

VITOR CAIAFFO BRITO

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FLUOXETINA NA RETINA DE RATOS
SUBMETIDOS À FOTODEGENERAÇÃO EXPERIMENTAL**

RECIFE - PE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

VITOR CAIAFFO BRITO

ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FLUOXETINA NA RETINA DE RATOS
SUBMETIDOS À FOTODEGENERAÇÃO EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-Orientador:

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá.

RECIFE

2015

VITOR CAIAFFO BRITO

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FLUOXETINA NA RETINA DE RATOS
SUBMETIDOS À FOTODEGENERAÇÃO EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado

Área de Concentração: Morfofisiologia Animal

Aprovado em _____ de maio de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – UFRPE - Presidente

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Liriane Baratella Evêncio – UFPE

Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Arruda de Moraes – UFPE

Prof. Dr. Valdir Luna da Silva - UFPE

Ficha catalográfica

B862a Brito, Vitor Caiaffo
Atividade neuroprotetora da fluoxetina na retina de ratos submetidos à fotodegeneração experimental / Vitor Caiaffo Brito. – Recife, 2015.
131 f. : il.

Orientador(a): Joaquim Evêncio Neto.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui anexo(s) e referências.

1. Fluoxetina 2. Fotodegeneração 3. Neuroproteção
4. Retina I. Evêncio Neto, Joaquim, orientadora II. Título

CDD 591.4

“Dedico este trabalho a Deus e a todas as pessoas que me ajudaram no seu desenvolvimento. Em especial, aos meus pais, meus irmãos, à minha amada esposa e à minha iluminada filha, Lara.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ter me concebido saúde e paz para enfrentar essa caminhada.

À minha família pela força, amor e compreensão durante todo esse período. Meu Pai (Edilson Lira), minha Mãe (Maristela Caiaffo), minha Irmã (Laura Caiaffo) e meu Irmão (Dimas Caiaffo).

À minha esposa maravilhosa, Belisa Duarte, pelo grande apoio, grande força que tem me dado ao longo desses anos que estamos juntos.

À minha filha Lara, um dos motivos principais da realização deste Doutorado. E quem, mesmo sem saber, sempre me estimulou a caminhar no sentido de finalização desta etapa.

Aos meus familiares que sempre depositaram total confiança em mim. Todos os tios, tias, primos e primas que torceram por mim.

À minha segunda família: Seu Zélio e Dona Márcia, Breno, Andrea, João Guilherme e Antônio; Moema, Paulo Filho e Cecília; Felipe e Hítala. Agradeço por toda confiança depositada em mim e pelo imenso apoio, principalmente, com Lara nos momentos em que precisamos.

Ao meu orientador e amigo, o Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto, por toda a paciência e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador e colega de Área e Departamento, Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá, por todos os conhecimentos passados e execução de quase todos os experimentos em seu laboratório.

A todos os colegas professores da Área de Anatomia do DMFA: Profa. Marleyne, Profa. Rosilda, Profa. Marisa, Prof. Gileno, Prof. Alessandro e Prof. Moacir.

Aos amigos e técnicos da Área de Anatomia Priscilla e Pedro Paulo pela imensa ajuda na execução dos experimentos.

A todos os professores e colegas do DMFA pelo incentivo e pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos monitores de Anatomia Humana (Marta, Elizabete, Kalyne, Júnior, Pablo, Dayana, André, Cleidiane, Ardilles, Maria Clara) pela ajuda durante a execução das aulas da graduação.

Aos colegas de Pós-Graduação pelos momentos de felicidades, alegrias e também pelas angústias compartilhadas.

Aos Professores Álvaro Aguiar Coelho Texeira e à Professora Valéria Wanderley Texeira pela cessão do laboratório de histologia para a realização de alguns

experimentos, bem como a todos os amigos frequentadores deste laboratório: Ismaela, Carol, Cintia, Aline, Hilda, Franklin, Clóvis, Marta, Yuri, Solange, Cris. Agradeço, em especial, a Ismaela, por todos os ensinamentos laboratoriais e por “sofrermos” juntos com os experimentos oftalmológicos.

A todos os amigos do laboratório de histologia coordenado pelo Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto e pelo Prof. Fábio Mendonça: Edna, Renata, Mariana Rego, Brenda, Daniele, Priscila, Wanessa e Jéssika.

A todos os membros do laboratório de Oftalmologia Experimental: Elton Hugo, Ana Greyce, Hélio e Bruno Dabi.

À amiga Eulina e Fabiana Félix, pela sempre alegria e estímulo para a execução deste trabalho.

A André e Renata, pelos cuidados com os animais no biotério.

A Noe e Maria pela imensa ajuda na execução dos experimentos.

Aos meus grandes amigos: Os Karas, pela força e incentivo.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho analisou a neuroproteção da fluoxetina na retina de ratos submetidos à foto-exposição. Foram utilizados 45 ratos, machos, adultos, *Wistar*. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério. O estudo foi dividido em dois experimentos: Prevenção e Regeneração. No primeiro, os animais foram divididos em 3 grupos: GCP (Controle), GFotoP (Foto-exposto) e GFP (tratados com fluoxetina previamente por 7 dias antes da foto-exposição). No experimento regeneração, os animais foram divididos em 6 grupos: GC (controle), GFoto (Foto-exposto), GF 7 (Foto-exposto e tratados com fluoxetina por 7 dias consecutivos), GF 14 (Foto-exposto e tratados com fluoxetina por 14 dias consecutivos), GF 21 (Foto-exposto e tratados com fluoxetina por 21 dias consecutivos) e GF 30 (Foto-exposto e tratados com fluoxetina por 30 dias consecutivos). A foto-exposição foi realizada por 12 horas com uma intensidade de 3000 LUX. A fluoxetina foi administrada na dose de 10mg/kg de peso corporal. Para a realização do Eletroretinograma (ERG), os animais foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina (60mg/Kg) e Xilazina (20mg/Kg). Para a eutanásia, foi administrada uma sobredose de pentobarbital sódico. Em seguida, foi realizada a toracotomia e a perfusão com solução de NaCl a 0,9% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a perfusão, os olhos esquerdos foram enucleados, imersos no paraformaldeído a 4% por 48 horas, incluídos em paraplast, cortados a uma espessura de 5 µm, corados com Hematoxilina e Eosina e montados entre lâmina e lamínula. Para a morfologia e morfometria, os cortes foram fotomicrografados com o auxílio do sistema LAEZ (Leica) e mensurados com o software *ImageJ*®. Para a avaliação da apoptose celular, os cortes foram submetidos ao procedimento TUNEL. Os resultados demonstraram menor índice apoptótico, uma menor redução da espessura bem como melhor morfologia do segmento externo dos fotorreceptores dos animais tratados com fluoxetina. Ao exame de ERG, o tempo implícito e a amplitude das ondas *a* e *b*, mostraram-se melhores nos animais tratados com a fluoxetina. Desta forma, a fluoxetina, administrada tanto previamente como posteriormente à foto-exposição, apresenta uma neuroproteção importante contra os efeitos nocivos do excesso de luz na retina de ratos.

Palavras-chave: Fluoxetina, Fotodegeneração, Neuroproteção, Retina.

ABSTRACT

This study examined the neuroprotection of fluoxetine in the retina of rats subjected to photo-exposure. 45 rats, adult, Wistar were used. The animals were kept under standard vivarium conditions. The study was divided into two experiments: Prevention and Regeneration. In the first, animals were divided into 3 groups: GCP (control) GFotoP (photo-exposed) and GFP (previously treated with fluoxetine for 7 days before the photo-exposure). In the regeneration experiment, the animals were divided into 6 groups: GC (control), GFoto (Photo-exposed), GF 7 (photo-exposed and treated with fluoxetine for 7 consecutive days), GF 14 (photo-exposed and treated with fluoxetine for 14 consecutive days), GF 21 (photo-exposed and treated with fluoxetine for 21 consecutive days) and GF 30 (photo-exposed and treated with fluoxetine for 30 consecutive days). The photo-exposure was performed for 12 hours with an intensity of 3000 lux. Fluoxetine was administered at 10 mg/kg body weight. To achieve the electroretinogram (ERG), the animals were anesthetized with a Quetmanina hydrochloride (60mg/kg) and Xylazine (20mg/kg). For euthanasia, an overdose of sodium pentobarbital was administered. Then, thoracotomy was performed and the infusion solution with NaCl at 0.9% and paraformaldehyde 4% on 0,1 M phosphate buffer (pH 7.4). After perfusion, the left eyes were enucleated, immersed in paraformaldehyde 4% for 48 hours, embedded in Paraplast, sliced to a thickness of 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin and mounted between slide and cover slip. For morphology and morphometry, the sections were photomicrographed with LAEZ system (Leica) and measured with ImageJ® software. For assessment of apoptosis, the sections were subjected to the TUNEL procedure. The results showed less apoptotic index, a smaller thickness reduction as well as improved morphology of photoreceptor outer segment of the animals treated with fluoxetine. The examination of ERG, the implicit time and the amplitude of *a* and *b* wave, proved best in animals treated with fluoxetine. Thus, fluoxetine was administered both before and after the photo-exposure, shows a significant neuroprotection against harmful effects of excessive light on the retina of mice.

Keywords: Fluoxetine, Photo-degeneration, Neuroprotection, Retina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Geral.....	22
2.2. Específico.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Retina.....	23
3.2. Eletrofisiologia Ocular	37
3.3. Degeneração Retiniana.....	49
3.4. Fototoxicidade	52
3.5. Terapêutica Contra a Degeneração Retiniana Induzida pela Luz	58
3.6. Fluoxetina.....	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.1. Amostra	71
4.2. Desenho Experimental	71
4.3. Exposição à Luz	72
4.4. Eletrorretinograma.....	73
4.5. Eutanásia, Coleta do Material e Histometria	75
4.6. Procedimento TUNEL	76
4.6. Análise Estatística	77
5. RESULTADOS.....	78
5.1. Morfologia e Espessura das Camadas da Retina	78
5.2. Apoptose	83
5.3. Eletrorretinograma.....	87
6. DISCUSSÃO	96
7. CONCLUSÃO	102
8. REFERÊNCIAS.....	103

ANEXO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento embrionário do olho de um animal vertebrado. (Adaptado de Gilbert, 2000). A: Embrião com 4 mm; a vesícula óptica evagina do Telencéfalo e contacta com a ectoderme sobrejacente, induzindo a formação do placóide da lente (B); B: embrião com 4,5 mm; a ectoderme diferencia-se em células da lente; C: a vesícula óptica dobra-se sobre si mesma dando origem à tacícula óptica bilaminar e o placóide da lente diferencia-se na vesícula da lente; as duas camadas celulares da tacícula óptica vão-se diferenciar para formar a retina pigmentar e a retina nervosa. D: a vesícula que forma a lente induz a formação da córnea partir da ectoderme sobrejacente.	25
Figura 2. Desenho esquemático do globo ocular.	27
Figura 3. Diagrama da organização celular da retina (adaptado de KOLB, FERNANDEZ; NELSON, 2003).....	28
Figura 4. Curva de Sensibilidade Espectral de Cones e Bastonetes. S: <i>short wavelength sensitive</i> . B: bastonetes. M: <i>midlle wavelength sensitive</i> . L: <i>long wavelength sensitive</i> . (Adaptado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cone-response.png).	31
Figura 5. Constituição e diferenças entre a estrutura do cone e do bastonete. (Adaptado de BERNE; LEVI. <i>Physiology</i> , 2000)	33
Figura 6. Esquema da cascata da fototransdução no segmento externo do fotorreceptor (PURVES et al., 2001)	40
Figura 7. Representação esquemática da ativação das células bipolares on e off. (A): Ativação de uma célula bipolar centro on e periferia off. (B): ativação de uma célula bipolar centro off e periferia on (Adaptado de http://dstrong.blog.uvm.edu/neuroblog/center-surround.jpg)	43
Figura 8. Ilustração, mostrando as formas de ondas obtidas com o estímulo emitido (Adaptado de MARMOR et al., 2009).....	47
Figura 9. Câmara de Fotoexposição.	73
Figura 10. Luxímetro digital (Instrutherm LD-240).	73
Figura 11. Exame de Eletrorretinografia. A – Posicionamento do animal, dos eletrodos e do <i>flash</i> de luz. B – Sistema de captura dos sinais elétricos - Nihon Kohdem, Neuropack 2. MEB-7102A/k.....	75
Figura 12. Fotomicrografia da retina de ratos, ilustrando as mensurações da espessura total da retina e da CNE com o auxílio do <i>software ImageJ® for Windows</i>	76

Figura 13. Fotomicrografias da retina de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. A – GCP. B – GFotoP. Observar os danos retinianos como: degeneração e redução da espessura da CNE (setas vermelhas) e degeneração do segmento externo dos fotorreceptores (setas pretas). C – GFP. Apresenta uma melhor morfologia do segmento externo dos fotorreceptores e também uma maior espessura e melhor organização da CNE. Coloração H.E.79

Figura 14. Fotomicrografias da retina de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. A – GC. B – GFoto. Observar os danos retinianos como: a presença de degeneração do segmento externo dos fotorreceptores (setas pretas) e a degeneração com redução da espessura da CNE (setas vermelhas). C – GF 30. Apresenta uma melhor organização das camadas retinianas, com recuperação da espessura total e da CNE e também melhor morfologia do segmento externo dos fotorreceptores. Coloração H.E.80

Figura 15. Espessura total da retina e da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. Observar o aumento da espessura nos animais do GFP. * $p < 0,05$ entre os GFotoP e GFP.....81

Figura 16. Espessura total da retina e das camadas nuclear externa e interna de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. Observar o aumento da espessura dos animais submetidos ao tratamento com fluoxetina, em especial, dos animais do GF 30. * $p < 0,05$ entre os grupos GF 30 e GFoto..82

Figura 17. Fotomicrografia com fluorescência da retina de ratos submetidos à fotoexposição e à administração prévia da fluoxetina, demonstrando a marcação das células em apoptose pelo método TUNEL na cor vermelha. A – GC. B – GFotoP. C – GFP.....83

Figura 18. Número de células TUNEL positivas da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. * $p < 0,05$, GFotoP x GC e GFP x GC. ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP..84

Figura 19. Fotomicrografia com fluorescência da retina de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior à foto-exposição, da fluoxetina, demonstrando a marcação das células em apoptose pelo método TUNEL na cor vermelha. A – GC, B – GFoto, C – GF 7, D – GF 14, E – GF 21, F – GF 30.....85

Figura 20. Número de células TUNEL positivas da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. * $p < 0,05$, GFotoP x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC; ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto; [#] $p < 0,05$, GF 14 x GF 7, GF 21 x GF 7, GF 30 x GF 7; ^a $p < 0,05$, GF 21 x GF 14, GF 30 x GF 14; ^b $p < 0,05$, GF 30 x GF 21.86

Figura 21. Fotomicrografia com fluorescência da retina de ratos submetidos à fotoexposição e à administração, da fluoxetina 7 dias antes da foto-exposição (A) e 7

dias após a foto-exposição (B), demonstrando a marcação das células em Apoptose pelo método TUNEL na cor vermelha.

.....86

Figura 22. Eletrorretinograma escotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP. **B** – Tempo implícito da resposta das células retiniana desde a emissão do flash de luz até o desencadeamento do potencial de ação. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da onda A, em μV . ** $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP 788

Figura 23. Eletrorretinograma escotópico misto de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP, aproximando-se do formato de onda adquirido dos animais do GCP. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da ondas A e B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP.; # $p < 0,05$, GFP x GCP...89

Figura 24. Eletrorretinograma fotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP, aproximando-se do formato de onda adquirido dos animais do GCP. **B** – Tempo implícito da resposta das células retiniana desde a emissão do flash de luz até o desencadeamento do potencial de ação. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da onda A, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP; # $p < 0,05$, GFP x GCP90

Figura 25. Eletrorretinograma flicker de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude das ondas A e B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP; # $p < 0,05$, GFP x GCP..91

Figura 26. Eletrorretinograma escotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: * $p < 0,05$, GFoto x GF 30. Onda B: * $p < 0,05$, GFoto x GF 7; Gfoto x GF 14; GFoto x GF 21; GFoto x GF 30. **C** – Amplitude da onda A, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. # $p < 0,05$, GF 30 x GF 7. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 30 x GFoto...92

Figura 27. Eletrorretinograma escotópico misto de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: *p<0,05, GFoto x GC. **p<0,05, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. Onda B: *p<0,05, GFoto x GC, GF 21 x GC, GF 30 x GC. **p<0,05, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. **C** – Amplitude Onda A, em μV : *p<0,05, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC, GF 30 x GC. **p<0,05, GF 14 x GFoto, GF 30 x GFoto. Amplitude da Onda B, em μV : *p<0,05, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; **p<0,05, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto..**93**

Figura 28. Eletrorretinograma fotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: *p<0,05, GFoto x GF 30. **C** – Amplitude da onda A, em μV . *p<0,05, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC; **p<0,05, GF 30 x GFoto. #p<0,05, GF 30 x GF 7. **D** – Amplitude da onda B, em μV . *p<0,05, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; **p<0,05, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. . #p<0,05, GF 30 x GF 7.**94**

Figura 29. Eletrorretinograma flicker de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. *p<0,05, GFoto x GC. **p<0,05, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. **C** – Amplitude, em μV : *p<0,05, GFoto x GC. **p<0,05, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto.**95**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Camadas celulares da retina (adaptado de Slatter, 2008).	28
--	-----------

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
μV	Microvolt
AA	Ácido Araquidônico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AP-1	Proteína Ativadora
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
ATF	Fator de Ativação Transcricional
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
BAD	Promotora de Morte Celular Associada ao gene BCL-2
BAX	Gene Pró-apoptótico
BCL-2	Família Gênica
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
bFGF	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
Ca ⁺⁺	Íon Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CG	Células Ganglionares
CNE	Camada Nuclear Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Plexiforme Interna
CREB	Proteína Ligante ao Elemento de Resposta do AMPc
D.O.	Disco Óptico
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DM	Diabetes Mellitus
DMAI	Degeneração Macular Associada à Idade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRP	Precursor Definitivo da Retina Embrionária
DRT	Depressão Resistente ao Tratamento
DTL	Eletrodo de Córnea desenvolvido por Dawson, Trick e Litzkow

EGCG	Epigallocatequina Galato
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	Eletrorretinograma
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Administração de Comidas e Medicamentos
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GC	Grupo Controle
GCP	Grupo Controle Pré
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado das Células da Glia
GDP	Guanosina Difosfato
GF 14	Grupo Fotoexposto e Tratado com Fluoxetina por 14 Dias Consecutivos
GF 21	Grupo Fotoexposto e Tratado com Fluoxetina por 21 Dias Consecutivos
GF 30	Grupo Fotoexposto e Tratado com Fluoxetina por 30 Dias Consecutivos
GF 7	Grupo Fotoexposto e Tratado com Fluoxetina por 7 Dias Consecutivos
GFoto	Grupo Fotoexposto
GFotoP	Grupo Foto Pré
GFP	Grupo Fluoxetina Preventivo
GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
IFN- γ	Interferon Gama
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina

K ⁺	Íon Potássio
Kd	Kilo-dalton
Kg	Kilograma
LUX	Unidade SI de medida de iluminamento
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MLE	Membrana Limitante Externa
MLI	Membrana Limitante Interna
mm	Milímetro
Na ⁺	Íon Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
NO	Nervo Óptico
NO•	Óxido Nítrico
O ₂ •	Radical Superóxido
OH•	Radical Hidroxila
PEDF	Fator Derivado do Epitélio Pigmentar
p-EIF2a	Fator de Iniciação Eucariótica
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKB - AKT	Proteína Kinase B
RD	Retinopatia Diabética
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROO•	Radical Peroxil
RP	Retinite Pigmentosa
RPE 65	Proteína Específica do Epitélio Pigmentar da Retina de 65KDa
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da visão em animais vertebrados constitui um processo de alta complexidade, sendo a retina, a camada primariamente responsável pela visão. É considerada uma extensão do sistema nervoso central e, juntamente com o nervo óptico, é derivada do prosencéfalo embrionário (SLATTER, 2005). A retina apresenta uma arquitetura em camadas alternantes de neurônios (camadas nucleares interna e externa e camadas de células ganglionares), interposta com duas camadas plexiformes, onde ocorre a comunicação neuronal a nível de sinapses entre dendritos e entre dendritos e axônios. A retina inclui tipos celulares responsáveis pelas funções sensorial, regulatória, nutricional e imunomoduladora (MASLAND, 2001).

