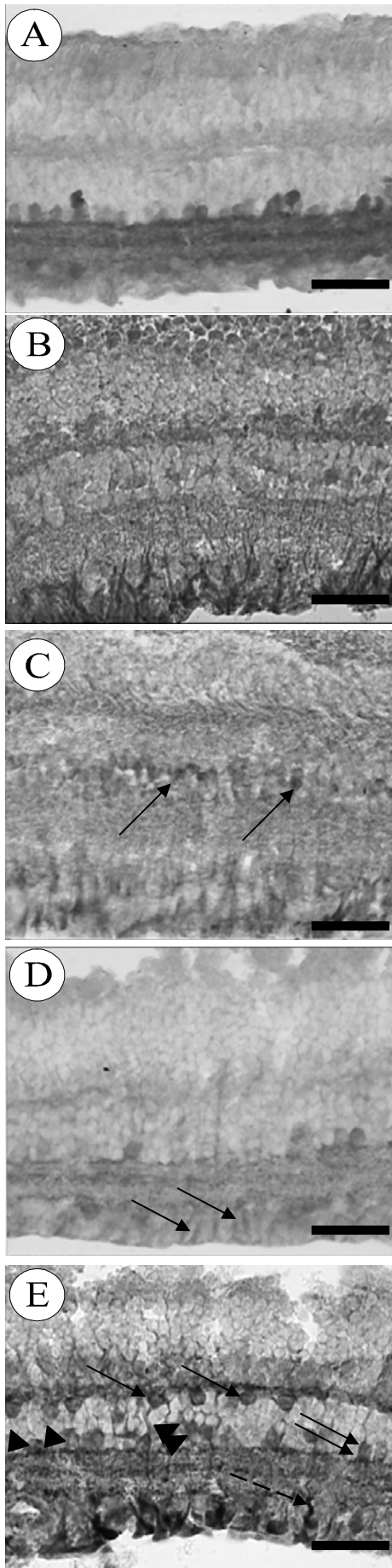


FIGURE 3. Digitized images of transverse sections (20µm) of *Callithrix jacchus* retina processed for GABA-immunoreactivity in control condition (A) and after being submitted to simulated ischemia for 45 min (B), simulated ischemia in the presence of 10 mM Mg^{2+} (C), simulated ischemia in medium containing 20 µM MK-801 + 200 µM DNQX (D) and simulated ischemia in the presence of 200 µM guvacine (E). Note the regular appearance of the retinal architecture in C, D and E as compared to A, at central regions. It can be noticed that 10 mM Mg^{2+} (C) did not prevent GABA release from the neurons and reuptake by Müller cells (arrows) as compared to GABA-IR pattern observed under ischemic condition alone (B). The combined addition of MK-801 plus DNQX (D) did not completely prevent the GABA release from the neurons. A reduced number of neuronal cell bodies and processes are immunostained for GABA as compared to control condition (see A). On the other hand, GABA-stained cell endfeet in the OFL can be visualized (arrows in D). The presence of 200 µM guvacine-HCl during simulated ischemia altered the GABA-redistribution in the tissue (E) as compared to the ischemic condition alone (B). GABA staining was visualized in several presumed horizontal cells (arrows in E), amacrine cells (arrowheads in E) and interplexiform cells (double arrows in E) but was also evident in Müller cells (double arrowheads). In the IPL, GABA-immunoreactivity was more evident in sublaminae 1, 3 and 5 and several cell bodies were also stained in the GCL (dashed arrows). Scale bar = 50 µm.

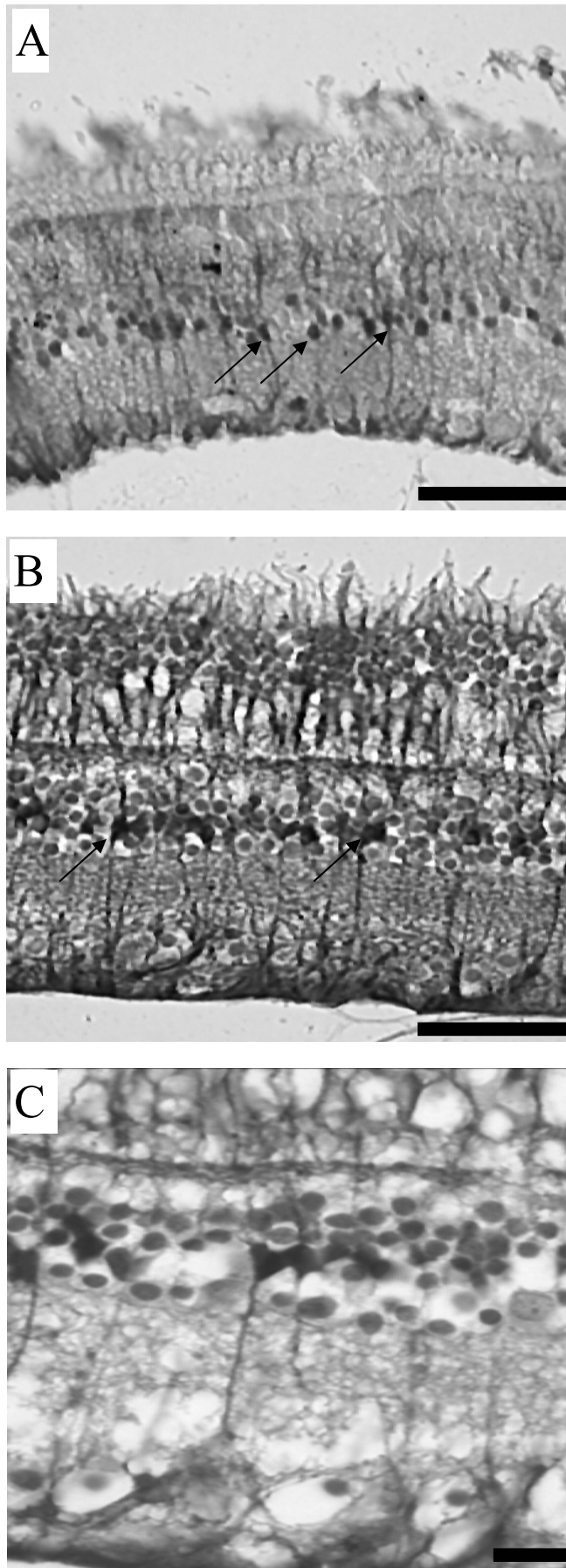


FIGURE 4. Digitized images of transverse sections (6 μm) of *Callithrix jacchus* retina immunoprocessed for the intermediate filament S-100 in order to identify the distribution and appearance of the Müller cells (arrows) in segments submitted to control (A) and simulated ischemic condition (B). In higher magnification (C), it can be noticed the apparent integrity of these cells, in spite of vacuolar appearance in several neuronal cell bodies present in the inner nuclear layer and ganglion cell layer.

Scale bars: A and B = 60 μm ; C = 30 μm .

TABLE 1

<i>EXPERIMENTAL CONDITIONS</i>	<i>Number of retinal segments treated</i>
Control	32
Lack of glucose in the extracellular medium (60 min)	3
Simulated ischemia for 45 min	13
Simulated ischemia for 60 min	6
Simulated ischemia plus 20 μ M MK-801 + 100 μ M DNQX	4
Simulated ischemia plus 20 μ M MK-801 + 200 μ M DNQX	6
Simulated ischemia plus 10 μ M MK-801 + 50 μ M CNQX	3
Simulated ischemia plus 10 mM Mg^{2+} in the medium	7
Simulated ischemia plus 200 μ M Guvacine- HCl	3

CONCLUSÕES

1. O modelo utilizado de isquemia aguda in vitro produziu alterações imediatas na arquitetura e na homeostase retinianas, com a produção de edema tecidual e lesões neuronais, comprometendo as camadas plexiformes e nucleares interna e externa além da camada de células ganglionares.

2. A retina do *Callithrix* mostrou-se bastante tolerante à ausência de glicose no meio extracelular, mesmo durante 60 minutos. No entanto, esta condição foi capaz de induzir despolarização nas células GABAérgicas.

3. As populações de neurônios GABAérgicos foram afetadas pela isquemia induzida, a qual promoveu uma modificação no padrão de imunorreatividade ao GABA, indicativa da liberação expressiva deste aminoácido, com subsequente captação pelas células de Müller. Esta liberação foi em grande parte mediada pela atividade de transportadores de membrana de alta afinidade, cuja atividade contribuiu para a produção do edema e vacuolização neuronal.