Os neurônios (fotorreceptores, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares) desempenham funções sensoriais e definem a percepção de cor, resolução espacial e discriminação de contraste (MASLAND, 2001). As células de Müller, os astrócitos e as micróglia, tipos de células gliais, provêm suporte nutricional, regulatório e proteção para os neurônios (GARDNER et al., 1997). Além disso, as micróglia também podem realizar a fagocitose, por exemplo, de fotorreceptores, em determinadas situações patológicas (JOLY et al., 2009). A camada de células do epitélio pigmentado serve também como um condutor seletivo de substrato, semelhante à barreira hemato-retiniana externa e permite a difusão de oxigênio da coróide para a retina externa; remove o ácido láctico da retina e fagocita o segmento externo dos fotorreceptores, constituindo a barreira hemato-retiniana externa, absorve luz, secreta fatores tróficos como o fator derivado do epitélio pigmentar, e, em conjunto com os fotorreceptores, participam do ciclo da vitamina A (STRAUSS, 2005). As funções imunomoduladoras são desempenhadas principalmente pela micróglia (KRADY et al., 2005) e as células vasculares endoteliais e os pericitos dão suporte nutricional e removem produtos indesejáveis enviados para o interior da retina (GARDNER et al., 2002).

As afecções que atingem a retina constituem um grande risco à sua integridade. Por ser um tecido que não se regenera, a retina pode sofrer degenerações, displasias e outras enfermidades que podem comprometê-la irreversivelmente (SLATTER, 2005).

Entre as degenerações de caráter adquirido, a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) se destaca como a maior causadora de cegueira entre os idosos no mundo (GEHRS et al., 2006). Segundo Gu et al. (2003), cerca de 35% das pessoas com déficit visual acima de 75 anos possuem algum grau de DMAI. É uma doença de causas multifatoriais que envolvem diversos fatores de risco tanto ambientais, quanto demográficos e genéticos, como idade, gênero, etnia, dieta, tabagismo, educação, doenças cardiovasculares e exposição à luz (VILLEGAS-PÉREZ et al., 2005; COLEMAN et al., 2008; JAGER et al., 2008).

O processo pelo qual a luz é o agente causador da lesão denomina-se fototoxicidade ou degeneração luz-induzida. O mecanismo é dado da seguinte forma: o excesso de luz pode, num curto período, induzir a fototransdução de grandes quantidades de rodopsina, liberando radicais livres em excesso, e levando ao estresse oxidativo dos fotorreceptores e do epitélio pigmentado da retina (EPR). Além disso, o acúmulo de componentes ou toxinas não digeríveis, oriundos da fagocitose dos discos de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores no EPR leva à redução das funções vitais e eventualmente à morte celular (REMÉ et al., 2003; CINGOLANI et al., 2006).

Os fotorreceptores também são diretamente atingidos pelos resíduos da fototransdução excessiva. A grande quantidade de radicais livres no meio intercelular induz a formação de proteínas e lipídios de membrana danificados, levando ao desequilíbrio da célula que pode entrar em colapso e iniciar a cascata de eventos que culminarão na morte por apoptose (HAFEZI et al., 1997). Os mecanismos de fototoxicidade podem variar dependendo da intensidade, duração, e espectro da luz (REMÉ, 2005).

A degeneração dos fotorreceptores envolve também outros tipos celulares importantes como as micróglia e macrófagos. As micróglia são células da glia residentes na neuroretina e são ativadas quando ocorre morte celular dos fotorreceptores, migrando da camada nuclear interna da retina até a camada nuclear externa, onde iniciam o processo de fagocitose das células danificadas. Joly et al. (2009) demonstraram que apesar da retina possuir um privilégio imunológico, com sua barreira hemato-retiniana, durante o processo de degeneração da retina, ocorre a migração concomitante de micróglia residentes e de macrófagos originados da

circulação sanguínea que alcançam a retina, via circulação, através do nervo óptico ou através do corpo ciliar.

Atualmente não existe qualquer tratamento que recupere os fotorreceptores perdidos no processo de degeneração retiniana. Alguns trabalhos buscam identificar componentes nutricionais anti-oxidantes que possuam características neuroprotetoras. Costa et al. (2008) demonstraram que uma substância (catequina) presente no chá verde reduziu os efeitos deletérios sobre fotorreceptores de ratos submetidos à foto-exposição. Sangiovanni e Chew (2005) mostraram que ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ômega-3) podem atuar como protetor de patologias associadas à isquemia, luz, oxigênio e inflamações na retina neural e vascular. Xie et al. (2007) demonstraram que a administração oral do extrato de *Ginko biloba* promoveu um aumento da habilidade antioxidativa da retina como também inibiu parcialmente a apoptose de fotorreceptores.

A administração de fármacos psiquiátricos relacionados com transtornos de humor, depressão e ansiedade está sendo foco de diversos estudos devido ao fato de tais medicamentos possuírem funções moduladoras das atividades celulares do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (CRESPI, 2010; RÉUS et al., 2012).

A fluoxetina [3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-propylamine], por ser um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), é comumente utilizada em tratamentos para a depressão (WONG; PERRY; BYMASTER, 2005). A fluoxetina tem emergido como o medicamento de escolha para a depressão por causa de seu perfil mais seguro, menos efeitos colaterais e mais tolerabilidade (WILDE; BENFIELD, 1998). Diversas pesquisas têm encontrado funções importantes da fluoxetina relacionada ao SNC. Zhang et al. (2012) encontraram função neuroprotetora da fluoxetina contra a ativação microglial mediada por neurotoxicidade em células neuronais. Novio et al. (2011) demonstraram um efeito positivo da fluoxetina contra danos celulares oxidativos decorrentes do stress. Zafir e Banu (2007) também demonstraram o potencial antioxidante da fluoxetina, afirmando que este potencial pode contribuir para sua ação terapêutica, sendo um importante mecanismo intracelular subjacente aos efeitos farmacológicos protetores observados clinicamente no tratamento de várias doenças relacionadas ao stress. A

ação antiinflamatória da fluoxetina também foi demonstrada por Abdel-Salam, Baiuomy e Arbid (2004) ao utilizar ratos induzidos a processos inflamatórios com carragenina e obtiveram respostas inflamatórias semelhantes a fármacos padrão para o tratamento de quadros inflamatórios. A administração de fluoxetina também contribui para a redução dos níveis de apoptose celular. Kolla et al. (2005) demonstraram uma maior sobrevivência neuronal e uma redução dos níveis de mediadores de apoptose e de substâncias oxidativas como a superóxido dismutase e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Makkonen et al. (2011), estudando crianças com autismo, demonstram um aumento da concentração de IGF-1 (um importante fator neurogênico do SNC) após a utilização de fluoxetina. Estes autores ainda afirmam que essa elevação dos níveis de IGF-1 deve ter um importante papel no desenvolvimento cerebral e na modulação dos processos neuronais.

A busca incessante por terapias que possam promover uma proteção e/ou regeneração das células retinianas, em especial os fotorreceptores, tem sido alvo de diversas pesquisas seja *in vitro* ou *in vivo*. Portanto, o presente trabalho visa analisar a atividade neuroprotetora da fluoxetina na retina de ratos submetidos à foto-exposição experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar a atividade neuroprotetora da fluoxetina na retina de ratos submetidos à fotodegeneração experimental.

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar funcionalmente a retina, através do exame de eletrorretinograma de campo total, de ratos submetidos à fotodegeneração e ao tratamento com fluoxetina;
- Avaliar histologicamente, através da microscopia óptica, a estrutura da retina de ratos submetidos à fotodegeneração e ao tratamento com fluoxetina;
- Avaliar, morfometricamente, a espessura total da retina e da camada nuclear externa (CNE) e de ratos submetidos à fotodegeneração e ao tratamento com fluoxetina;
- Avaliar, através do método TUNEL, o índice de apoptose dos fotorreceptores da retina de ratos submetidos à fotodegeneração e ao tratamento com fluoxetina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. RETINA

EMBRIOLOGIA

O desenvolvimento do olho, assim como os demais órgãos, pode ser dividido em três fases: embriogênese (fase de diferenciação das três camadas primárias que formam o embrião; inicia-se na fertilização e termina com a individualização da endoderme, mesoderme e ectoderme), organogênese (fase de organização das três camadas embrionárias no padrão geral dos diferentes órgãos) e diferenciação (onde ocorre um desenvolvimento detalhado das características estruturais de cada órgão). As diferenças verificadas entre as várias espécies, no que diz respeito ao desenvolvimento dos olhos, estão relacionadas com a duração da gestação, com a localização anatômica final dos olhos e com a idade em qual se verifica a abertura das pálpebras (BARISHAK; OFRI, 2007).

No início da gestação, durante a intensa atividade mitótica, em determinado estágio, o embrião apresenta 16 células e encontra-se no estado de mórula. Com a continuidade do desenvolvimento embrionário, o embrião assume o estado de blastocisto ou embrião de duas camadas celulares (epiblasto e hipoblasto). Quando se forma o sulco primitivo ao longo do eixo ântero-posterior da porção caudal do blastocisto e com um nodo caudal (nodo de Hensen), tem início a diferenciação em gástrula ou embrião de três camadas (ectoderme, endoderme e mesoderme). Algumas células epiblasticas penetram pelo nodo caudal de Hensen e migram cranialmente ao longo da linha média sob o sulco primitivo, formando a notocorda. Do nodo de Hensen são libertados sinais que vão induzir a diferenciação da ectoderme (que reveste a gástrula) para formar a placa neural. Estes sinais incluem, entre outros, a supressão da proteína responsável pela morfogênese dos osso (BMP ou *bone morphogenetic protein*). As BMPs formam uma família de moléculas sinalizantes relacionadas com elementos da superfamília dos TGF ou *transforming growth factor*. Nos animais vertebrados estes fatores expressam-se em vários tecidos e órgãos embrionários, regulando a apoptose e proliferação celular (BARISHAK; OFRI, 2007).

Um terceiro fator a ter em conta, pela sua importância, é o das células estaminais da retina. Durante o processo de clivagem da mórula, este grupo de células embrionárias pluripotentes adquire competências e contribui para a formação da retina. Um subconjunto menor desta classe de células contribui para produzir os precursores definitivos da retina embrionária ou DRPs (*definitive embryonic retina producing precursors*) que darão origem a todas as estruturas da retina madura. Em seguida, durante a morfogênese do tubo neural, vão ocorrer outras interações que conduzem à segregação da população de DRPs em três estruturas principais: o pedículo óptico (precursor do nervo óptico), o epitélio pigmentar da retina e a retina nervosa. Estas estruturas produzirão diferentes subconjuntos de células progenitoras da retina que vão adquirir funções distintas na retina madura (BARISHAK; OFRI, 2007).

Uma vez formada a placa neural, suas bordas livres se elevam em pregas e reúnem-se dorsalmente sobre a linha média do embrião. Ao se fundirem forma-se um lúmen, o tubo neural (BARISHAK; OFRI, 2007).

As células da placa neural são células neuroepiteliais e se dividem rapidamente. Na extremidade cranial do tubo neural, tais células formarão três tumefações, as vesículas cerebrais primárias, separadas entre si por constricções. São elas: o Prosencéfalo, o Mesencéfalo e o Rombencéfalo. Simultaneamente, forma-se a Flexura Cefálica, que corresponde à flexão do tubo neural na porção medial do cérebro, entre o Mesencéfalo e o Rombencéfalo. Em seguida, o Prosencéfalo subdivide-se em Telencéfalo (anteriormente) e Diencefalo (posteriormente). Durante a gestação, a formação do olho (organogênese propriamente dita) tem início muito cedo e se dá a partir do desenvolvimento de uma protuberância do telencéfalo. Esta estrutura, denominada vesícula óptica (figura 1A), cresce a partir do cérebro para o exterior e em direcção à ectoderme, mantendo-se ligada ao encéfalo por meio do pedículo óptico. À medida que a vesícula óptica se aproxima da ectoderme, induz a formação do placóide da lente (lentic ou cristalino). Esta estrutura embrionária ganha espessura e migra para o interior da vesícula óptica (figura 1B), separando-se da superfície da ectoderme. A porção da ectoderme que contacta com o placóide da lente, reestrutura-se e forma o epitélio que dará origem à córnea (figura 1D). Ao longo deste processo a vesícula óptica colapsa e forma a tábula óptica bilaminar, constituída por duas camadas celulares (interna e externa) (WILCOCK, 2007).

As células da camada celular mais externa da tacícula óptica bilaminar (figura 1C) produzem melanina e formam a retina pigmentar. As células da camada mais interna proliferam rapidamente e se diferenciam em células da glia, células ganglionares, interneurônios e fotorreceptores (neurônios especializados em captar fótons de luz). Em conjunto, estas células constituem a retina nervosa ou neuro-sensorial. Os axônios das células ganglionares reúnem-se ao nível do disco óptico (D.O.) onde se juntam para formar o nervo óptico (NO), segundo par de nervos cranianos (GILBERT, 2000).

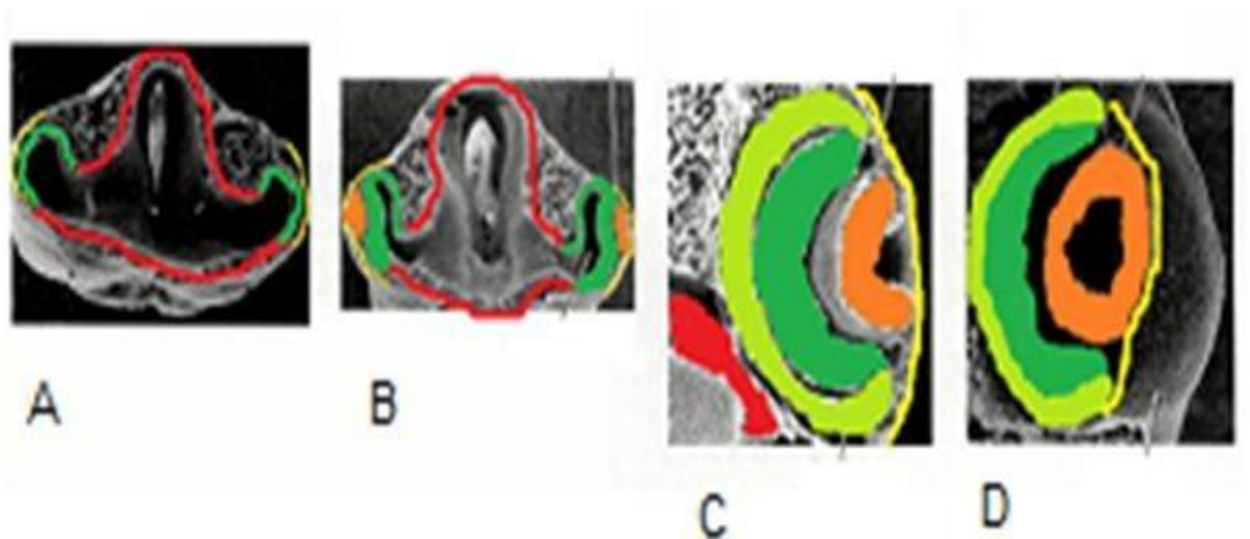


Figura 1. Desenvolvimento embrionário do olho de um animal vertebrado. (Adaptado de Gilbert, 2000). A: Embrião com 4 mm; a vesícula óptica evagina do Telencéfalo e contacta com a ectoderme sobrejacente, induzindo a formação do placoide da lente (B); B: embrião com 4,5 mm; a ectoderme diferencia-se em células da lente; C: a vesícula óptica dobra-se sobre si mesma dando origem à tacícula óptica bilaminar e o placoide da lente diferencia-se na vesícula da lente; as duas camadas celulares da tacícula óptica vão-se diferenciar para formar a retina pigmentar e a retina nervosa. D: a vesícula que forma a lente induz a formação da córnea partir da ectoderme sobrejacente.

Ao conjunto da retina nervosa e do NO denomina-se “oftalmencéfalo” pois representam uma expansão do encéfalo projetada para o interior da órbita. À semelhança do cérebro e do cerebelo, a retina neuronal se desenvolve e se transforma num tecido organizado formado por várias camadas de diferentes tipos de neurônios. Estas camadas incluem cones e bastonetes (fotorreceptores sensíveis à luz e às cores), corpos celulares de células ganglionares e interneurônios bipolares, que transmitem os impulsos elétricos gerados nos bastonetes e cones para as células ganglionares. Além destas, existem numerosas células de Müller

(células da glia), que mantêm a integridade da retina; células Amácrinas (neurônios com longos axônios) e células Horizontais que transmitem impulsos elétricos no plano horizontal da retina (WILCOCK, 2007).

ANATOMIA E HISTOLOGIA

Uma estrutura anatômica tão especializada e desenvolvida como é o globo ocular e sua principal camada, a retina, permite criar uma imagem mais ou menos detalhada do ambiente, conforme a espécie em questão, intensidade luminosa, cor e energia dos raios luminosos (SCHIMIDT-NIELSEN, 1998). Desta forma, a retina é considerada a verdadeira razão de ser do globo ocular. A córnea, cristalino, úvea e esclera são apenas estruturas coadjuvantes que permitem à retina cumprir o seu papel: converter fótons de luz visível em impulsos elétricos que são transmitidos ao córtex visual do cérebro (WILCOCK, 2007).

No que diz respeito à descrição anatômica da neuroretina, esta constitui a porção nervosa do globo ocular e está localizada em seu segmento posterior. Internamente, está em contato com o corpo vítreo e, externamente, o epitélio pigmentar da retina (camada mais externa) com a membrana de Bruch. Juntamente com o nervo óptico, é considerada uma extensão do Sistema Nervoso Central, sendo derivada do prosencéfalo embrionário (SLATTER, 2005). É constituída por duas porções: óptica ou “visual” (posterior) e “cega”, insensível à luz, constituída pela porção ciliar (média) e pela porção iridiana (anterior) da retina. A parte óptica da retina se estende desde o disco óptico até à *ora ciliaris retinae ou ora serrata* (figura 2) (WILCOCK, 2007).

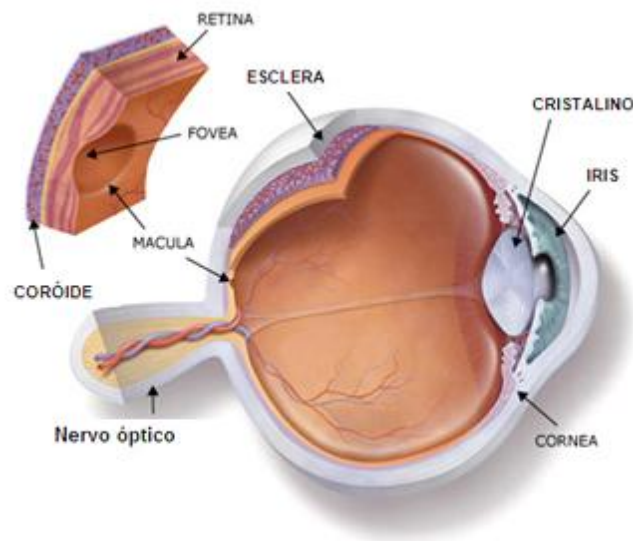


Figura 2. Desenho esquemático do globo ocular. Fonte: www.institutoderetina.com.br

Constantemente bombardeada por fótons, a retina não somente capta a luz e a transforma em sinal eletroquímico, mas também é responsável pelo primeiro processamento da informação luminosa, que contribui para a visualização de cores, contraste, movimento relativo e profundidade. Sem este processamento, a quantidade de estímulos gerados seria tão grande, tornando impossível obter a visão como a conhecemos (SUNG; CHUANG, 2010).