4. Os efeitos lesivos resultantes da isquemia aguda foram em grande parte mediados pela ativação conjunta de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos NMDA e não-NMDA. O bloqueio dos receptores do tipo NMDA e de canais dependentes de voltagem pelo alto magnésio no meio extracelular reduziu de forma expressiva a lesão neuronal mas não preveniu a despolarização das células GABAérgicas.

5. A neurotoxicidade aguda induzida pela isquemia na retina do *Callithrix* envolve também a participação aditiva dos íons Na^+ e Ca^+ .

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Anestesia

Foram utilizados dez espécimes adultos de *Callithrix jacchus jacchus* (sagüi) de ambos os sexos (cinco machos e cinco fêmeas) com peso variando entre 270 e 460g. Os animais foram mantidos sob acompanhamento veterinário e controle vacinal e cedidos pelo Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com a autorização do IBAMA (processo nº 02019.002157/2003). Tanto no Núcleo de Primatologia como na UFPE, os animais foram mantidos sob condições de iluminação ambiental e ciclo claro-escuro de aproximadamente 12 horas; foram alimentados com frutas, leite, ovos, cereais, complemento vitamínico e oferta de água *ad libitum*, além do fornecimento de insetos e pequenos animais vivos. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Ofício nº 078/2002 de 29 de maio de 2002).

No presente trabalho foram utilizados 19 olhos dos 10 animais, doravante citados com S1 – S10. Constatou-se em um dos animais (S9) atrofia do globo ocular direito no dia do experimento, possivelmente por perfuração acidental. Ao início de cada experimento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico (Cristalia®, São Paulo, Brasil) (20 – 30 mg/Kg). Depois de cada experimento alguns animais foram perfundidos por via transcardíaca com paraformaldeído (PA) 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M, para análise do cérebro e de outros órgãos e sistemas por professores e pesquisadores de outros departamentos da UFPE. Tal utilização conjunta teve o intuito de

otimizar ao máximo o uso de cada animal para mais de um projeto de pesquisa. As carcaças remanescentes dos animais fixados foram congeladas para incineração posterior.

Enucleação e Dissecção das Retinas e Simulação *in vitro* das Condições Controle e Isquemia

Para a realização destas etapas foram adotados protocolos experimentais similares aos descritos por Osborne *et al.*, (1997) e Andrade da Costa *et al.*, (2000, 2001). Após aprofundamento e estabilização do nível de consciência e ao se atingir a regularização da frequência respiratória, foi procedida a enucleação dos globos oculares, sempre se iniciando pelo olho direito, assim que o animal não esboçasse reação dolorosa pelo reflexo de piscar ao toque da córnea ou ao pinçamento da pele de uma das patas. Ao final da enucleação, seccionava-se sempre por último o nervo óptico, para manter a integridade nervosa e circulatória da retina durante a manipulação cirúrgica. No olho enucleado era realizada incisão circular ao nível da *pars plana* em 360°, para se remover em bloco todo o segmento anterior (figura 6).



Figura 6. Olho enucleado de sagüi seccionado ao nível da *pars plana*

Em seguida, rapidamente efetuavam-se incisões radiais na parede ocular para exposição e dissecação da retina, de forma que esta quando em montagem plana apresentasse sempre o aspecto mostrado no esquema a seguir (figura 7) com exceção do S1, no qual utilizou-se uma menor segmentação retiniana (figura 8). O tempo máximo decorrido entre a secção do nervo óptico e a clivagem dos segmentos retinianos de acordo com o esquema não ultrapassou 10 min, e durante a separação dos diversos segmentos a retina ficou em uma placa de Petri, imersa em Ringer liquor contendo glicose e saturado com 95% O₂ + 5% CO₂ (solução controle - tipo 1). A enucleação, a dissecação retiniana e o experimento simulando as situações de isquemia e controle foram realizados em ambiente com luminosidade em torno de 29,6 lux (luxímetro PHYWE). Ao se remover cirurgicamente o segundo olho (esquerdo), todos os animais receberam doses complementares de anestésico para a realização de perfusões ou como método de eutanásia.

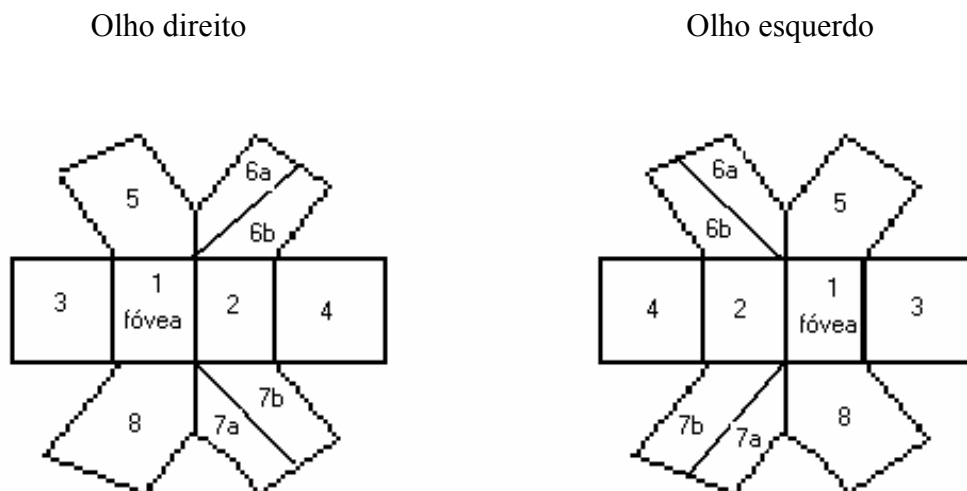


Figura 7. Esquema de dissecação e clivagem dos segmentos retinianos do *Callithrix jacchus*, utilizado nos animais S2 – S10.

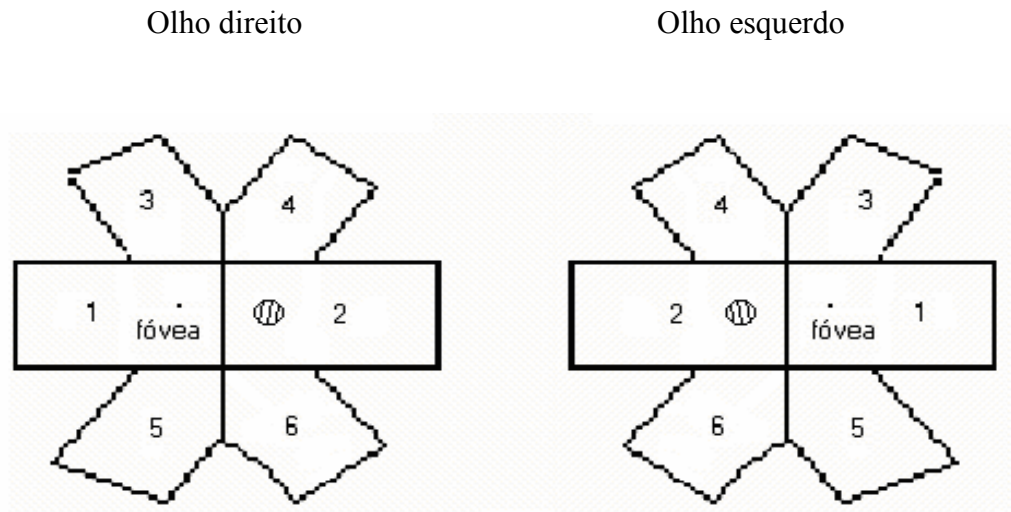


Figura 8. Esquema de dissecção e clivagem dos segmentos retinianos do *Callithrix jacchus*, utilizado no animal S1

Após a dissecção da retina, segmentos retinianos de diferentes excentricidades foram imersos em três tipos diferentes de solução Ringer liquor por 45 ou 60 minutos a 37°C e mantendo-se um pH equivalente a 7,4 e uma osmolaridade em torno de 280-310 mOsm/Kg H₂O. A distribuição e o tratamento aplicados aos segmentos retinianos de todos os animais pode ser visto em detalhes na Tabela 1.

SITUAÇÃO	n
Sem glicose (30 min)	3
Sem glicose (60 min)	3
Controle	32
Isquemia 60min	6
Isquemia 45min	13
Isquemia + MK 20 µM + DNQX 100 µM	4
Isquemia + MK 20 µM + DNQX 200 µM	6
Isquemia + MK 10µM + CNQX 50 µM	3
Isquemia + 10 mM Mg ²⁺	7
Isquemia + 200 µM Guvacina-HCl	3

Tabela 1. Número, distribuição e tratamento aplicado aos segmentos retinianos obtidos dos animais S1 – S10.