Com pequenas variações, a retina possui a mesma estrutura entre os vertebrados. Está organizada em camadas distintas, que são atravessadas pela luz, atingindo por último, a camada dos fotorreceptores, os cones e bastonetes. A disposição aparentemente contra-intuitiva é explicada pelo fato de que os fotorreceptores estão intimamente relacionados com uma camada monocelular denominada EPR, Epitélio Pigmentar da Retina (SUNG; CHUANG, 2010; STRAUSS, 2005).

Histologicamente, a retina encontra-se constituída por três unidades sensoriais de neurônios (I, II e III) que constituem, da região mais interna para mais externa, a camada de células ganglionares, camada nuclear interna e a camada nuclear externa. Separando estas camadas celulares existe uma matriz sem corpos celulares composta por um entrelaçado de dendritos e axônios dos neurônios onde ocorrem as sinapses. Estas camadas intermediárias são denominadas de plexiforme interna e plexiforme externa. No total, a nível histológico, a retina apresenta 10 camadas celulares que se estendem desde o epitélio pigmentado da retina (EPR)

(camada mais afastada do vítreo) até a membrana limitante interna (interface com a membrana hialoideia posterior do vítreo (SLATTER, 2008), conforme tabela 1 e figura 3.

Tabela 1. Camadas celulares da retina (adaptado de SLATTER, 2008)

1	Epitélio Pigmentado da Retina (<i>Stratum pigmentosum</i>)	Neurônio I Camada Nuclear Externa	Retina não sensorial
2	Camada de Fotorreceptores (<i>Stratum neuroepitheliale</i>)		Retina Sensorial ou Neurorretina
3	Membrana Limitante Externa (<i>Stratum limitans externum</i>)		
4	Camada Nuclear Externa (<i>Stratum nucleare externum</i>)		
5	Camada Plexiforme Externa (<i>Stratum plexiforme externum</i>)		
6	Camada Nuclear Interna (<i>Stratum nucleare internum</i>)	Neurônio II	
7	Camada Plexiforme Interna (<i>Stratum plexiforme internum</i>)	Camada Nuclear Interna	
8	Camada de Células Ganglionares (<i>Stratum ganglionicum</i>)	Neurônio III	
9	Camada de Fibras do Nervo Óptico (<i>Stratum neurofibrarum</i>)	Camada de Células Ganglionares	
10	Membrana Limitante Interna (<i>Stratum limitans internum</i>)		

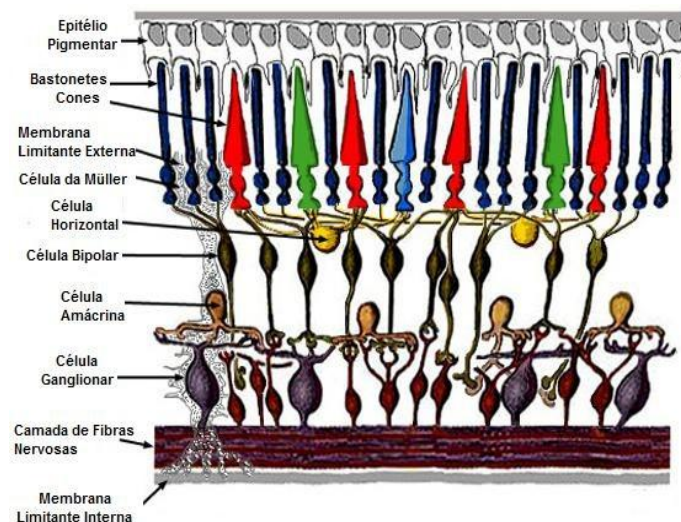


Figura 3. Diagrama da organização celular da retina. (adaptado de KOLB, FERNANDEZ; NELSON, 2003).

Epitélio Pigmentar da Retina (EPR)

O Epitélio Pigmentar da Retina consiste numa monocamada epitelial de células poligonais, não sensoriais, que forma a camada mais externa da retina e assenta sobre a Membrana de Bruch ou membrana basilar da coróide. É pigmentada na porção não tapetal do fundo ocular, conferindo uma cor castanha homogênea a esta porção da retina (SLATTER, 2008). Tem origem na camada exterior da vesícula óptica e não apresenta um papel ativo nos mecanismos de fototransdução (WILCOCK, 2007). No entanto, sua função normal é essencial à integridade e funcionamento da retina (SLATTER, 2008).

As células do EPR envolvem o segmento externo dos fotorreceptores e delas depende a nutrição dos cones e bastonetes, bem como a fagocitose dos segmentos externos dessas células que sofrem um acelerado desgaste durante os processos de absorção de luz e fototransdução. Estas células desempenham igualmente um papel importante no metabolismo dos derivados da vitamina A e na manutenção da função dos fotorreceptores. São as responsáveis pela reciclagem do *trans*-retinal para nova síntese de pigmento visual, bem como pela reciclagem de outras moléculas necessárias à contínua regeneração dos segmentos externos dos fotorreceptores (WOLF, 2004; EKESTEN, 2009).

As células do EPR, juntamente com a Membrana de Bruch, formam uma barreira que separa os vasos sanguíneos da coróide, porção posterior da malha vascular do olho, do tecido retiniano. Por isso, o EPR tem como função fazer o transporte de água, íons, nutrientes e metabólitos da retina aos vasos sanguíneos e vice-versa, contribuindo para a manutenção da homeostase. O EPR também é capaz de compensar mudanças bruscas na concentração iônica do espaço subretiniano, principalmente de íons de potássio (STRAUSS, 2005).

O EPR participa ativamente nos processos de angiogênese, por meio da secreção de fatores de crescimento, que estão envolvidos desde a formação da retina até sua homeostase, no indivíduo adulto. Dois fatores se destacam por sua importância clínica, o Fator Derivado do Epitélio Pigmentar (PEDF) e o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). Na retina saudável, o PEDF é secretado em grande quantidade pelo EPR, o qual tem como funções atuar como neuroprotetor e inibidor da neovascularização. O VEGF por sua vez, é secretado em pequenas

quantidades e é responsável pela preservação do endotélio vascular dos capilares da coróide e também atua como um agente permeabilizante das fenestras do endotélio. Estes dois fatores atuam em conjunto, de maneira inversamente proporcional, para a manutenção dos vasos sanguíneos da coróide e retina. Qualquer alteração na relação entre eles, por exemplo, diminuição do PEDF, pode induzir a neovascularizações e perda da homeostase retiniana (STRAUSS, 2005).

Fotorreceptores

Na camada de fotorreceptores diferentes tipos de células caracterizadas pela sua forma, distribuição espacial, características bioquímicas e capacidade de absorção de luz de diferentes comprimentos de onda. Estes tipos celulares agrupam-se em dois tipos de fotorreceptores, os cones e os bastonetes (SLATTER, 2008). É a partir dos fotorreceptores que o processo visual se inicia. Após a estimulação destas células, são gerados sinais elétricos que, por sua vez, são transmitidos a outros neurônios (células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares) que têm a função de modular, associar e retransmitir a informação, por meio do nervo óptico até o encéfalo (SUNG; CHUANG, 2010). Na retina, os fotorreceptores estabelecem sinapses com as células bipolares e horizontais, e as primeiras, por sua vez, com as células ganglionares, cujos axônios formam o nervo óptico. A forma como essa sinapse é efetuada varia conforme nos referimos aos cones ou aos bastonetes (DOWLING, 1970).

Os cones e bastonetes, estando intimamente relacionados com o EPR e dispostos perpendicularmente à superfície da retina. Os fotorreceptores são células ciliares modificadas, sensíveis à luz. Os cones são responsáveis pela visão sob iluminação intensa e mediam a captação de espectros específicos da luz, fazendo parte fundamental da percepção das cores. São assim denominados pelo fato de seus segmentos externos possuírem formato cônico. Além destas características, os cones são responsáveis pela visão em detalhes observada em primatas e algumas aves (SLATTER, 2005). Em seres humanos existe uma grande concentração de cones em uma região específica da retina, chamada fóvea, a qual possui grande acuidade visual comparada a outras áreas da retina (SUNG; CHUANG, 2010).

Os cones possuem uma menor sensibilidade à luz, necessitando de níveis

luminosos mais altos para serem excitados, e por isso, sendo responsáveis pela visão diurna ou fotópica. Dividem-se, nos primatas, em 3 tipos celulares diferentes: cones S (*short wavelength sensitive*), com sensibilidade a comprimento de onda curtos, com picos de absorção máximo em 420 nm (próximo a cor azul); cones M (*midlle wavelength sensitive*), com sensibilidade a comprimentos de onda médios e pico de absorção em torno de 530 nm (verdes) e cones L (*long wavelength sensitive*), com sensibilidade a comprimentos de onda longos e picos de absorbância de 560nm (vermelho) (figura 4) (MARC; SPERLING, 1977; GOURAS, 1986; JOSELEVITCH, 2008).

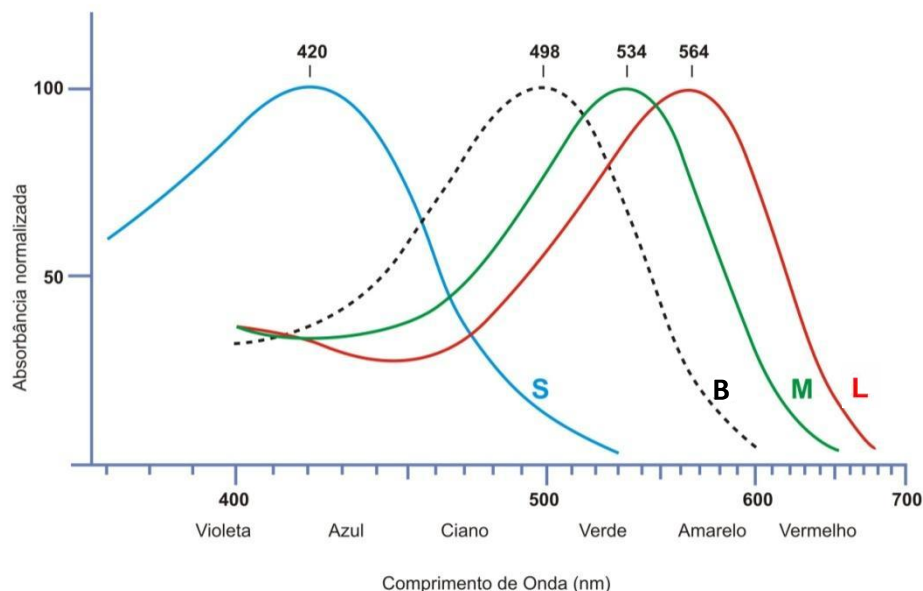


Figura 4. Curva de Sensibilidade Espectral de Cones e Bastonetes. **S:** *short wavelength sensitive*. **B:** bastonetes. **M:** *midlle wavelength sensitive*. **L:** *long wavelength sensitive*. (Adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cone-response.png>).

A existência de 3 tipos de cones não é universal no reino animal. A maioria dos mamíferos possuem dois tipos de cones (dicromatas), havendo, no entanto, alguns peixes que possuem 5 tipos diferentes de fotopigmentos (BOWMAKER et al., 1991; HISATOMI et al., 1997a, 1997b). A sensibilidade espectral está diretamente correlacionada com o fotopigmento presente no segmento externo do fotorreceptor. Trata-se da rodopsina nos bastonetes e das opsinas dos cones. Existe ainda, o pigmento de comprimento de onda intermédio médio-curto, que tem um espectro de

absorção de 452 nm e encontra-se distribuído em células com forma de bastonete (HISATOMI et al., 1998). Os vários fotopigmentos têm uma origem comum, derivam de uma molécula ancestral que originou dois grupos de pigmentos, um de curto e outro de longo comprimento de onda e estes posteriormente originaram as moléculas existentes ao longo da filogenia (TOKUNAGA et al., 1999).

Os bastonetes constituem a maior parte dos fotorreceptores da retina, com alta sensibilidade à luz, fazendo parte da visão em situações de baixa luminosidade e associados à percepção de movimentos. São células com uma sensibilidade espectral maior para a luz azul-verde, com um pico de sensibilidade localizada nos 500 nm de comprimento de onda de luz. Estas células também possuem um alto poder de amplificação, já que são ativadas por intensidades luminosas muito baixas, podendo ser excitadas por apenas um fóton. A presença de um só tipo de bastonetes não é universal. Há répteis com dois tipos de bastonetes sensíveis respectivamente ao azul e ao verde (LIEBMAN; ENTIRE, 1968).

Os bastonetes localizam-se preferencialmente na retina periférica, ligando-se às células bipolares através de um sistema que converge nas células ganglionares. Por este motivo, o sistema dos bastonetes possui baixa acuidade visual para a detecção de formas e discriminação de detalhes, além de possuir baixa resolução temporal, ou seja, possui menor resolução das alterações rápidas da imagem visual (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000).

Anatomicamente, os fotorreceptores dividem-se em porções subcelulares: o segmento externo, o segmento interno, o corpo, pedículo celular e processos sinápticos. O segmento externo é constituído por um conjunto de discos derivados da membrana celular impregnados de fotopigmentos responsáveis pela fototransdução (COHEN, 1972). Os segmentos externos dos fotorreceptores estão preenchidos com discos de membrana nos quais contém pigmentos visuais. Estes pigmentos são constituídos de um cromóforo derivado da vitamina A e de uma apoproteína denominada Opsina (YAU; HARDIE, 2009). Segundo Terakita (2005), existem mais de 1000 opsinas no reino animal, todas originadas de um ancestral comum a vertebrados e invertebrados.

Há diferenças entre a estrutura dos discos membranares dos bastonetes e

dos cones (figura 5).

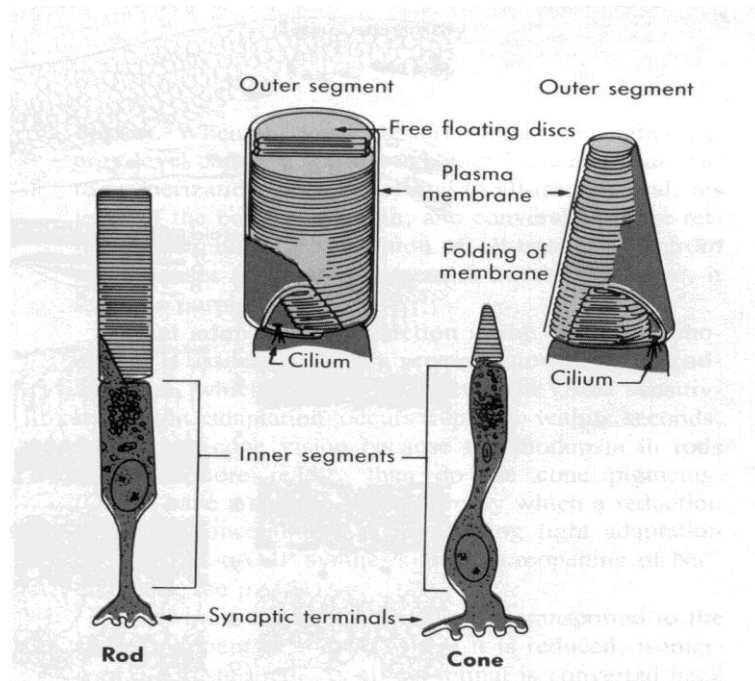


Figura 5. Constituição e diferenças entre a estrutura do cone e do bastonete. (Adaptado de BERNE; LEVI. Physiology, 2000)

Nos bastonetes, os discos membranares estão rodeados por uma membrana celular contínua que se interrompe na base. O perímetro dos bastonetes é interrompido por uma ou mais incisuras que penetram em direção ao centro do disco membranar. As camadas membranares estão unidas na sua porção lateral por uma estrutura designada por anel membranar, existindo elementos fibrosos externos que unem os anéis membranares à membrana celular adjacente (USUKURA; YAMADA, 1981; ROOF; HENSER, 1982; FETTER; CORLESS, 1987).

As membranas dos discos intercalares encontram-se impregnadas de fotopigmento, iniciando-se aí o processo de fototransdução. Os fotopigmentos são proteínas estruturais e constituem mais de 50% das proteínas estruturais destas membranas celulares (PAPEMASTER; DREYER, 1974).

O segmento interno separa-se do externo por um estrangulamento. Imediatamente abaixo e numa posição excêntrica, situa-se o corpo basal do qual se origina o pedículo ciliar, composto por 9 pares de microtúbulos. Este continua-se

excentricamente no segmento externo. Mais internamente, o segmento interno possui uma acumulação basal de organelas celulares, com grande abundância em mitocôndrias (COHEN, 1992).

O segmento interno continua-se com o corpo celular (que aloja o núcleo celular) e a terminação sináptica. O primeiro situa-se na camada nuclear externa da retina, enquanto o segundo é constituinte da camada plexiforme externa. A terminação sináptica é especializada na sua forma conforme consideramos os cones ou os bastonetes (DOWLING, 1966; KOLB, 1970). Nos cones a terminação sináptica designa-se por pedículo, grande, cônico, com uma porção terminal achatada de 8-10 μm , dispendo-se paralelamente na camada plexiforme externa. Em contraste, nos bastonetes, designam-se por esférulas e são pequenas porções alargadas da terminação dos axônios com cerca de 5 μm de diâmetro. As esférulas encontram-se agrupadas entre e acima dos pedículos dos bastonetes (AHNELT et al., 1990). Em ambos, as terminações estão preenchidas com pequenas vesículas sinápticas.

Membrana Limitante Externa (MLE)

A membrana limitante externa é uma região formada pelas membranas celulares dos cones, bastonetes e células de Müller. As células de Müller são células da glia que se estendem por toda a largura da retina, desde a membrana limitante externa até a membrana limitante interna (SLATTER, 2008; EKESTEN, 2009). Estas células provêm suporte nutricional e regulatório para os neurônios e, juntamente com os astrócitos, convertem substratos, incluindo lactato e aminoácidos, da circulação para os neurônios, regulam as propriedades da barreira hemato-retiniana (GARDNER et al., 1997) além da função sináptica (NEWMAN, 2003). As células de Müller também armazenam glicogênio para conversão em lactato, sintetizam ácido retinóico do retinol, regulam a concentração de íons extracelular para modular a polarização/despolarização da membrana plasmática, participam com os neurônios no ciclo glutamato-glutamina para controlar a neurotransmissão, e protegem os neurônios da excitotoxicidade do glutamato (LIETH et al., 2001).

Camada Nuclear Externa (CNE)

Esta camada é formada pelos núcleos dos fotorreceptores (cones e bastonetes), por fibras de conexão entre os fotorreceptores e por processos das células de Müller (SLATTER, 2008).

Camada Plexiforme Externa (CPE)

A camada plexiforme externa é composta pelas terminações axônicas dos fotorreceptores (que são envolvidas pelo citoplasma das células de Müller), por células horizontais, bipolares e sinapses dendríticas. Na superfície interna da camada plexiforme externa, as porções terminais dos axônios dos fotorreceptores dilatam-se para constituir os pedículos, nos cones, e as esférulas nos bastonetes. Em seguida, estas estruturas formam sinapses com as células bipolares (SLATTER, 2008).

Camada Nuclear Interna (CNI)

Nesta camada encontram-se os núcleos de células horizontais, bipolares, amácrinas, bem como das células de Müller. Os corpos das células horizontais estão localizados na região mais externa da CNI, enquanto que os corpos das células amácrinas estão na região mais interna desta camada, já os núcleos das células bipolares localizam-se numa região mais central da CNI. As células bipolares são classificadas em dois tipos: células bipolares do tipo ON e tipo OFF, onde cones são capazes de se comunicar com ambos os tipos (ON e OFF) e bastonetes apenas com células bipolares do tipo OFF (KOLB, 2003).

Camada Plexiforme Interna (CPI)

Esta camada é composta pelos prolongamentos de células bipolares, amácrinas e dendritos das células ganglionares. Os prolongamentos das células bipolares que fazem sinapse com células fotorreceptoras do tipo cone encontram-se na região mais externa desta camada, enquanto que os prolongamentos das células

bipolares que fazem contato com células fotorreceptoras do tipo bastonetes localizam-se na região mais interna. Nesta camada ocorrem sinapses no sentido vertical (entre as células bipolares e ganglionares) e lateral (entre as células horizontais e amácrinas e entre as células horizontais e ganglionares) (FARAH, 2006; SLATTER, 2008).

Células Ganglionares (CG)

A camada de células ganglionares é formada pelos corpos celulares das células ganglionares, corpos celulares de células amácrinas deslocadas e também, dendritos que formam sinapses com os axônios das células bipolares da camada plexiforme interna precedente. Para cada CG convergem várias células bipolares que, por sua vez, formam sinapses com vários fotorreceptores (SLATTER, 2008). Existem uma grande variedade de células ganglionares indetificadas devido às diferentes formas e ao tipo de resposta produzida. As células ON e OFF são encontradas na retina de todos vertebrados e, na retina dos primatas, encontram-se duas classes de celulares ganglionares: as do tipo P (do latim *parvo* = pequeno) e as do tipo M (do latim *magno* = grande). As células do tipo M possuem um maior campo receptivo e respostas mais rápidas e transitórias que as células do tipo P. Além disso as células ganglionares do tipo M, normalmente, conduzem informações de movimento, localização e percepção de profundidade. Já as células ganglionares do tipo P conduzem informações sobre cor, forma e textura dos objetos (KANDEL et al., 2014).

Fibras do Nervo Óptico (NO)

Os axônios das CG formam conjuntos de fibras nervosas que constituem a camada de fibras do nervo óptico, segundo par de nervos cranianos. Estas fibras atravessam paralelamente à superfície retiniana do disco óptico e saem agrupadas no polo posterior do globo ocular através da lâmina crivosa, onde são mielinizadas para formar o NO (SLATTER, 2008).

Membrana Limitante Interna (MLI)

É a camada mais interna da retina e a separa do corpo vítreo. É uma membrana basal onde se ligam as extremidades das células de Müller (SLATTER, 2008) e há contato com o humor vítreo (WILCOCK, 2007). É vascularizada e os vasos sanguíneos penetram no globo ocular juntamente com o NO. Estes vasos são responsáveis pela nutrição desta porção da retina, contrariamente ao observado na camada nuclear externa, onde fotorreceptores e EPR estão totalmente dependentes da difusão de nutrientes da coróide para assegurar o seu metabolismo. Consequentemente, quando há separação da camada mais interna da retina do EPR, tal como ocorre numa situação de descolamento da retina, verifica-se isquemia e degeneração dos fotorreceptores e, eventualmente, da camada nuclear externa (WILCOCK, 2007).

3.2. ELETROFISIOLOGIA OCULAR

Fotopigmentos

A luz visível é definida como a porção de radiação do espectro eletromagnético que pode ser absorvida pelos pigmentos das células fotorreceptoras da retina. Esta radiação corresponde aos comprimentos de onda entre os 400 e os 750 nm (BRIGELL et al., 2003). Assim, definimos a principal função dos pigmentos visuais como a absorção de fótons dentro do espectro de luz visível e a sua sensibilidade é medida pelo comprimento de onda máximo por eles absorvido (TOKUNAGA et al., 2002). Ou seja, depois de iluminado, a resposta elétrica de cada fotorreceptor é máxima para uma radiação de determinado comprimento de onda. Caso o comprimento de onda da radiação incidente for superior ou inferior ao espectro de sensibilidade de determinado fotopigmento a sua atividade elétrica será menor (ECKERT et al., 1998).

Os pigmentos visuais são constituídos por uma proteína G (Opsina) ligada covalentemente a um grupo cromóforo: 11 – *cis* –retinal ou 3 – dihidroretinal. O Retinal é o aldeído da vitamina A1 ou Retinol. O 3-dihidroretinal é o aldeído da

Vitamina A2 ou 3 – dihidroretinol (SLATTER, 2008).

Os principais pigmentos são: Rodopsina, Iodopsina e Cianopsina. Cada um resulta da combinação das opsinas dos cones e bastonetes com os carotenóides retinal 1 (11-*cis*-retinal) e retinal 2 (3-dihidroretinal). O retinal 1 e a escotopsina formam o pigmento visual Rodopsina (encontrada nos bastonetes). O retinal 1 e a opsina dos cones formam os pigmentos visuais da Iodopsina e Cianopsina (SLATTER, 2008).

Dentre os diversos tipos de pigmentos visuais nos vertebrados, a rodopsina é a mais estudada. Esta proteína está localizada nos discos de membrana e na membrana plasmática dos segmentos externos dos bastonetes. É uma molécula de 41 Kilodaltons (Kd), tem uma sensibilidade máxima para a luz de comprimento de onda entre os 506 e os 510 nm (verde) (MILLER, 1995) e possui uma conformação específica, na qual sua porção N-terminal está sempre voltada para o interior dos discos ou para a matriz extracelular. Sua região C-terminal contém diversos aminoácidos, os quais podem ser fosforilados. Acredita-se que estes aminoácidos servem para regular a sensibilidade da rodopsina à luz. A porção da molécula que atravessa a membrana é composta por sete α -hélices compostas de aminoácidos hidrofóbicos. Entre as α -hélices está inserido o cromóforo derivado da vitamina A, denominado 11-*cis* retinal. Este aldeído está ligado à proteína no aminoácido lisina n. 296 por meio de uma base de Schiff protonada (WHIKEHART, 1994; TERAOKA, 2005).

Fototransdução

Os mecanismos relacionados com a transdução do sinal luminoso ao longo da membrana citoplasmática normalmente são descritos nos bastonetes devido ao grande conhecimento do processo neste fotorreceptor, o conhecimento da estrutura da rodopsina e com a identificação de grande homologia entre este e o desenvolvido nos cones (TOKUNAGA et al., 1999).

Na maior parte dos neurônios em repouso há a geração de um potencial de membrana hiperpolarizador e consequente inibição da liberação de neurotransmissor na fenda sináptica. Os bastonetes tem um mecanismo diferente de transmissão do sinal nervoso na sinapse. Na verdade, o fotorreceptor é uma célula

que está constantemente despolarizada, ou melhor, que é constantemente atravessada por uma corrente elétrica positiva, resultante da abertura constante dos canais de sódio (Na^+) no segmento externo, da existência de uma bomba de Na^+ no segmento interno e da existência de uma bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ no segmento externo do fotorreceptor. Todas estas estruturas estão situadas ao nível da membrana celular. A célula está constantemente despolarizada com um potencial de membrana que se aproxima de -40mV . Na membrana celular do segmento interno, os canais de K^+ voltagem dependentes permitem a saída de K^+ com consequente contribuição para o estabelecimento da corrente de cargas positivas intracelulares. A bomba de Na^+ funciona, excretando o Na^+ do interior da célula (COPENHAGEN; JAHR, 1989).

Quando fótons atingem a molécula de rodopsina, ocorre a isomerização do 11-*cis* retinal para all-*trans* retinal, criando uma molécula energeticamente instável, ou ativada, que rapidamente muda sua conformação, passando por estágios intermediários (Bartorrodopsina, Lumirrodopsina, Metarrodopsina I e II). Em seguida, a molécula ativada se liga a uma proteína G trimérica denominada transducina pela catalisação da troca de Guanosina Difosfato (GDP) por Guanosina Trifosfato (GTP). A subunidade alfa dissociada da transducina ativa a Guanosina Monofosfato cíclico-Fosfodiesterase (GMPc-Fosfodiesterase), a qual rapidamente hidrolisa a Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) citoplasmática. Consequentemente, a GMPc se dissocia da membrana plasmática e dos canais de sódio, fechando-os (Figura 6) (WHIKEHART, 1994; MOLDAY, 1998; LAMB; PUGH JUNIOR, 2004). Este fechamento dos canais de sódio promove modificação da condutância (permeabilidade ao Na^+ e ao Ca^{++}). Alterações na condutância produzem variações no potencial de membrana da célula receptora e dela depende a codificação de informação sensorial que vai ser transmitido ao SNC (ECKERT et al., 1998).

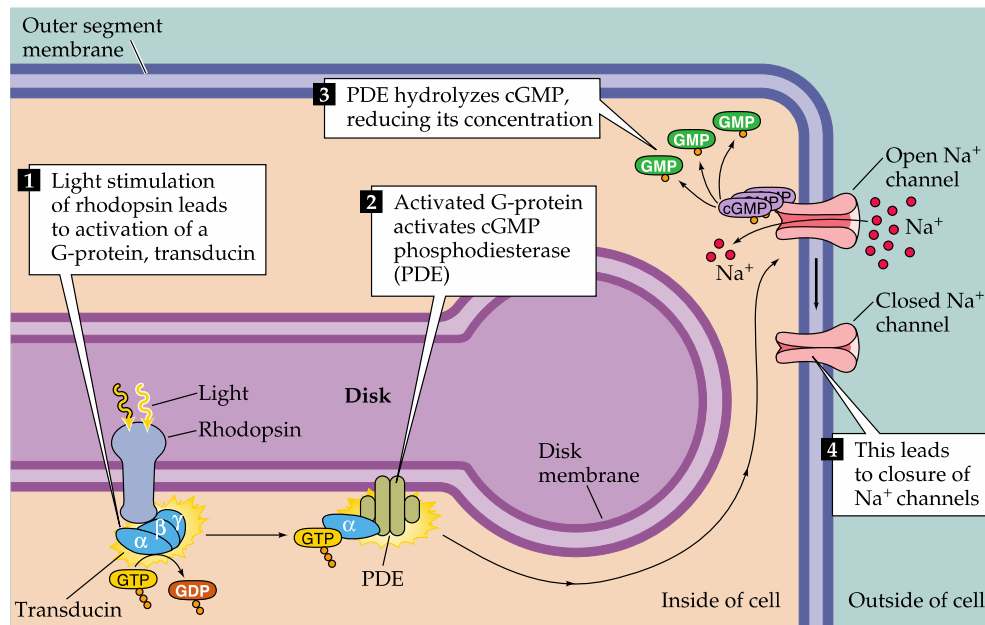


Figura 6. Esquema da cascata da fototransdução no segmento externo do fotorreceptor (PURVES et al., 2001)

Os canais de sódio também são permeáveis a íons de cálcio, de maneira que, quando ocorre seu fechamento, há uma diminuição da concentração de cálcio citoplasmático, estimulando a produção de guanilil ciclase, uma enzima que catalisa a produção de GMPc, levando a célula ao estado que se encontrava antes do estímulo luminoso. A ativação da guanilil ciclase é mediada por uma proteína denominada recoverina, que é sensível aos baixos níveis de cálcio no citoplasma. Este mecanismo faz com que a célula se recupere rapidamente para ser estimulada novamente e também, acredita-se que funciona como um regulador da sensibilidade do fotorreceptor a diferentes intensidades de luz (ALBERTS, 1997). Durante este processo de recuperação, a rodopsina ativada é rapidamente dessensibilizada pela fosforilação e ligação à arrestina (SUNG; CHUANG, 2010). Após a ligação da rodopsina ativada à molécula de arrestina, ocorre a liberação do *all-trans* retinal, o qual é re-isomerizado em *11-cis* retinal para compor novamente a molécula de rodopsina. A este processo dá-se o nome de ciclo visual. Apesar de largamente estudado e ter a maioria de seus componentes identificados e caracterizados, a biologia celular deste mecanismo tão complexo ainda permanece desconhecida (SUNG; CHUANG, 2010). Atualmente, sabe-se que o *all-trans* retinal sofre uma série

de reações de oxidação e redução pela ação de enzimas denominadas retinol desidrogenases para chegar a ser re-isomerizado.

Além destas enzimas, outro grupo de proteínas, denominadas chaperonas, são extremamente importantes no processo, de modo que, dentre outras funções, exercem o papel de transporte do cromóforo entre o segmento externo do fotorreceptor e o epitélio pigmentar da retina (STRAUSS, 2005). A Proteína Específica do Epitélio Pigmentar da Retina de 65KDa (RPE 65), é uma destas chaperonas que atuam diretamente no processo de re-isomerização. Algumas doenças retinianas congênitas estão associadas com mutações desta proteína, indicando que ela é crucial para a regeneração do pigmento visual (CAI et al., 2009).

Durante o processo de fototransdução, ocorre a descamação constante de discos de membrana na extremidade dos segmentos externos dos fotorreceptores. Estes discos são ativamente fagocitados pelo EPR e, novos, surgem na base do segmento externo. Esta característica do EPR é essencial para o funcionamento dos fotorreceptores pois, durante o processo de fototransdução, são liberadas substâncias tóxicas como radicais livres, lipídios e proteínas danificadas pela luz, que, se não forem removidas do meio extracelular, levam à perda da homeostase da retina e morte de fotorreceptores (SUNG; CHUANG, 2010). Além destas substâncias, também são fagocitadas moléculas de retinal, que entram no ciclo visual, bem como os ácidos graxos, essenciais para a constituição dos discos de membrana, são fagocitados, processados e reapresentados aos fotorreceptores para a formação de novos discos (STRAUSS, 2005).

Transmissão dos Sinais Elétricos

Os fotorreceptores respondem com variações de potencial graduado, sofrendo hiperpolarização (com inibição da liberação do neurotransmissor glutamato) com a presença de luz e despolarização (estimulação da liberação de glutamato) na ausência do estímulo luminoso (LAMB; PUGH JR, 2006; PUGH JR; LAMB, 2000).

As alterações de potencial nos fotorreceptores geram modificação do potencial nas células bipolares, às quais são classificadas de acordo com as

respostas ao neurotransmissor liberado. Deste modo, as células bipolares podem ser do Tipo ON, às quais hiperpolarizam na presença de glutamato e despolarizam na sua ausência, e do Tipo OFF, que possuem um efeito contrário (BERNTSON; TAYLOR, 2000; MASSEY; MILLER, 1988; SLAUGHTER; MILLER, 1983).

A função das células bipolares está diretamente relacionada ao conceito de campo receptivo, que corresponde à área da retina que quando estimulada, gera alterações no potencial de membrana da célula. O campo receptivo de uma célula bipolar é dividido em duas regiões: o centro do campo receptivo, que recebe aferências diretas dos fotorreceptores com os quais as células bipolares fazem sinapse, e a periferia do campo receptivo, que recebe informações dos fotorreceptores adjacentes através de sinapses com as células horizontais, interneurônios responsáveis pela transmissão lateral dos potenciais gerados nos fotorreceptores. (BOYCOTT; WÄSSLE, 1974; SANES; ZIPURSKY, 2010)

As células bipolares possuem então, uma relação de oponência entre o centro e a periferia de seus campos receptivos. As células bipolares ON, possuem o centro do campo receptivo do tipo ON (ativados com a presença de luz) e a periferia do tipo OFF (desativados com a presença de luz), enquanto as células bipolares OFF possuem centro OFF e periferia ON (BERNTSON; TAYLOR, 2000; MASSEY; MILLER, 1988;).

Portanto, com a chegada da luz à retina, os fotorreceptores que formam o centro do campo receptivo irão se hiperpolarizar, reduzindo a liberação de glutamato na fenda sináptica, o que por sua vez causará uma despolarização das células bipolares ON. Ao mesmo tempo as células horizontais ligadas aos fotorreceptores da periferia, área não-iluminada do campo receptivo, sofrem despolarização, provocando a hiperpolarização das células bipolares OFF (figura 7) (BERNTSON; TAYLOR, 2000).

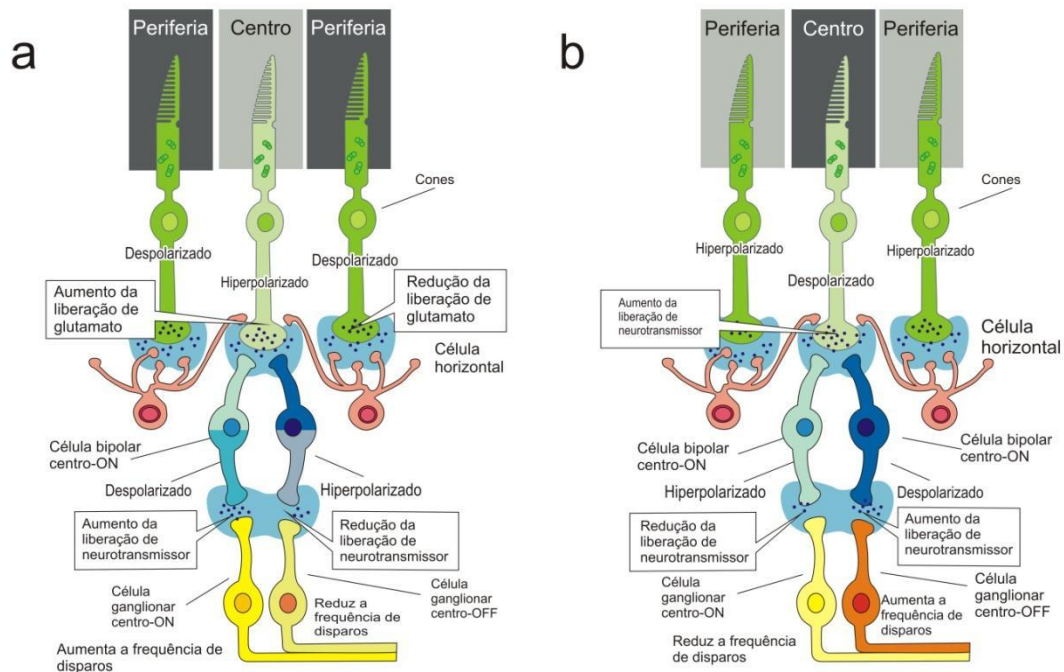


Figura 7. Representação esquemática da ativação das células bipolares on e off. (a): Ativação de uma célula bipolar centro on e periferia off. (b): ativação de uma célula bipolar centro off e periferia on (Adaptado de <http://dstrong.blog.uvm.edu/neuroblog/center-surround.jpg>).

Desta forma, sinais das células bipolares serão transmitidos às células ganglionares, diretamente ou através de conexões com as células amácrinas, interneurônios envolvidos em inúmeras subcircuitarias na retina interna. Existem 29 tipos de células amácrinas, cuja função de apenas algumas é conhecida. O tipo mais abundante é a célula amácrina AII, que tem como função transmitir o sinal proveniente das células bipolares de bastonetes para a retina interna através de junções comunicantes com as células bipolares ON de cones, e através de sinapses com inversão de sinal com as células bipolares OFF de cones, participando da formação e controle das respostas de células ganglionares (JOSELEVITCH, 2008; MASLAND, 2001).

As células amácrinas do tipo Starburst, são as segundas mais numerosas, apresentando um papel importante tanto na retina em desenvolvimento quanto na

retina adulta. Através de sinapses colinérgicas e gabaérgicas estas células garantem a geração e a propagação de ondas dentro da retina em desenvolvimento, às quais são fundamentais para a formação e estabilização das sinapses ao nível das células ganglionares. Já na retina adulta, estas células são responsáveis por mediar a direção seletiva dos impulsos nervosos dentro das células ganglionares, às quais são inibidas de uma maneira altamente seletiva (JOSELEVITCH, 2008; MASLAND, 2001).