Soluções do tipo Ringer liquor utilizadas

As soluções do tipo Ringer liquor utilizadas foram preparadas com água destilada estéril (Farmace - Barbalha, CE) no dia anterior ao experimento e mantidas a 4°C até sua utilização. As soluções foram submetidas a 5-15 minutos de saturação, imediatamente antes de cada experimento, com misturas de gases contendo 95% O₂ + 5% CO₂ e 95% N₂ + 5% CO₂ (White Martins, Recife, PE) de acordo com a situação simulada, controle ou isquemia respectivamente. O intervalo de pré-saturação para cada solução foi realizado para monitoração do pH até que este atingisse um intervalo entre 7,38 e 7,41.

A composição específica de cada solução correspondeu ao propósito estudado nas diversas situações experimentais, de acordo com o que se segue:

- **Solução Tipo 1 - simulação de condição controle:** solução isenta de Mg²⁺ contendo (em mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 25 NaHCO₃, 2,0 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 25 glicose. Esta solução apresentou osmolaridade de 285 ± 4 mOsm (osmômetro mod. MARK3, Fiske Associates, Norwood, Massachusetts, EUA) e foi mantida sob saturação contínua durante todo o experimento com mistura gasosa de 95% O₂ + 5% CO₂, conservando-se o pH em 7,4 e a temperatura em 37°C.
- **Solução Tipo 2 – ausência de glicose e oxigênio para simulação *in vitro* de insulto isquêmico:** solução isenta de Mg²⁺ que apresentava a mesma composição da solução Tipo 1 exceto a glicose, para simulação de insulto isquêmico. Esta solução apresentou osmolaridade de 278 ± 3 mOsm foi mantida sob saturação contínua durante todo o experimento com mistura gasosa de 95% N₂ + 5% CO₂, conservando-se o pH em 7,4 e a temperatura em 37°C. Alguns segmentos retinianos nesta condição foram tratados com combinações de MK-801 10 ou 20 µM, DNQX 100 ou 200 µM, e CNQX 50 µM para antagonismo dos receptores

glutamatérgicos dos tipos NMDA e não-NMDA; outros segmentos foram tratados com Guvacina-HCl 200 μ M, um inibidor do transportador de membrana de alta afinidade para GABA. Os antagonistas CNQX, DNQX, MK-801 e o inibidor Guvacina-HCl foram obtidos da Research Biochemical Incorporation (RBI).

- **Solução Tipo 3 - ausência de glicose e oxigênio e com elevada concentração de magnésio:** solução contendo (em mM): 110 NaCl, 2,5 KCl, 30 NaHCO₃, 2,0 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 10 MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Esta solução apresentou osmolaridade de 290 ± 4 mOsm, e foi continuamente saturada durante o experimento com mistura gasosa de 95% N₂ + 5% CO₂ conservando-se o pH em 7,4 e a temperatura em 37°C. Nesta condição buscou-se bloquear a atividade dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA e de canais de cálcio dependentes de voltagem.

Incubação dos segmentos retinianos

Os tubos que acondicionaram os segmentos retinianos continham 5 mL da solução designada para a condição experimental determinada, e esse volume era colocado em cada tubo após ser filtrado em filtro de membrana com poros de 0,22 μ m. A saturação contínua com as misturas de gases foi feita através de sistema de distribuição de cateteres interconectados (Figura 9), com torneiras individualizadas para cada tubo, de forma a permitir ou não a passagem dos gases e o controle do borbulhamento gerado pelo gás e do tempo de saturação. Controlando-se a altura em que o cateter era mergulhado na solução Ringer Líquor, conseguia-se evitar que o segmento retiniano sofresse turbilhonamento, situação que poderia interferir com os resultados.