Outro tipo de células amácrinas são as dopaminérgicas, que ajustam a responsividade da retina à estímulos com brilhos de maior ou menor intensidades (MASLAND, 2001)

Quando os sinais das células bipolares finalmente chegam às células ganglionares, que possuem a mesma organização centro-periferia que as bipolares às quais estão ligadas, será gerado um potencial de ação nestas células, cujos axônios irão se agrupar formando o nervo ótico e convergir para o disco óptico. O nervo ótico conduzirá este potencial para os centros superiores de processamento visual. Desta forma, a captação, condução e processamento inicial da informação visual dependem da integridade dos neurônios e interneurônios localizados na retina, assim como das conexões que são estabelecidas entre eles (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; De MONASTERIO; GOURAS; TOLHURST, 1975; LENT, 2010).

Eletrorretinograma de Campo Total

A integridade e funcionamento das células retinianas pode ser avaliada através de uma grande variedade de recursos, sendo o Eletrorretinograma (ERG) de Campo Total, considerado por Weleber (1981) como uma maneira efetiva de gerar resposta das células da retina.

O Eletrorretinograma de Campo Total consiste no registro da atividade elétrica celular da retina em resposta a flashes luminosos, sendo um teste eletrofisiológico amplamente utilizado para avaliar a função retiniana, através da

estimulação simultânea de todo o campo visual (BIRCH; ANDERSON, 1992; MARMOR et al., 2009).

O equipamento responsável por gerar tais estímulos é chamado Ganzfeld, que, em alemão, significa “Campo Total”. Trata-se de um estimulador formado por uma cúpula com diodos emissores de luz (LEDS - Light-emitting diodes) integrados em seu interior. Tais LEDS emitem flashes de diferentes intensidades luminosas e fornecem iluminação de fundo difusa, permitindo a estimulação de todo o campo visual de uma maneira uniforme (HOLDER et al., 2010; MARMOR et al., 2009).

Os potenciais elétricos gerados na retina são captados através de diferentes tipos de eletrodos, os quais poderão ser posicionados na córnea, como os eletrodos em forma de lente de contato dos tipos Burian - Allen ou ERG – Jet; na conjuntiva, como as fibras condutoras do tipo Dawson, Trick and Litzkow (DTL) ou eletrodos em forma de folhas de ouro; ou na superfície cutânea, como os eletrodos de superfície (HOLDER et al., 2010; MARMOR et al., 2009).

Os eletrodos de córnea fornecem sinais com maiores amplitudes e registros mais estáveis, com menor interferência de ruído elétrico. Contudo, promove um desconforto maior ao paciente, havendo o risco de provocar lesões na córnea. Já o eletródio do tipo DTL é mais bem aceito pela maioria dos pacientes, pois, por consistir em um fino fio de nylon posicionado ao longo da pálpebra inferior ou no saco conjuntival, é menos invasivo, pois não entra em contato direto com a córnea, conferindo maior conforto ao paciente (BEREZOVSKY et al., 2008; DAWSON; TRICK; LITZKOW, 1979; MARMOR et al., 2009; YIN; PARDUE, 2004).

A Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica (ISCEV) publicou um conjunto de recomendações para o uso do ERG com objetivo de padronizar os parâmetros utilizados para a emissão dos estímulos, para a preparação prévia, em relação às condições do ambiente de estimulação, como também a interpretação dos resultados, evitando uma possível variação entre valores mensurados nos diferentes laboratórios e diferentes equipamentos (MARMOR et al., 2009).

Desta forma, estabeleceu-se um protocolo padrão, composto por cinco tipos de estímulos e também as intensidades dos *flashes* utilizados, sendo esta última medida, descrita em candelas vezes segundo por metro quadrado (cd.s/m^2), unidade

de medida de intensidade luminosa.

Para a obtenção de respostas isoladas dos diferentes tipos celulares da retina, é necessária uma adaptação prévia (ao claro ou ao escuro), permitindo uma melhor interpretação dos resultados obtidos. A adaptação ao escuro (escotópica) permite avaliar isoladamente as respostas dos bastonetes ou obter respostas de forma mista (cones e bastonetes). Enquanto, que a adaptação ao claro (fotópica) permite avaliar isoladamente as respostas dos cones (HOLDER et al., 2010).

Para a realização do ERG na forma escotópica, é recomendado utilizar estímulos com intensidade de $0,01 \text{ cd.s/m}^2$ (para respostas isoladas de bastonetes) e $3,0 \text{ cd.s/m}^2$ (para obtenção de respostas mistas de cones e bastonetes). Esta forma de ERG também permite avaliar potenciais oscilatórios que são respostas rápidas do ERG. Também pode ser utilizados estímulos escotópicos adicionais, de intensidades mais altas (10 ou 30 cd.s/m^2), com o propósito de gerar ondas a de maior amplitude, facilitando o diagnóstico de determinadas patologias da retina (WACHTMEISTER, 1998; MARMOR et al., 2009; HOLDER et al., 2010).

A ISCEV, em condições fotópicas, recomenda o uso de *flashes* com intensidade de $3,0 \text{ cd.s/m}^2$, resultando em uma resposta isolada dos cones e de um estímulo, onde são disparados 30 *flashes* por segundo (30 Hz), denominado de *Flicker*. Os estímulos, em condições fotópicas, são produzidos com uma iluminação ambiente de 30 cd.s/m^2 , ou seja, em ambiente iluminado (MARMOR et al., 2009).

As respostas geradas (potenciais elétricos) pelas células da retina aos estímulos luminosos no ERG são representados por ondas negativas (onda *a*) e ondas positivas (onda *b*). A figura 8 representa os tipos de estimulação e seus formatos de onda característicos, às quais são analisadas seus tempos implícitos e suas amplitudes mensuradas da seguinte forma: amplitude da onda *a* corresponde ao valor mensurado (normalmente, em μV) desde a linha de base ao pico da onda *a*; a amplitude da onda *b* corresponde ao valor mensurado desde o pico da onda *a* até o pico da onda *b*. Já o tempo implícito (normalmente, em ms) corresponde ao tempo decorrido entre a emissão do estímulo e o pico da onda *a* ou onda *b* (MARMOR et al., 2009).

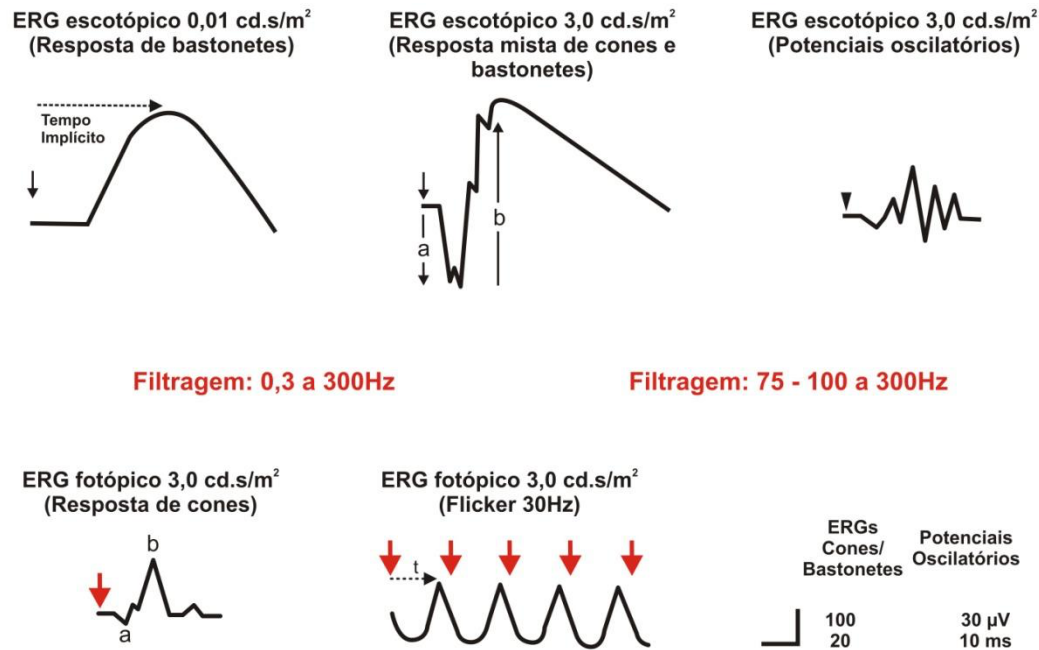


Figura 8. Ilustração, mostrando as formas de onda obtidas de acordo com o estímulo emitido (Adaptado de MARMOR et al, 2009).

Respostas Celulares do Eletroretinograma de Campo Total

A avaliação das contribuições, de forma isolada, dos bastonetes e cones, assim como, das demais células retinianas, é útil, por exemplo, para o diagnóstico de determinadas patologias e da função real da retina. No entanto, não é uma tarefa simples, porque o *flash* de luz pode ativar ambos os fotorreceptores (SZEL; ROHLICH, 1992). Algumas tentativas de isolar os fotorreceptores envolveram manipulações criteriosas dos estímulos ou cor de fundo (BILOTTA; SASZIK; SUTHERLAND, 2001; MAHROO; LAMB, 2003; VERDON; SCHNECK; HAEGERSTROM-PORTNOY, 2003), das características temporais dos estímulos (KRISHNA; ALEXANDER; PEACHEY, 2002; VERDON; SCHNECK; HAEGERSTROM-PORTNOY, 2003; PINILLA, LUND; SAUVE, 2005) ou do estado de adaptação (JAMISON et al., 2001; BIRCH et al., 2002; VERDON; SCHNECK;

HAEGERSTROM-PORTNOY, 2003).

Bush e Sieving (1994), na tentativa de determinar se a onda *a* seria produzida exclusivamente por fotorreceptores, administraram compostos análogos ao glutamato a macacos e concluíram que a onda *a* fotópica deriva parcialmente dos cones. Enquanto que Qiu et al. (2002) demonstraram que o tempo implícito desta onda *a* é gerado exclusivamente por fotorreceptores ao provocarem lesões em áreas diferentes da retina. Posteriormente, Pinto et al. (2007) e Holder et al., (2010) demonstraram que o início da atividade da onda *a* (6 a 10ms iniciais) é produzida por ação dos fotorreceptores. Já a inclinação da onda *a* é resultado da ação de células gliais em resposta à redução de íons K^+ no fotorreceptor.

Outros estudos sugerem que as células bipolares OFF possuem um papel importante na geração da onda *a*. Esta conclusão foi tomada a partir de um experimento no qual a utilização de PDA (ácido piperidinedicarboxílico) provocou redução na amplitude até o bloqueio completo desta onda. Como o PDA é uma substância responsável por bloquear a transmissão de sinais entre os fotorreceptores e as células bipolares OFF e horizontais e entre as células bipolares ON e OFF e as células ganglionares e amácrinas, torna-se evidente a participação das células bipolares OFF na geração da onda *a* (BUSH; SIEVIENG, 1994; HARE; TON, 2002; MIURA et al, 2009).

A onda *b* é um potencial córneo-positivo que atinge seu pico em cerca de 60-100ms, dependendo do nível de adaptação e da energia do estímulo. Esta onda *b* reflete a atividade tanto das células bipolares ON (GREEN; KAPOUSTA-BRUNEAU, 1999) com contribuição das células horizontais (HANITZSCH et al., 2004). Gargini et al. (1999), confirmaram a afirmação acima após realizarem experimentos utilizando a droga 2-Amino-4-phosphonobutyrate (APB), substância que provoca lesão seletiva em células bipolares ON. Tais autores observaram que houve redução na resposta do componente positivo (onda *b*) do ERG de Campo Total, praticamente não havendo alteração no componente negativo, o que significa que a onda *b* seria gerada principalmente pelas células bipolares ON. Há alguns anos atrás, foi sugerido que as células de Muller também contribuíam para geração desta onda (HANITZSCH, 1981; NEWMAN, 1984; NEWMAN; ODETTE, 1984; DICK; MILLER, 1985). Gargini et al. (1999), utilizando o Bário, substância bloqueadora dos canais

de potássio e com isso bloqueia também o funcionamento das células de Muller, demonstraram não ser possível identificar os componentes da onda *b* no ERG, confirmando a idéia da participação das células de Muller na geração desta onda *b*. Todavia, evidências mais recentes, utilizando camundongo *knock-out* para canais de potássio, demonstram uma improvável contribuição das células de Muller para a formação da onda *b* (KOFUJI et al., 2000; WU et al., 2004).

A atividade das células bipolares ON e OFF é responsável pela produção dos potenciais oscilatórios. Estudos utilizando 2-Amino-4-phosphonobutyrate (APB), substância que provoca lesão seletiva em células bipolares ON, demonstraram a participação desta via ON em todos os picos destes potenciais. Enquanto trabalhos que utilizaram o PDA mostraram que a via OFF seria responsável pelos picos finais dos potenciais oscilatórios. Os efeitos do APB e do PDA sobre as respostas ao Flicker 30Hz também sugerem que esta resposta seja gerada pela combinação das duas vias (HARE; TON, 2002; JACOB et al., 2011).

Desta forma, o ERG, por refletir o funcionamento das camadas celulares da retina de uma forma confiável, é, com frequência, empregado na prática clínica tanto como diagnóstico, quanto como um recurso para acompanhar a evolução de uma série de doenças que afetam as células da retina, como por exemplo: doenças genéticas como retinose pigmentar, doença de Stargardt ou distrofia de cones e bastonetes; doenças vasculares, inflamatórias ou degeneração causada pelo efeito tóxico de drogas, medicamentos ou outras substâncias químicas (BIRCH; ANDERSON, 1992; BEREZOVSKY et al., 2008; MARCUS; CABAEL; MARMOR, 2006; PARANHOS; PARANHOS JR; NEHEMY, 2002; PEREIRA et al., 2003).

3.3. DEGENERAÇÃO RETINIANA

As afecções que atingem a retina constituem um grande risco à sua integridade. Por ser um tecido que não se regenera, a retina pode sofrer degenerações, displasias e outras enfermidades que podem comprometê-la irreversivelmente (SLATTER, 2005).

Com a mudança do perfil da população mundial, em especial, com o envelhecimento exponencial, principalmente nos países desenvolvidos, as doenças degenerativas adquiriram um papel importante nas enfermidades que acometem os seres humanos. Dentre as doenças que atingem a retina, as degenerações retinianas estão entre as que mais causam cegueira no mundo, tanto em seres humanos, quanto em animais (BUCH et al., 2005; OFRI; NAFSTRÖM; 2007).

A complexidade estrutural e funcional da retina faz este tecido vulnerável a alterações patológicas de qualquer tipo de lesão. O glaucoma, por exemplo, é uma das principais causas de cegueira e é caracterizada por uma degeneração das células ganglionares da retina, conduzindo a danos no nervo óptico. A pressão intraocular é um dos mais importantes fatores de risco (CUENCA et al., 2014).

A retinopatia diabética (RD), refere-se a um grupo de problemas oculares que pessoas com diabetes podem enfrentar. A RD é a complicação vascular mais específica do diabetes mellitus (DM) e quando resulta em cegueira é considerada uma das complicações mais trágicas (FERRIS III, 1993; KLEIN et al., 1994). Dentre 16 milhões de pessoas portadoras de DM nos Estados Unidos, aproximadamente 700.000 apresentam doença retiniana e, por volta de, 65.000 progridem a cada ano para o estágio mais avançado da RD que é o estágio proliferativo (KLEIN et al., 1994). A prevalência da retinopatia diabética tem sido objeto de vários estudos (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1991; THE WISCONSIN EPIDEMIOLOGIC STUDY OF DIABETIC RETINOPATHY III, 1984).

Um dos sinais clínicos mais precocemente detectáveis na RD é o aumento da permeabilidade vascular, devido à quebra da barreira hemato-retiniana (AIELLO et al., 1998). Mais tardiamente têm-se microaneurismas, exsudatos e proliferação vascular (MOSS et al., 1988; FONG et al., 2004). Os níveis séricos elevados de glicose também induzem a uma série de alterações bioquímicas e celulares na retina que podem provocar alterações vasculares encontradas na RD, como por exemplo: aumento na atividade da via dos polióis, glicação não-enzimática de proteínas, estresse oxidativo e ativação da proteína kinase C pela síntese de diacilglicerol (MIYAMOTO et al., 1999). A adesão dos leucócitos polimorfonucleares à parede do capilar retiniano leva à sua oclusão e extravasamento vascular, contribuindo para a hipóxia tecidual e consequente liberação do fator de crescimento endotelial vascular

(VEGF), principal responsável pela formação de novos vasos na retina, também tem despertado interesse pelos pesquisadores da área (SCHRODER et al., 1991; BAROUCH et al., 2000; GARDNER et al., 2002). Entretanto, até o presente momento, o exato mecanismo, ou o conjunto de mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva à retinopatia, permanece obscuro (MIYAMOTO et al., 1999).

A retinite pigmentosa (RP) é considerada como sendo um grupo de doenças hereditárias, causando degeneração de fotorreceptores. Na maioria das formas de RP, os bastonetes são afetados antes dos cones. Devido os bastonetes estarem mais concentrados na retina periférica, as pessoas que sofrem desta doença mostram uma progressiva diminuição do campo visual periférico, que culmina por formar uma “visão de túnel”. Este mesmo sintoma também é encontrado nos portadores de glaucoma, devido à morte das células ganglionares periféricas (CUENCA et al., 2014).

Disfunções visuais também foram descritas associadas a desordens neurodegenerativas humanas, tais como a doença de Alzheimer e doenças de Parkinson. Os doentes que sofrem destas patologias mostram uma marcada redução da espessura das camadas de fibras do nervo óptico, alterações nas respostas do eletrorretinograma e alterações de sensibilidade ao contraste visual, assim como latência prolongada dos potenciais visuais evocados. Anormalidades na percepção de cores, especialmente, na discriminação da matiz azul-amarelo, também têm sido descritos associada a estas doenças e mais, alterações na capacidade "superior" de processamento visual, tais como leitura, reconhecimento de objetos e localização espacial (BODIS-WOLLNER, 2009; KIRBY et al., 2010).

A Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) se destaca como a maior causadora de cegueira entre os idosos no mundo (GEHRS et al., 2006). Segundo Gu et al. (2003), cerca de 35% das pessoas com déficit visual acima de 75 anos possuem algum grau de DMAI. É uma doença de causas multifatoriais que envolvem diversos fatores de risco tanto ambientais, quanto demográficos e genéticos, como idade, gênero, etnia, dieta, tabagismo, educação, doenças cardiovasculares e exposição à luz (VILLEGAS-PÉREZ et al., 2005; COLEMAN et al., 2008; JAGER et al., 2008). Os sintomas iniciais desta doença incluem perda da acuidade visual central e a impressão subjetiva da curvatura de linhas retas ou metamorfopsia.

Nesta doença, comprometimento das células do EPR e dos fotorreceptores, assim como angiogênese vascular são a causa principal da perda visual (CUENCA et al., 2014).

3.4. FOTOTOXICIDADE

O processo pelo qual a luz é o agente causador da lesão denomina-se fototoxicidade, fotodegeneração ou degeneração luz-induzida. Apesar dos fotorreceptores serem células especializadas na fototransdução, a intensidade da luz ou até mesmo o espectro ao qual o animal é exposto pode levar a um desequilíbrio deste processo, assim como do ciclo visual de regeneração da rodopsina. Isto pode culminar na morte de fotorreceptores e células do EPR, levando à disfunções visuais ou, até mesmo, à cegueira (REMÉ et al., 2003).

Os efeitos da luz intensa sobre a morfologia e a bioquímica da retina podem ser dramático, pois toda a população de células visuais é frequentemente afetada de forma negativa. Em roedores noturnos, os danos induzidos pela luz, normalmente, são confinado aos bastonetes e a perda de células da retina, em grande parte, restrita à camada nuclear externa. Desta forma, medições da área da CNE, espessura, ou contagem de núcleos de células visuais são frequentemente utilizados para quantificar os efeitos prejudiciais da luz. Medidas de DNA da retina e determinações quantitativas de proteínas de células visuais, dias após a exposição à luz, também são utilizados para fazer boas e pontuais estimativas finais sobre a perda de células fotorreceptoras. O dano retiniano provocados pela luz é uma resposta gradual, com áreas contendo pouco ou nenhum dano, ao lado de regiões mais gravemente afetadas (RAPP; WILLIAMS, 1980).