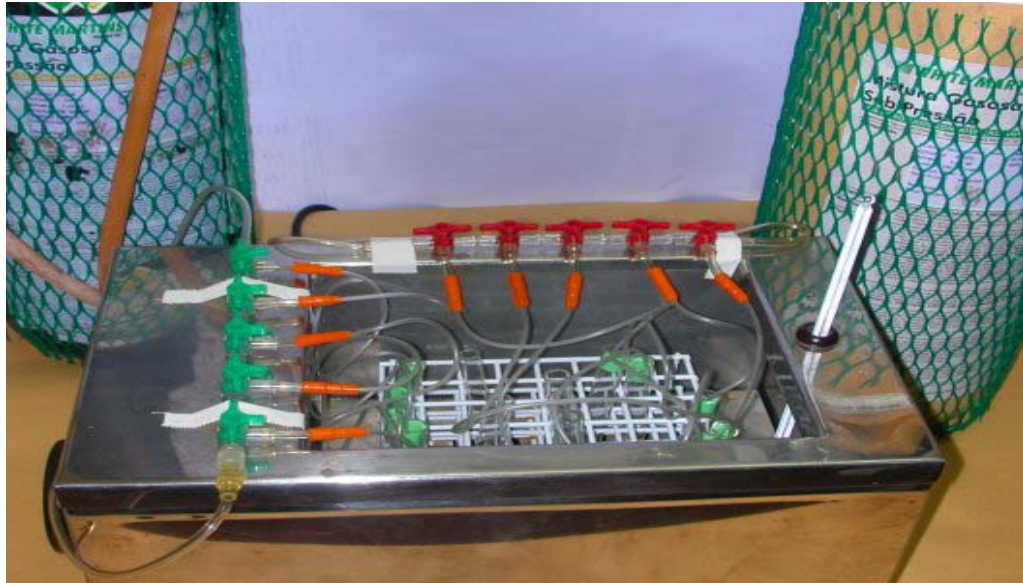


Figura 9: imagem digitalizada do sistema de distribuição de gases adaptado em banho-maria utilizado para simulação das condições controle e isquemia *in vitro* em retinas de *Callithrix jacchus*. Na maioria dos experimentos foram utilizados dois equipamentos de banho-maria, um para a condição isquêmica e outro para a condição controle.

Análise Histopatológica e Imuno-histoquímica

Uma parte dos segmentos retinianos submetidos às condições experimentais nos diferentes tipos de soluções (tipos 1, 2 e 3) foram fixados em PA 4% por 2 horas após o término de cada experimento e lavados em TF 0,1 M (3 a 5 vezes). Os segmentos retinianos destinados ao procedimento imuno-histoquímico para visualização de GABA na retina interna foram crioprotetidos em soluções de sacarose em concentrações crescentes (10, 20 e 30%) e posteriormente seccionados transversalmente em cortes de 20 μ m em criostato (Cryostate Microtome CM 1100, Leica Instruments, Alemanha) e montados em lâminas gelatinizadas. Para analisar a integridade estrutural do tecido as secções foram coradas com azul de toluidina 1% e analisadas em microscopia óptica.

Os segmentos retinianos destinados à análise histológica das lesões foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Jung AG Heidelberg - Alemanha) em cortes com espessura de 5-6 μm . Os cortes foram montados em lâminas para serem corados com hematoxilina-eosina (HE) ou em lâminas preparadas com APES (3-aminopropyl-triethoxysilane - Sigma) para processamento imuno-histoquímico para visualizar o filamento intermediário do citoesqueleto específico de células da glia, S-100. Os segmentos corados com HE foram utilizados para análise de alterações morfológicas nas células e camadas de plexos da retina, ao passo que a análise das lâminas imunoprocessadas para visualizar S-100 permitiu avaliar comparativamente o grau de comprometimento das células de Müller, nas situações controle e de isquemia *in vitro*.

Imuno-histoquímica para GABA

1. Lavagem das lâminas em Triton X-100 0,3% diluído em TF 0,1 M (TFT) por 10 min
2. Incubação com soro normal de cabra 10% em TFT por 30 min
3. Incubação do tecido com anticorpo policlonal anti-GABA (Protos Biotech Incorporation, NY, EUA) desenvolvido em porquinho-da-índia, em uma diluição de 1:2000 em TFT durante 24 horas, à temperatura ambiente (22-30° C).
4. Lavagens seriadas (3x) de 10 min com TF
5. Incubação do tecido com anticorpo secundário biotinilado desenvolvido em cabra contra porquinho-da-índia (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA - EUA) na diluição 1:200 em TFT por 60 min.
6. Lavagens seriadas (3x) de 10 min com TF
7. Incubação no complexo avidina-biotina *horseradish* peroxidase (kit ABC Elite - Vector Laboratories) diluído 1:100 em TF, de acordo com as instruções do fabricante, por 60 min.