No hemisfério superior da retina, os danos provocados pela luz são particularmente graves em uma região entre 1 e 2 mm a partir da emergência das fibras do nervo óptico. Em situações de degeneração retiniana induzida por luz, normalmente, a periferia da retina é poupada e o dano no hemisfério inferior é menor que no hemisfério superior (RAPP; WILLIAMS, 1980). Esta redução de lesões retinianas no hemisfério inferior tem sido atribuída a um menor comprimento do

segmento externo dos bastonetes e também a um nível mais baixo de rodopsina (RAPP et al, 1985; PENN; ANDERSON, 1987). A diminuição ou ausência de danos na retina periférica é geralmente resultado de uma diminuição da irradiação da retina nesta área. Alguns estudos sugerem que tal regionalização da lesão retiniana ou, até mesmo, proteção, são devido a uma melhor circulação intrarretiniana na região inferior e, também, à síntese do fator neuroprotetor em resposta ao condicionamento da luz brilhante (bFGF) (LIU et al., 1998; LI et al., 2003). Stone et al. (1999) encontraram níveis elevados de bFGF tanto na região inferior quanto na periferia da retina.

A forma com que a luz penetra no tecido é um fator importante para determinação do tipo de efeitos fotobiológicos produzidos. A absorção e dispersão da luz pelo tecido depende do comprimento de onda e esses processos, por sua vez, regulam a propagação da luz. As propriedades ópticas dos meios oculares desempenham um papel importante na determinação da exposição da retina (HILLENKAMP, 1989; JACQUES, 1992).

A lesão tecidual induzida pela radiação luminosa pode ocorrer através de, pelo menos, um dos três processos fundamentais; mecânica (ou de ionização), a fotocoagulação térmica (ou fotovaporização) e fotoquímica.

Fotoxicidade mecânica

A lesão mecânica decorre, principalmente, da rápida penetração de energia para os melanossomas do EPR, o que gera ondas de choque. Estas, causam danos irreparáveis aos fotorreceptores e ao EPR (HAM et al., 1974; GOLDMAN et al., 1977). O dano tecidual pode ser resultado de forças mecânicas de compressão ou de tensão que levam à formação de micro bolhas de cavitação, que são letais para algumas células, inclusive para as células do EPR (BRINKMANN et al., 2000). A razão entre a energia incidente e a energia absorvida é fator dominante para a determinação da extensão da lesão, e não apenas, o comprimento de onda da luz

(MARSHALL, 1970; LUND; BEATRICE, 1979). O efeito é causado por elevados níveis de irradiação (megawatts a terawatts por cm^2) e curtos tempos de exposição (nanossegundos a picossegundos), durante o qual a energia é tão rapidamente absorvida pelos grânulos de melanina, no EPR, que não dá tempo para o calor ser dissipado. Ham et al. (1974), demonstraram, através da histologia e de exames ultra-estruturais, que os danos celulares limitam-se à vizinhança dos melanossomos, particularmente, ao segmento externo dos fotorreceptores e à porção apical das células do EPR. Desta forma, acredita-se que a vaporização explosiva, ou seja, uma rápida mudança de fase da água líquida para vapor, seja o mecanismo para a lesão mecânica do EPR (GLICKMAN et al., 1996).

Fotoxicidade térmica

A quantidade de energia radiante (fóton) pode ser absorvida por uma molécula única, caso a energia dos fótons seja igual à diferença de energia entre os níveis de energia da molécula corrente e um nível mais elevado. Estados quânticos vibracional e rotacional de moléculas predominam sobre os estados de excitação para os comprimentos de onda mais longos no espectro visível e no infravermelho próximo (600 – 1400nm) (HAM et al., 1976). A energia vibracional adquirida pela molécula é rapidamente dissipada através de colisões (choques) com outras moléculas; momentaneamente, eleva-se o nível de energia cinética local, um processo visto como aumento da temperatura. As lesões térmicas não são produzidas pelo aumento da energia cinética até a irradiação da radiação ser suficiente para elevar a temperatura mais do que 10 °C acima da temperatura ambiente da retina. Consequentemente, as lesões térmicas possui um limiar de irradiância. Os efeitos térmicos, geralmente, surgem com o tempo de exposição, variando de microssegundos até o tempo necessário para atingir o equilíbrio térmico (poucos segundos). Entretanto, a irradiação e a duração da exposição, requeridas para produzir certo nível de lesões, não são inversamente proporcionais. A quantidade de energia requerida para produzir certo tipo de efeito térmico, aumenta com o aumento do tempo de exposição, devido ao calor ser dissipado durante a exposição (CLARKE et al., 1969).

Fotoxicidade fotoquímica

Uma forma diferente de interação entre a energia radiante e as moléculas biológicas ocorre quando a radiação incidente tem um comprimento de onda na porção de alta energia do espectro visível. Um elétron em um estado excitado pode voltar ao estado fundamental, dissipando a energia extra de várias formas. Uma maneira de dissipar a energia é quebrar ligações em outras moléculas por troca eletrônica direta ou troca direta de hidrogênio, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. O processo também pode produzir outros radicais livres (SPIKES; MACKNIGHT, 1972).

A formação de radicais livres é mais importante na destruição dos tecidos do que a quebra de ligações. Os radicais livres podem atacar diversos tipos de moléculas e torná-las inativas (GIROTTI, 2001). Tecidos em que há uma grande concentração de membranas celulares são, particularmente, mais severamente danificados porque o ataque de radicais livres nos ácidos graxos poliinsaturados de um lipídio induz uma reação em cadeia denominada peroxidação lipídica que quebra estruturas membranosas (PRYOR et al., 1976).

O mecanismo do dano fotoquímico é dado da seguinte forma: o excesso de luz pode, num curto período, induzir a fototransdução de grandes quantidades de rodopsina, liberando radicais livres em excesso, e levando ao estresse oxidativo dos fotorreceptores e EPR. Além disso, o acúmulo de componentes ou toxinas não digeríveis, oriundos da fagocitose dos discos de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores, no EPR leva à redução das funções vitais e eventualmente à morte celular (REMÉ et al., 2003; CINGOLANI et al., 2006).

A Lipofucsina é um pigmento acumulado no EPR, que, quando em excesso, torna-se citotóxico, induzindo a formação de radicais livres. O aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio no interior do EPR leva à desestabilização de membranas de estruturas celulares como lisossomos e mitocôndrias. A redução da eficiência metabólica resultante leva ao acúmulo de mais lipofucsina e ao surgimento de mais radicais livres. Um importante constituinte da

Lipofucsina é derivado da ineficiência do EPR em isomerizar o *all-trans* retinol. Uma quantidade adicional desta substância origina-se da fagocitose de restos de membrana dos fotorreceptores. Este composto, N-retinil-N-retinilideno etanolamina, também chamado de A2E, aumenta a sensibilidade do EPR à luz e possui diversos efeitos tóxicos sobre a célula (STRAUSS, 2005).

Os fotorreceptores também são diretamente atingidos pelos resíduos da fototransdução excessiva. A grande quantidade de radicais livres no meio intercelular induz a formação de proteínas e lipídios de membrana danificados, levando ao desequilíbrio da célula que pode entrar em colapso e iniciar a cascata de eventos que culminarão na morte por apoptose (HAFEZI et al., 1997).

Os mecanismos de fototoxicidade podem variar dependendo da intensidade, duração, e espectro da luz (REMÉ, 2005). Outros estudos ressaltam que tanto a espécie quanto linhagens de animais de experimentação podem influenciar nas respostas aos diferentes modelos de foto-exposição (KELLER et al., 2001). Lavail et al. (1987), identificaram diferenças na velocidade de regeneração da rodopsina em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57/B16). Estes autores atribuem essa diferença a fatores genéticos entre as duas linhagens.

Redmon et al. (1998), utilizando modelo de ratos com falta de quantidade adequada de rodopsina funcional, demonstraram não haver perda celular por apoptose induzida pela luz e nem lesões no EPR. Desta forma, a rodopsina pode ser considerada como o principal mediador da apoptose induzida pela luz em ratos e também em algumas outras espécies. A correlação entre os níveis de RPE 65, a taxa de regeneração da rodopsina e a proteção contra os danos retinianos é clara. Ratos e camundongos com baixos níveis de RPE 65 e lenta regeneração da rodopsina, apresentam elevados níveis de proteção contra os danos na retina decorrentes do excesso de luz. Enquanto, os animais que apresentam uma rápida taxa de regeneração da rodopsina, apresentam uma baixa proteção (WENZEL et al., 2001).

Estudos realizados por Grimm et al. (2000) identificaram um mecanismo de regeneração da rodopsina independente do ciclo visual. Eles observaram que a rodopsina, quando estimulada por um feixe de luz com espectro entre 400 e 410 nm (Luz azul), é decomposta em Metarodopsina II e, em seguida, o *all-trans* retinal é

reisomerizado em 11-*cis* retinal, tornando-se reativa novamente. Esses autores sugerem que a luz azul possui uma maior capacidade de causar danos à retina devido a este fenômeno, no qual a rápida regeneração da rodopsina leva a um maior acúmulo de compostos tóxicos e radicais livres.

Dependendo da quantidade de radicais livres e substâncias tóxicas geradas, os fotorreceptores e EPR podem chegar a um limiar, que, quando ultrapassado, a célula entra em processo de apoptose, que se revela como um evento crucial para o agravamento da degeneração luz-induzida (REMÉ et al., 2000).

O processo de apoptose dos fotorreceptores pode ser dividido em quatro fases. A primeira é a fase de indução, na qual a presença de radicais livres e substâncias tóxicas para a célula causam estresse oxidativo, induzindo a liberação de fatores pró-apoptóticos. A segunda é a fase efetora, na qual ocorre uma cascata de reações que envolvem caspases e outras enzimas proteolíticas. A terceira é a fase de execução, que é caracterizada pela lise do DNA. A última fase é a de fagocitose que é feita principalmente pelas micróglia residentes e micróglia derivadas de macrófagos recrutadas para a região acometida (REMÉ et al., 2000; JOLY et al., 2009).

As micróglia respondem ao processo de degeneração dos fotorreceptores por meio de citocinas que são liberadas pelos mesmos. Em estudo com camundongo, com degeneração hereditária dos bastonetes (rd-1), Zeiss e Johnson (2004) observaram a migração e proliferação de micróglia para a camada nuclear externa da retina, indicando que o processo de apoptose induziu sua ativação. Após a ativação, as micróglia migram para a região afetada onde liberam diferentes citocinas e fagocitam os fotorreceptores (LANGMANN, 2007). Apesar do papel benéfico das micróglia, a reação exagerada é atualmente compreendida como um fator deletério para a retina, levando à liberação de fatores pró-inflamatórios e à quebra da barreira hematorretiniana, induzindo a migração de macrófagos derivados da medula óssea e a formação de edema (KARLSTETTER et al., 2010). Segundo Schuetz e Thanos (2004), micróglia ativadas liberam fatores pró-apoptóticos em diversas doenças da retina.

Atualmente, estudos sobre a origem das micróglia ainda são conflitantes. Pesquisadores utilizaram técnicas de engenharia genética para a formação de

camundongos quimeras com o objetivo de avaliar a possível origem das micróglia recrutadas durante o processo degenerativo (KARLSTETTER et al., 2010). Xu et al. (2007), em estudo com camundongos GFP (Proteína Fluorescente Verde), identificaram um grupo de células presentes na retina derivado da medula óssea. Os autores sugerem que estas células penetram na retina por meio da barreira hematorretiniana. No mesmo estudo, os autores observaram que a proliferação de micróglia *in situ* é bastante limitada. Em contrapartida, Kaneko et al. (2008) sugerem que a quantidade de células derivadas da medula óssea é bastante reduzida em animais que não sofreram lesão na retina. Quando os animais foram submetidos à degeneração por oxidação utilizando N-metil-N-nitrosurea, ocorreu um aumento significativo de células GFP positivas oriundas da medula óssea (KANEKO et al., 2008).

Durante o processo de degeneração, ocorre a morte de células do EPR, o que leva ao agravamento do quadro, levando à liberação de fatores pró-inflamatórios, presença de exsudatos subretiniano, migração excessiva de micróglia e macrófagos e neovascularizações (STRAUSS, 2005).

As células de Müller também possuem um papel importante na regulação do processo degenerativo. Esta célula, ao entrar em gliose, também libera fatores pró-inflamatórios, altera a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, desregula o funcionamento de canais iônicos, levando ao surgimento de edema retiniano e morte celular (BRINGMANN et al., 2006).

3.5. TERAPÊUTICA CONTRA A DEGENERAÇÃO RETINIANA INDUZIDA PELA LUZ

Apesar de estudos recentes demonstrarem que células-tronco embrionárias podem se diferenciar em fotorreceptores e células do EPR, a aplicabilidade clínica deste tipo de terapêutica ainda é pouco praticável (BHARTI et al., 2010). Diante disto, diversos grupos de pesquisa estudam meios de prevenir, atenuar ou bloquear

os efeitos da degeneração retiniana luz-induzida. A maior parte dos estudos busca atingir dois pontos-chave no processo de fototoxicidade: a formação de radicais livres pela fotooxidação e a apoptose de fotorreceptores e células do EPR, pelo uso de substâncias com características antioxidantes e neuroprotetoras.

Diversos estudos laboratoriais demonstraram que flavonoides, como a Epigallocatequina Galato (EGCG), podem apresentar multifunções como: anti-inflamatória (TEDESCHI et al., 2002; CHEN et al., 2004), anti-bacteriana (BLANCO et al., 2005), anti-trombótica (KANG et al., 1999), anti-viral (LYU et al., 2005; SONG et al., 2005), anti-alérgica (YOSHINO et al., 2004), neuroprotetora (REZNICHENKO et al., 2005; KOH et al., 2006). Alguns estudos *in vitro* (NAGAI et al., 2002; XIE et al., 2004) e *in vivo* (BUTTEMEYER et al., 2003; MORLEY et al., 2005) demonstraram que a EGCG também possui função anti-oxidante. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Zhang e Osborne (2006), utilizando ratos adultos, demonstraram uma atenuação da degeneração retiniana induzida pelo estresse oxidativo. Tais autores encontraram uma diminuição da peroxidação lipídica, uma melhor resposta funcional da retina ao exame da eletrorretinografia, uma menor taxa de apoptose dos fotorreceptores. Da mesma forma, Costa et al. (2008), observaram que a EGCG, administrada em ratos expostos à luz, teve efeito neuroprotetor sobre os fotorreceptores, reduzindo o número de células em apoptose, assim como níveis de fatores pró-apoptóticos. Corroborando com tais resultados, Zhang et al. (2008), utilizando cultura de células submetidas à exposição da luz, também encontraram um poder anti-oxidante da EGCG, onde verificaram que a administração de 10 μ M da EGCG, impediu completamente o surgimento de EROs e da cascata de apoptose.

Existem algumas potentes moléculas de sobrevivência que protegem a células da retina, inclusive os fotorreceptores, da morte celular induzida por diversos estímulos, são os fatores neurotróficos (CHAUM, 2003). Em modelos animais de degeneração retiniana, a morte celular dos fotorreceptores foi prevenida após a injeção intravítrea de fatores como: fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (LAVAIL et al., 1998; OKOYE et al., 2003), fator neurotrófico ciliar (CNTF) (CAYOUEtte et al., 1998; LAVAIL et al., 1998), fator de crescimento de fibroblastos (FGF)-2 (FAKTOROVICH et al., 1990; GAO; HOLLYFIELD, 1996) fator neurotrófico derivado do glia (GDNF) (McGEE SANFTNER et al., 2001).

Similarmente, na degeneração luz-induzida, os fotorreceptores foram protegidos pela administração exógena do BDNF, bem como a administração intravítrea do fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) (IMAI et al., 2005). De acordo com Cao et al. (2001), os níveis de alguns fatores neurotróficos, como o FGF-2 e CNTF, são regulados positivamente após lesões mecânicas e degeneração induzida pela luz na retina (GAO; HOLLYFIELD, 1996; WALSH et al., 2001). Desta forma, a regulação positiva de fatores neurotróficos endógenos pode ser um mecanismo protetor natural dos fotorreceptores (JOLY et al., 2007).

Chucair et al. (2007) avaliaram o uso dos carotenóides Luteína e Zeaxantina, em cultura de bastonetes submetidas a estresse oxidativo. Estes autores concluíram que as substâncias protegeram as células dos agentes oxidantes e sugerem que elas possuem características neuroprotetoras por influenciar a sobrevivência e diferenciação dos fotorreceptores *in vivo*. Em modelo de estudo semelhante, Mandal et al. (2009) avaliaram o efeito da curcumina, um pigmento natural utilizado com tempero na culinária asiática, sobre células derivadas da retina *in vitro*. O pigmento reduziu níveis de fatores pró-inflamatórios, sendo um potencial componente nutracêutico para a prevenção de degenerações retinianas.

Estudos recentes avaliaram o potencial neuroprotetor do resveratrol, um polifenol encontrado principalmente em vinhos tintos e na casca de uvas. Os pesquisadores observaram que a substância protegeu os fotorreceptores da fotodegeneração por meio da inibição da Proteína Ativadora-1 (AP-1), um dos fatores que dão início ao processo de apoptose (KUBOTA et al., 2010).

A rapamicina, um importante fungicida, também possui funções neuroprotetoras contra lesões induzidas pela luz na retina (LI et al., 2014). Tais autores, utilizando cultura de células com características fotorreceptoras, demonstraram que a rapamicina protege contra a morte celular devido a uma inibição do estresse no retículo endoplasmático. Tal estudo demonstrou que a exposição à luz evidencia alguns marcadores de estresse (p-EIF2a, ATF4 e p-ATF6) e que a administração da rapamicina suprimiu a liberação destes marcadores, reduzindo seus níveis de RNAm. Desta forma, este medicamento possui um efeito neuroprotetor por diminuir a síntese proteica e, significativamente, diminuir o estresse sobre o retículo endoplasmático.

Bennet et al. (1996), iniciaram um novo modelo de tratamento para doenças retinianas, a terapia gênica. Tais autores foram capazes de recrutar ratos com deficiência no gene da fosfodiesterase e, de forma subretiniana, administrar um gene funcionante através de um adenovírus. Em seguida, Acland et al. (2001), utilizando cachorros com a Amourose Congênita de Leber, cuja principal causa identificada é um defeito no gene que codifica a proteína RPE 65, também injetaram, de forma subretiniana, um adenovírus como vetor para um gene funcional. E os animais que receberam este tipo de tratamento apresentaram melhoras significativas na resposta pupilar, nos traçados do ERG e na locomoção.

Esta terapia gênica também vem sendo empregada para algumas lesões da retina decorrentes do excesso de luz. A utilização do POD (*Peptide ocular delivery*) é uma nova forma de diversos peptídeos penetrarem nas células, inclusive de células neuronais oculares, como o EPR, fotorreceptores e as células ganglionares (JONHSON et al., 2010). Ao se combinar com o polietilenoglicol (PEG-POG), permite a compactação do DNA em plasmídeos (em nanopartículas) e podem ser transferidos às células do EPR (READ et al., 2010). Estudo utilizando camundongos BALB/cJ submetidos à foto-exposição (8.500 – 11.000 lux) com luz azul por 4 horas, demonstraram que o complexo PEG-POG associado a fatores, como GDNF, reduziu os níveis de apoptose celular, preveniu contra a redução da camada nuclear externa, reduziu níveis de caspases 3 e 7 e melhorou a amplitude das ondas *a* e *b* no ERG.

3.6. FLUOXETINA

A Fluoxetina (Prozac) apareceu pela primeira vez na literatura científica como Lilly 110140 (na forma de cloridrato), um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (WONG et al., 1974). Após mais de vinte anos de extensas investigações, a inibição da recaptação da serotonina continua a ser o principal mecanismo de ação para a fluoxetina, um agente farmacológico que tem sido largamente utilizado para determinar a neurotransmissão da serotonina no sistema nervoso central (WONG et al., 1995). Evidência disponível no início dos anos 70 previa que a fluoxetina tinha potencial antidepressivo (WONG et al., 1974). Desde

sua aprovação, em 29 de dezembro de 1987, pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e sua introdução para o tratamento da depressão no início de 1988, o Prozac se tornou o antidepressivo mais prescrito no mundo. Em 1 de março de 1994, o FDA aprovou a segunda indicação clínica da fluoxetina para o tratamento de transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), e em 26 de abril do mesmo ano, os membros do Comitê Consultivo da FDA ano recomendaram, por unanimidade, a aprovação da fluoxetina para o tratamento da bulimia (WONG et al., 1995).

A fluoxetina tem emergido como o medicamento de escolha para a depressão por causa de seu perfil mais seguro, menos efeitos colaterais e mais tolerabilidade (WILDE; BENFIELD, 1998). Diversas pesquisas têm encontrado funções importantes da fluoxetina relacionada ao SNC. Zhang et al. (2012) encontraram função neuroprotetora da fluoxetina contra a ativação microglial mediada por neurotoxicidade em células neuronais. Novio et al. (2011) demonstraram um efeito positivo da fluoxetina contra danos celulares oxidativos decorrentes do stress. Zafir e Banu (2007) também demonstraram o potencial antioxidante da fluoxetina, afirmando que este potencial pode contribuir para sua ação terapêutica, sendo um importante mecanismo intracelular subjacente aos efeitos farmacológicos protetores observados clinicamente no tratamento de várias doenças relacionadas ao stress. A ação antiinflamatória da fluoxetina também foi demonstrada por Abdel-Salam et al. (2004) ao utilizar ratos induzidos a processos inflamatórios com carragenina e obtiveram respostas inflamatórias semelhantes a fármacos padrão para o tratamento de quadros inflamatórios. A administração de fluoxetina também contribui para a redução dos níveis de apoptose celular. Kolla et al. (2005) demonstraram uma maior sobrevivência neuronal e uma redução dos níveis de mediadores de apoptose e de substâncias oxidativas como a superóxido dismutase (SOD) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Makkonen et al. (2011), estudando crianças com autismo, demonstram um aumento da concentração de IGF-1 (um importante fator neurogênico do SNC) após a utilização de fluoxetina. Estes autores ainda afirmam que essa elevação dos níveis de IGF-1 deve ter um importante papel no desenvolvimento cerebral e na modulação dos processos neuronais.

Ação Anti-inflamatória

Recentemente, foi demonstrado que a depressão está relacionada com a ativação do sistema de resposta inflamatória (MAES, 1999). As evidências demonstram, entre outras coisas, um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e interferon- γ (IFN- γ) (SEIDEL et al, 1995; MAES, 1999). Um aumento da produção de IL-1 e IL-2 tem sido observado na cultura sobrenadante de esplenócitos mitógenos-estimulados de ratos submetidos ao stress crônico e modelos de depressão em ratos (KUBERA et al., 1996; KUBERA et al., 1998). Yirmiya (1996) e Maes (1999) sugerem que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pode desempenhar um papel na etiologia da depressão. De fato, a IL-1, IL-6, e IFN, em animais experimentais e seres humanos podem produzir alterações comportamentais e sintomas semelhantes aos observados na depressão, como anedonia, anorexia, perda de peso, retraimento social, retardo psicomotor, anergia, irritabilidade e distúrbios do sono (MAES, 1999).

Se as citocinas pró-inflamatórias estão envolvidos na etiologia da depressão, seria de se esperar que agentes antidepressivos possuam efeitos imunomoduladores negativos. Tratamentos prolongados com antidepressivos suprime a resposta na fase aguda em pacientes com depressão (MAES et al., 1997) e em ratos modelos de depressão com stress crônicos leve (SONG et al., 1994).

Em modelos experimentais de inflamação, a fluoxetina tem demonstrado exercer efeitos anti-inflamatórios e no alívio da dor. O mecanismo pelo qual a fluoxetina diminui a inflamação ainda não é clara (BIANCHI et al., 1994).

Abdel-Salam, Baiuomy e Arbid (2004) induziu o aparecimento de edema na pata de ratos com a administração da carragenina. Em seguida, tais autores, utilizaram a fluoxetina, de forma isolada e/ou combinada com outras substâncias (anti-inflamatórios não esteróides, outros antidepressivos e melatonina). Este estudo demonstrou que a fluoxetina, administrada intraperitonealmente e de forma isolada, suprimiu o edema na pata dos animais de forma dose-dependente. Da mesma forma, quando a fluoxetina foi administrada, de forma conjunta com anti-inflamatórios não esteróides (indometacina, celecoxib e rofecoxib), com outros antidepressivos (imipramina e trazodona) ou com a melatonina promoveu uma redução do quadro inflamatório, sugerindo que a Fluoxetina pode ser uma droga útil

no combate a processos inflamatórios, principalmente, administrada em conjunto com outras drogas específicas.

A administração de desipramina em ratos aumenta a capacidade dos esplenócitos em produzir a citocina imunorreguladora negativa IL-10 (XIA et al., 1996). Estudos *ex vivo* mostram que os antidepressivos inibem a secreção de IL-1 β , IL-2, factor de necrose tumoral - α (TNF- α), e IFN- γ , e que inibem a atividade proliferativa de células T e a atividade citotóxica das células *natural killers* (XIA et al., 1996; MAES, 1999). A co-incubação de sangue completo de seres humanos saudáveis, com clomipramina, um antidepressivo tricíclico, ou sertralina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, diminui a produção de IFN- γ e aumenta a produção de IL-10 (MAES et al., 1999). IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos linfócitos T ativados e pelas células *natural killers*. Ela estimula a produção de IL-1 e IL-6 (CAVAILLON, 1996). A IL-10 é produzida por linfócitos T *helper*, linfócitos B e monócitos, e tem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras importantes através de supressão de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatória (CAVAILLON, 1996). Portanto, a razão entre o IFN- γ e a IL-10 produzida por células imunológicas é de importância fundamental na determinação da capacidade para ativar ou inibir as funções dos monócitos e de linfócitos T (KATSIKIS et al., 1995).

Kubera et al. (2001), utilizando humanos adultos jovens e idosos portadores de depressão resistente ao tratamento (DRT), mostraram que a administração da Fluoxetina reduziu significativamente a produção do IFN- γ , principalmente nos idosos e que a produção da IL-10 foi significativamente maior nos indivíduos tratados com Fluoxetina. Desta forma, tal estudo demonstra a importância da Fluoxetina para a ativação do sistema de resposta anti-inflamatórias.

Ação Anti-Apoptótica

O papel de moléculas intracelulares de sinalização, fatores de transcrição e enzimas modificadoras da cromatina tem sido destacado na fisiopatologia e tratamento dos transtornos de humor (COVINGTON et al., 2010). Uma atenção especial tem sido dada aos processos apoptóticos, que são programados e

controlados pelo equilíbrio entre a moléculas pró-apoptótica (por exemplo, BAD) e anti-apoptótica (por exemplo, Bcl-2) (CORY; ADAMS, 2002).

A Bcl-2 atenua a apoptose, promovendo a sobrevivência da célula, além de promover o crescimento axonal e regeneração neuronal (DRZYGA et al., 2009). A expressão de Bcl-2 é controlada por vários fatores envolvidos com vias de sobrevivência, tais como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o elemento de resposta ao AMPc (CREB). Esta expressão pode ser regulada pelo stress, anti-depressivos e anti-psicóticos (HAMMONDS; SHIM, 2009; PARK et al., 2006; KOCK et al., 2009). Além disso, também tem sido demonstrado que os antidepressivos sobrerregulam a expressão de Bcl-2 (XU et al., 2003; CHIOU et al., 2006). Curiosamente, a estimulação do BDNF também ativa a proteína quinase B (PKB, Akt) (HUANG; REICHARDT, 2003). O complexo protéico Akt está envolvido na estrutura neural, na sobrevivência celular, na morte celular por apoptose, e também estimula a expressão de Bcl-2, inibindo assim a apoptose (LAWLOR; ALESSI, 2001).

Réus et al. (2012), utilizando fluoxetina e olanzapina, sozinhas ou combinadas, demonstraram uma elevação dos níveis de Akt, CREB, BDNF, Bcl-2 e BAD no córtex préfrontal, hipocampo e no núcleo striatum de ratos adultos. Estas áreas são muito envolvidas nos transtornos de humor e depressão. A Bcl-2 pertence a uma família de proteínas que regulam a morte celular programada. O controle do processo apoptótico é realizado pelo equilíbrio entre proteínas pró (por exemplo, BAD e BAX) e anti (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-XL) apoptóticas (CORY; ADAMS, 2002). Um aumento na relação de proteínas pró-apoptóticas contra proteínas anti-apoptóticas é associada a uma maior susceptibilidade à morte celular (LINDSTEN et al., 2005). Desta forma, Réus et al. (2012) sugerem um efeito anti-apoptótico do tratamento com Fluoxetina e Olanzapina.

Tem sido demonstrado que a Bcl-2 é apresentada como um repressor da morte de células neuronais (MYERS et al., 1995). Tanto a proteína Bcl-2 quanto a BAD regulam a liberação do citocromo C das mitocôndrias e, é sabido que o citocromo C desempenha um papel na iniciação da apoptose (LI et al., 1997). Agostinho et al. (2011a), avaliaram os efeitos da fluoxetina e da olanzapina nos complexos de cadeias respiratórias mitocondriais e demonstraram que as duas drogas citadas, sozinhas ou combinadas, alteram a atividade da cadeia respiratória em cérebros de ratos.

Além disso, o tratamento de forma aguda com fluoxetina altera a atividade da enzima citrato sintase e, tanto de forma aguda como crônica, modifica a atividade da enzima creatina quinase (AGOSTINHO et al., 2009; AGOSTINHO et al., 2011b). Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo celular e fica demonstrado, claramente, que existe uma relação entre a fluoxetina e o metabolismo energético, fato que tem sido correlacionado com distúrbios neuropsiquiátricos (BEM-SHACHAR; KARRY, 2008; QUIROZ et al., 2008).

Além de controlar a sobrevivência celular, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 também exerce efeitos neurotróficos (JONAS et al., 2003). Estudos relataram que alguns anti-depressivos (como a Fluoxetina) e o stress regulam fatores neurotróficos, tais como CREB e BDNF, que estão envolvidos em vias de sobrevivência celular e que controlam a expressão de proteínas pró e anti-apoptótica (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001). Kosten et al. (2008) relataram que o estresse imprevisível de forma repetida reduziu os níveis de RNAm da Bcl-2 no núcleo central da amígdala, no giro do cíngulo e córtex frontal. Por outro lado, o tratamento com antidepressivos como a fluoxetina, reboxetina e tranilcipromina suprarregula a expressão da Bcl-2 nas mesmas áreas do cérebro (KOSTEN et al., 2008). Huang et al. (2007) também demonstraram que o antidepressivo desipramine inibiu a indução do fator pró interleucina IL-1b e IL-6 mediado pela modulação de Bcl-2. Ainda, foi demonstrado que a administração de Olanzapina regula a expressão do RNAm da Bcl-2 no hipocampo de ratos (BAI et al., 2004).

A suprarregulação de CREB também regula a transcrição de Bcl-2 (LONZE; GINTY, 2002). Além disso, a expressão de Bcl-2 é também estimulada pela ativação de Akt, inibindo assim a execução da apoptose (GERBER et al., 1999). Estudos têm demonstrado que as regiões corticais de seres humanos deprimidos apresentam reduções da função da Akt (HSIUNG et al., 2003; KAREGE et al., 2007), e uma redução nos níveis de Akt também foi observado no cérebro de pacientes esquizofrênicos (EMAMIAN et al., 2004). Réus et al. (2012) demonstraram que fluoxetina e olanzapina, quando administradas de forma combinada, podem promover um aumento dos níveis de Akt no córtex préfrontal. Nakano et al. (2010) demonstraram que o tratamento com BDNF também estimulou a fosforilação do Akt, mostrando uma interconexão do BDNF e Akt. Réus et al. (2012), demonstraram que níveis elevados de Bcl-2 devido à administração de fluoxetina pode está envolvida na ativação do CREB via sinalização pelo Akt. De fato, o gene promotor da Bcl-2

contém um elemento responsivo ao AMPc (CRE), que quando fosforilado (CREB) se liga ao mRNA e eleva a transcrição da proteína antiapoptótica (BELKHIRI et al., 2008).

O CREB suprarregulado pode ativar alvos como o BDNF após tratamento com antidepressivos (NIBUYA et al., 1996). O tratamento com fluoxetina e olanzapina, combinadas, em ratos elevou os níveis de BDNF e CREB (RÉUS et al., 2012). No entanto, a administração de fluoxetina isolada na dose de 12,5mg/Kg promoveu um maior aumento do BDNF (RÉUS et al., 2012). Em contraste, Shishkina et al. (2012) demonstraram que os níveis de BDNF e proteínas pró-apoptóticas (por exemplo, BAX) não foram modificados nem pela administração de fluoxetina nem pelo estresse. Porém, elevados níveis de BDNF foram encontrados no giro denteado do hipocampo quando combinado o tratamento com fluoxetina e ketanserina (antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}) (PILAR-CUÉLLAR et al., 2012). Estes autores sugerem que o efeito da fluoxetina no BDNF está relacionado com o tipo de tratamento, com o protocolo de administração da droga e com a área cerebral. Em seus estudos, Réus et al. (2012), também demonstraram que os efeitos da fluoxetina são dose e área cerebral dependentes. Estes autores explicam este efeito dependente pelo fato do cérebro possuir regiões não similares e diferentes áreas cerebrais podem apresentar, por exemplo, diferentes proteínas e diferente metabolismo celular.

Ação Anti-Oxidante

O tecido nervoso central apresenta uma elevada percentagem de fosfolípidios, como o ácido araquidônico (AA), ácido docosahexaenóico (DHA), o fosfato inositol e diacilglicerol, que podem ser facilmente peroxidados, gerando consequentemente espécies reativas do oxigênio (EROs). Estes fosfolípidios são gerados como segundos mensageiros por neurotransmissores (por exemplo, dopamina, serotonina, glutamato, acetilcolina) normalmente envolvidos na etiopatogenia de doenças do sistema nervoso central (MAHADIK; EVANS, 2003).

Os radicais livres são espécies muito reativas que apresentam um elétron não pareado. Este grande grupo de moléculas é representado principalmente pelo

radical superóxido ($O_2\bullet$), radical peroxil ($ROO\bullet$), radical hidroxila ($OH\bullet$) e óxido nítrico ($NO\bullet$). Todas estas moléculas e seus derivados, tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou ácido hipocloroso ($HOCl$), são referidos como EROs (DRÖGE, 2002; VALKO et al., 2007). A superprodução de EROs resulta em um desequilíbrio de processos pró e anti-oxidante, o que cria um fenómeno conhecido como estresse oxidativo. O estresse oxidativo é nocivo para os lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e outras estruturas celulares e, conseqüentemente, altera o metabolismo celular normal e pode até causar a morte celular. O processo de peroxidação lipídica, que também resulta na produção de radicais livres, é o mais conhecido dos danos causados pelo estresse oxidativo (HWANG; KIM, 2007). O Malondialdeído (MDA) é o produto mais bem estudado da peroxidação lipídica. Este aldeído é uma molécula altamente tóxica que interage com o DNA e proteínas e, é muitas vezes, referido como mutagênica. Alguns estudos, avaliando a peroxidação lipídica em pacientes deprimidos, descreveram aumento dos níveis de MDA e de outros produtos de peroxidação lipídica (TSUBOI et al., 2006; GALECKI et al., 2007; SARANDOL et al., 2007).

Diversos processos bioquímicos podem elevar o número de EROs, caracterizando algumas patologias do SNC, como a depressão. Um desses processos é o aumento da transdução glutaminérgica e a elevação da concentração de glutamato a níveis tóxicos (LEE; WO; SAPOLSKY, 2002). A ativação prolongada de neurônios por glutamato pode ser prejudicial devido à produção resultante de EROs (HENDRIKS et al., 2005).

Alguns estudos com seres humanos depressivos mostram que tais pacientes apresentam elevados índices de substâncias pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; RAISON; CAPURON; MILLER, 2006). Estas citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-1, aumentam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, elevando o índice de radicais livres (LEE; WO; SAPOLSKY, 2002). O estado depressivo estimula a células imunológicas como os neutrófilos, macrófagos, monócitos, astrócitos e micróglias (RAISON; CAPURON; MILLER, 2006). Estas células interagem com as citocinas pró-inflamatórias, resultando na produção de radicais livres (GUZIK et al., 2003). Com base nos componentes inflamatórios envolvidos na etiologia da depressão, pesquisadores têm

sugerido que drogas antidepressivas funcionam no nível de citocinas pró-inflamatórias (BRUSTOILIM et al., 2006).

Existe pouca informação sobre a influência da fluoxetina sobre as enzimas antioxidantes. Enquanto alguns relatos sugerem que fluoxetina restaura a capacidade antioxidante em cérebro de ratos, assim como no fígado (ZAFIR; BANU, 2007; BILICI et al., 2001), outros afirmam que a terapia não altera significativamente estes parâmetros em pacientes portadores de depressão (GALECKI et al., 2009).

O sistema primário de defesa antioxidante, envolve efeitos coordenados de algumas enzimas como a SOD, catalase (CAT), a GPx e GR, que tem consistentemente sido estudado em portadores de depressão (NG et al., 2008). Moretti et al. (2012), utilizando camundongos submetidos ao estresse, demonstraram haver uma diminuição dos níveis da atividade da CAT e da GR, principalmente no hipocampo desses animais, e também da GR no córtex cerebral, indicando uma alteração no sistema de defesa antioxidante do sistema nervoso desses animais. Uma diminuição da atividade da CAT é associada com uma grande quantidade de H_2O_2 disponível para reagir com os metais de transição e gerar o radical hidroxila (o radical mais nocivo), resultando em aumento da peroxidação lipídica e, como consequência, dano neuronal (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999). Desde que glutathione representa a principal molécula antioxidante não-proteica e o principal regulador redox, protegendo o sistema nervoso contra as EROs (MEISTER; ANDERSON, 1983), reduções nos níveis de glutathione e da atividade da GR reforçam a idéia que o estresse induz ao aumento de danos oxidativos no cérebro de ratos. Baseado nestas evidências, Moretti et al. (2012) supõem que o significativo dano oxidativo observado em seus estudos, foi evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica no hipocampo e no córtex cerebral, resultante da diminuição das atividades da CAT (hipocampo e córtex cerebral), GR (hipocampo), bem como dos níveis de glutathione (córtex cerebral). Estes mesmos autores, utilizando como tratamento tanto o ácido ascórbico como a fluoxetina, demonstraram uma prevenção contra o estresse induzido, sugerindo uma diminuição da peroxidação lipídica hipocampal, principalmente por evitar uma diminuição da atividade da CAT. Estes achados são provas consistentes dos efeitos antioxidantes de antidepressivos, uma vez que danos avaliados no plasma, soro e células sanguíneas foram revertidos após o tratamento com antidepressivos clássicos como a fluoxetina, sugerindo que as propriedades antioxidantes destes medicamentos podem contribuir para a

melhora dos efeitos clínicos (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003; HERKEN et al., 2007).