8. Lavagens seriadas (3x) de 10 min com TF
9. Reação utilizando-se diaminobenzidina (DAB – Sigma) como cromógeno, em uma diluição de 10 mg:16,6 ml TF + 160 μ L H₂O₂ 3%. Após 5 a 15 min interrompia-se a reação lavando-se com TF e as secções foram cobertas com lamínulas usando-se o glicerol 40% diluído em TF.

Imuno-histoquímica para Proteína S-100

As lâminas contendo cortes de 5-6 μ m foram submetidas ao processo imuno-histoquímico, utilizando um anticorpo policlonal contra proteína S-100 (cód. Z0311, DAKO, Glostrup, Dinamarca), de acordo com o seguinte protocolo:

1. desparafinização com xilol e álcool
2. para bloqueio de peroxidase endógena as secções foram postas por 15 min em solução contendo 90 mL de metanol + 3 mL de H₂O₂ e lavadas em água corrente.
3. Em seguida a recuperação antigênica foi obtida através do método de calor úmido utilizando uma solução de NaCl e forno micro-ondas, novamente lavadas em água corrente e mantidas em solução salina tamponada (SST) por 5 min
4. incubação com soro normal de suíno 5% por 15 min.
5. incubação com o anticorpo primário anti-proteína S-100 em uma diluição de 1:3000 por 12 horas
6. lavagens seriadas (3X) com SST por 10 min
7. revelação utilizando-se o método da estreptoavidina – biotina (kit LSAB Plus - DAKO),
8. lavagens seriadas (3X) com SST por 10 min e com água destilada
9. utilização de DAB como cromógeno.

10. lavagem em solução de sulfato de cobre 0,5% por 5 min e água corrente.
11. contra-coloração com hematoxilina e montagem com laminulas usando-se entellan (Merck).

Citocentrifugação

Alguns segmentos de ambas as retinas, ao final dos experimentos, foram retirados dos banhos de incubação, fragmentados e colocados em tubos com 3 mL de uma solução de tripsina/EDTA 2,5 g/L (Cultilab – Campinas/SP) por 10 min a 37°C; a cada 3 minutos os tubos eram agitados manualmente para auxiliar na dissociação das células. Após o tempo decorrido os tubos eram levados para centrifugação a 1500 rpm por 3 min à temperatura ambiente, o sobrenadante era desprezado e o pellet ressuspenso com 2 mL de RPMI (Cultilab – Campinas/SP) contendo soro fetal bovino a 3%. Os tubos eram mantidos sob resfriamento em recipiente com gelo até a citocentrifugação (Citocentrífuga Wescor – modelo Cytopro 7620). Esta era realizada com alíquotas de 200 µL a 800 rpm por 10 min à temperatura ambiente, com deposição do material centrifugado em lâminas sem gelatinização; ao final do procedimento as lâminas eram imersas imediatamente em PA 4% por 15 min e colocadas para secar a temperatura ambiente. O material coletado foi utilizado para coloração em HE e análise das lesões celulares.

Processamento de Imagens e Documentação Fotográfica

A análise dos resultados foi realizada após captura de imagens das lâminas, utilizando-se um microscópio de luz Olympus BX50, objetivas planacromáticas 20X e 40X, acoplado a

uma câmera digital Samsung modelo SHC410NAD. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz (Fotomicroscópio ZEISS AXIOPHOT) com utilização de filtros azul e verde e filme ILFORD 35mm ASA 50. Para confecção das cópias utilizou-se papel fotográfico KODAK F3.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Recife, 29 de maio de 2002

Ofício nº 078/2002

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
À Profa. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Prezada Professora,

Após o recebimento de sua carta de encaminhamento solicitando análise do procedimento com animais, em seu trabalho intitulado "**Mecanismos de neurotoxicidade induzidos por glutamato, hipóxia e isquemia na retina do primata do Novo Mundo *Callithrix jacchus***", os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais a serem adotados.

Concluimos que os procedimentos descritos para o manejo e cuidado dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais pra fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Profa. Miriam Camargo Guarnieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE

Miriam Camargo Guarnieri
Chefe do Deptº Zoologia - UFPE