Estímulos adversos como o estresse e a ansiedade podem induzir ao estresse oxidativo periférico, aumentando a produção de EROs em linfócitos sanguíneos, granulócitos e monócitos (RAMMAL et al., 2008). Novío et al. (2011), utilizando camundongos induzidos ao estresse e tratados com fluoxetina, verificaram uma melhora parcial dos efeitos adversos causados pelo estresse induzido. Esta melhora está associada com a função restauradora da fluoxetina de componentes endógenos de defesa antioxidante (SOD, CAT e a diaforase) e também com a restauração e componentes antioxidantes não enzimáticos como a glutathione, mostrando que a fluoxetina é capaz de aliviar os danos oxidativos produzidos pelo estresse no sistema imunológico periférico.

O balanço oxidantes / antioxidantes é um determinante importante da função imunológica celular (MEYDANI et al., 1995). A diminuição do status antioxidante favorece a acumulação de radicais livres que conduzem ao estresse oxidativo e possível apoptose de células imunológicas como neutrófilos e eosinófilos (HALLIWELL, 2006) que podem ser prevenidos pela CAT e glutathione. Levando-se em conta o papel fundamental das células imunológicas na proteção do organismo, estes resultados apoiam a teoria de que animais estressados estão predispostos a recorrentes infecções e inflamação crônicas, além de outras patologias (RAHMAN; MACNEE, 2000; KOWALSKA et al., 2003).

Novío et al. (2011) observaram que a fluoxetina, por si só, não promoveu alteração no status antioxidante dos animais não estressados, significando que a fluoxetina pode não modificar o status de defesa antioxidante na ausência de condições de estresse oxidativo. Este achado sugere que a fluoxetina possui efeito antioxidante apenas contra condições de danos oxidativos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA

Foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, adultos jovens com 60 dias, provenientes do Biotério de criação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade controladas sob regime de iluminação cíclica (12h escuro, 12h claro) com intensidade de luz $\leq 100\text{LUX}$, com livre acesso à ração e água filtrada, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE), o qual aprovou a realização do projeto sob o protocolo de número 054/2014 (Anexo 1) e com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology).

4.2. DESENHO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi dividido em dois experimentos denominados de experimento Prevenção e experimento Regeneração. O experimento Prevenção foi composto por 3 grupos: Grupo Controle Pré (GCP), que não foi submetido a nenhuma intervenção; Grupo Foto Pré (GFotoP), submetido à foto-exposição (3000 LUX), sem tratamento algum; e o Grupo Fluoxetina Preventivo (GFP), tratado com fluoxetina na dose de 10mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, por 07 dias, antes de ser submetido à foto-exposição. Os grupos GCP e GFotoP, apenas receberam doses de NaCl a 0,9%, sendo 1ml/100g de peso corporal, via intraperitoneal, também por 07 dias, para simulação do estresse semelhante ao grupo experimental GFP. Todos os grupos foram compostos por 05 animais, mantidos em gaiolas, com no máximo 05 animais/gaiola. Os animais foram

eutanasiados 07 dias após a fotoexposição. Em todos os grupos, os tratamentos iniciaram sempre no mesmo horário.

No experimento Regeneração os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: GC (Grupo Controle Regeneração) (os animais deste grupo não foram submetidos ao estresse da foto-exposição; apenas receberam doses de NaCl a 0,9%, sendo 1ml/100g de peso corporal, via intraperitoneal), GFoto (submetidos à fotoexposição e, também, apenas receberam doses de NaCl a 0,9%, sendo 1ml/100g de peso corporal, via intraperitoneal), GF 7 (submetido à fotoexposição e tratados com fluoxetina por 07 dias consecutivos), GF 14 (submetido à fotoexposição e tratados com fluoxetina por 14 dias consecutivos), GF 21 (submetido à fotoexposição e tratados com fluoxetina por 21 dias consecutivos), GF 30 (submetido à fotoexposição e tratados com fluoxetina por 30 dias consecutivos). Os animais dos grupos GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30 receberam doses de fluoxetina, sendo 10mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal. Todos os grupos experimentais foram compostos por 05 animais, mantidos em gaiolas com, no máximo, 05 animais/gaiola. Em todos os grupos, os tratamentos iniciaram sempre no mesmo horário (às 12hs). Todos os animais foram eutanasiados aos 90 dias de vida.

4.3. EXPOSIÇÃO À LUZ

Inicialmente, os animais foram submetidos a uma adaptação ao escuro por 24 horas em gaiolas individualizadas no interior da câmara de fotoexposição com manutenção da temperatura média de 22 ± 2 °C e com livre acesso à ração e água filtrada. Em seguida, os animais foram submetidos a uma exposição de 3000 LUX de luz branca, durante 12 horas, iniciando-se às 6:00h (MONTALBÁN-SOLER et al., 2012). A câmara de fotoexposição é composta de madeira, dotada de duas lâmpadas fluorescentes de 40W, com paredes internas brancas e sistema de ventilação adequado (Figura 9). A quantidade de luz usada neste experimento foi aferida com o auxílio de um luxímetro digital (Instrutherm LD-240) (Figura 10). Após este período de fotoexposição, os animais retornaram ao Biotério de criação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de

Pernambuco e foram mantidos, novamente, no regime de iluminação cíclica (12 h escuro, 12 h claro) de baixa intensidade.



Figura 9. Câmara de Fotoexposição.



Figura 10. Luxímetro digital (Instrutherm LD-240).

4.4. ELETORRETINOGRAMA

A função da retina foi avaliada por meio do eletrorretinograma (ERG), segundo o protocolo modificado de Montalbán-Soler et al. (2012). Os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina (60mg/kg) e Xilazina (20mg/kg), de forma intraperitoneal. Em seguida, foram adaptados ao escuro por 30 minutos e sua manipulação foi realizada sob iluminação de luz vermelha. Suas pupilas esquerdas

foram dilatadas com a aplicação tópica de Tropicamida 1%. Os animais foram posicionados sobre uma almofada aquecida a 37 °C, para a manutenção da temperatura corporal. Para a emissão dos estímulos luminosos foi utilizado um diodo emissor de *flashes* luminosos posicionados a 1cm do olhos esquerdo dos animais. A intensidade da luz foi calibrada por um dispositivo gerador de duplo de biosinais especificamente adaptados para as respostas ao ERG. Os sinais eletrorretinográficos foram adquiridos através de um eletrodo de fibra DTL posicionado na córnea dos animais. Um eletrodo de referência foi colocado, aproximadamente, a 3cm da comissura palpebral lateral, ipsilateral e um eletrodo terra posicionado na cauda (Figura 11A).

Os sinais elétricos gerados na retina foram amplificados ($\times 1000$) e filtrados (filtro passa-banda de 1Hz a 1000Hz) com o auxílio do sistema Nihon Kohdem, Neuropack 2. MEB-7102A/k. (Figura 11B). Os registros gravados foram digitalizados e exibidos através de um computador convencional. Os estímulos luminosos foram calibrados sempre antes de cada experimento para assegurar a que o mesmos estímulos estivesse sendo aplicado nos diferentes animais.

A retina foi estimulada utilizando diferentes intensidades a depender do tipo de ERG. Para os exames do tipo escotópico foi utilizada a intensidade de 0,01 cd.s/m², com frequência de 0,2 Hz para 2 *flashes* para a avaliação da função dos bastonetes; para o ERG escotópico misto foi utilizada uma intensidade de 3 cd.s/m², com uma frequência de 0,1 Hz para 2 *flashes*. Com relação ao ERG fotópico foi utilizada uma intensidade de 3 cd.s/m², uma frequência de 2 Hz para 5 *flashes* para a avaliação da função dos cones; e para o Flicker, uma intensidade, também, de 3 cd.s/m², sendo uma frequência de 30 Hz, para 20 *flashes*.

A amplitude das ondas *a* e *b* do ERG foram mensuradas de forma convencional. A amplitude da onda *a* foi mensurada como a diferença de voltagem entre a média dos 10 μ s de estímulos basais registrados antes dos *flashes* e a calha da onda *a*. A onda *b* foi mensurada como a diferença de voltagem entre o pico da onda *b* e a calha da onda *a*.

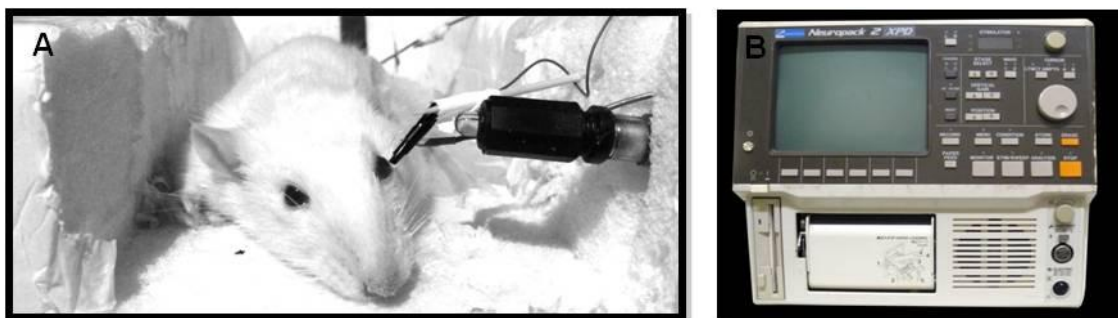


Figura 11. Exame de Eletrorretinografia. **A** – Posicionamento do animal, dos eletrodos e do diodo emissor do *flash* de luz. **B** – Sistema de captura dos sinais elétricos - Nihon Kohden, Neuropack 2. MEB-7102A/k.

4.5. EUTANÁSIA, COLETA DO MATERIAL E HISTOMETRIA

Após o exame de eletrorretinografia, os animais foram submetidos à eutanásia, os quais foram previamente anestesiados com Cloridrato de Quetamina (60mg/Kg) e Xilazina (20mg/Kg). Em seguida, foi administrada uma sobredose de pentobarbital sódico, de forma intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada a toracotomia dos animais e evidenciado o ventrículo esquerdo dos mesmos para a realização da perfusão com solução de cloreto de sódio a 0,9% e, em seguida, com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a perfusão, os olhos esquerdos foram enucleados e imersos no paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 48 horas. Após este período, o material foi desidratado em álcool etílico, diafanizado em butanol e embebido e incluído em Paraplast (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich).

Os blocos de paraplast foram cortados em micrótomo tipo minot (Leica) ajustado para 5µm de espessura. Em seguida, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro devidamente identificadas. Os cortes foram processados para coloração por Hematoxilina e Eosina e, em seguida, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan® e cobertas com lamínulas de vidro para posterior observação em microscópio de luz. Para a histometria, os cortes foram fotografados com o auxílio do sistema de captura de imagens LAEZ (Leica), constituído pelo microscópio óptico (Leica -DM-500) com uma câmera fotográfica acoplada (Leica -HD-5501). Em seguida, a espessura total bem como a espessura da camada nuclear externa foram mensuradas com o auxílio do software *ImageJ® for Windows*.

Foram realizadas 08 mensurações por lâmina, sendo 04 na porção superior ao disco óptico (retina superior ou dorsal) e 04 na região inferior ao disco óptico (retina inferior ou ventral), distanciando entre as mensurações e a partir do disco óptico 200 μm (figura 12).

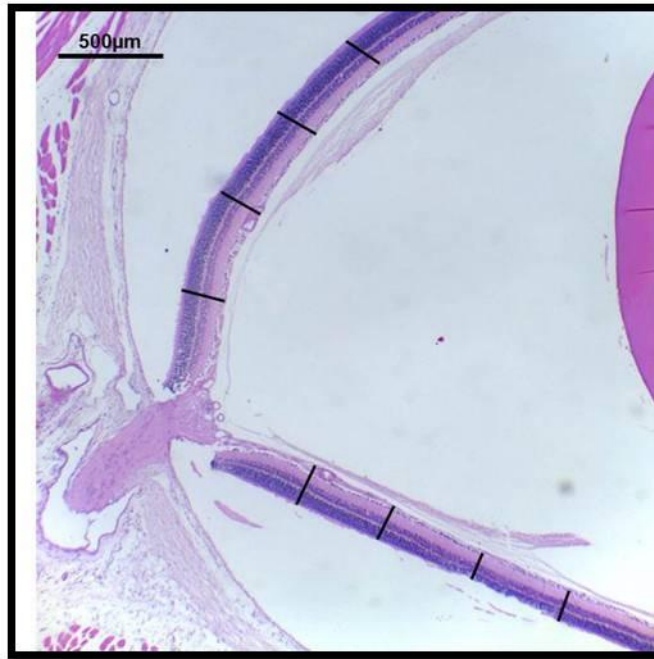


Figura 12. Fotomicrografia da retina de ratos, ilustrando as mensurações da espessura total da retina, da CNE e da CNI na retina superior e na retina inferior com o auxílio do software *ImageJ® for Windows*.

4.6. PROCEDIMENTO TUNEL (TDT-MEDIATED DUTP NICK-END LABELING)

Após serem diafanizados em Xilol, os cortes foram re-hidratados e submetidos ao procedimento TUNEL, utilizando o Kit Apoptag® Red *in Situ* (Merk Millipore) de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, os cortes foram imersos em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em Tampão Fosfato Salino (PBS 0.01M, pH 7,4) por 15 minutos e incubados em uma solução contendo deoxinucleotidil transferase (TdT), e nucleotídeos, por 60 minutos a 37°C. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à rodoamina. Posteriormente, foi contra-corado com o DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole) e montado entre lâmina e lamínulas com o auxílio

do meio de montagem anti-fading. Com o auxílio do microscópio de epifluorescência AxioPlan (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), os cortes foram fotomicrografados com a objetiva de 40x, utilizando o filtro de excitação G 365 nm e de emissão LP 420 nm. Os núcleos em apoptose emitem um cor vermelho (púrpura) e os núcleos com seu DNA íntegro emitem uma coloração azul.

Foi realizada uma contagem das células em apoptose, utilizando 15 campos por lâmina de cada animal. Em seguida, as médias de cada animal por grupo foram comparadas entre si.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização dos exames de eletrorretinograma, da histometria e da contagem dos núcleos em apoptose, com o auxílio do software GraphPad Prism versão 5 for Windows, os valores médios foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Constatado a normalidade dos dados, estes foram analisados com o Teste ANOVA one-way e, em seguida, pelo teste de Tukey. Para todos os valores foi aceito um nível de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. HISTOLOGIA E ESPESSURA DAS CAMADAS DA RETINA

O presente trabalho demonstrou, histologicamente, uma maior redução da espessura da CNE, assim como, uma maior degeneração e desorganização do segmento externo dos fotorreceptores nos grupos GFotoP e GFoto. As Lâminas histológicas dos animais destes grupos apresentaram uma maior vacuolização na matriz intercelular e perda da morfologia alongada e fusiforme dos segmentos externos dos fotorreceptores. Os animais do GFoto ainda apresentaram uma ausência do segmento interno dos fotorreceptores.

A administração da fluoxetina tanto de forma prévia como posterior à fotoexposição, promoveu uma manutenção da espessura da CNE, com atenuação da perda dos núcleos dos fotorreceptores bem como protegeu os segmentos interno e externo destas células, mantendo sua estrutura celular (morfologia alongada e fusiforme) de forma mais íntegra. Esta melhora, advinda da administração da fluoxetina posterior à fotoexposição, foi progressiva nos grupos GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30, demonstrando que a administração deste medicamento, de forma mais prolongada, promoveu um maior efeito neuroprotetor contra a fotodegeneração (figuras 13 e 14).

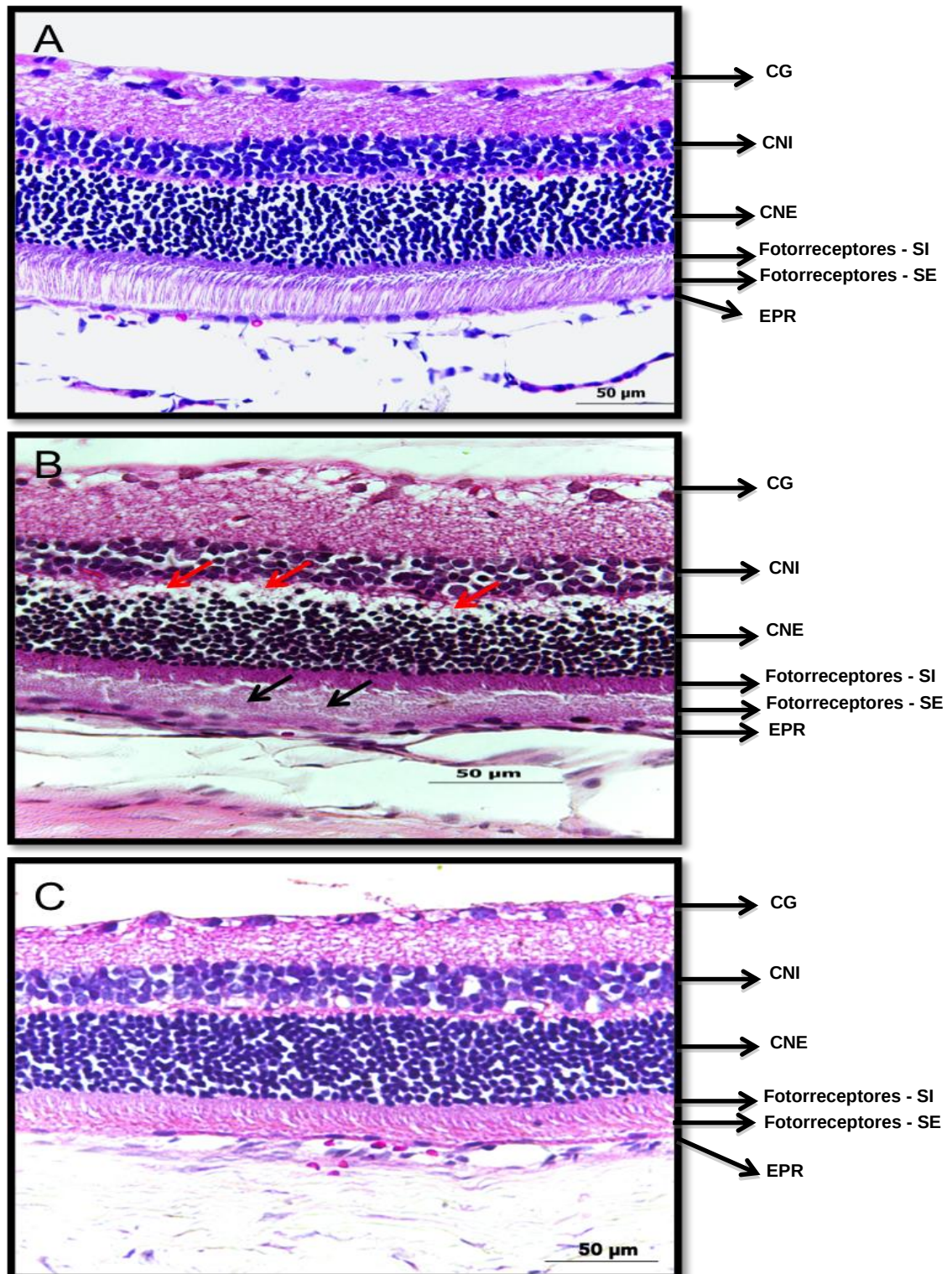


Figura 13. Fotomicrografias da retina de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. A – GCP. B – GFotoP. Observar os danos retinianos como: redução da espessura com perda de núcleos dos fotorreceptores na CNE (setas vermelhas) e desorganização e degeneração do segmento externo dos fotorreceptores (setas pretas) com a presença de vacúolos e perda da morfologia alongada e fusiforme. C – GFP. Apresenta uma preservação da espessura da CNE e uma melhor manutenção do formato alongado e fusiforme dos segmentos externos dos fotorreceptores. CG – Camada de Células Ganglionares. CNI – Camada Nuclear Interna. CNE – Camada Nuclear Externa. Fotorreceptores – Camada contendo os segmentos externos e internos dos fotorreceptores. EPR – Epitélio Pigmentar da Retina. Coloração H.E.

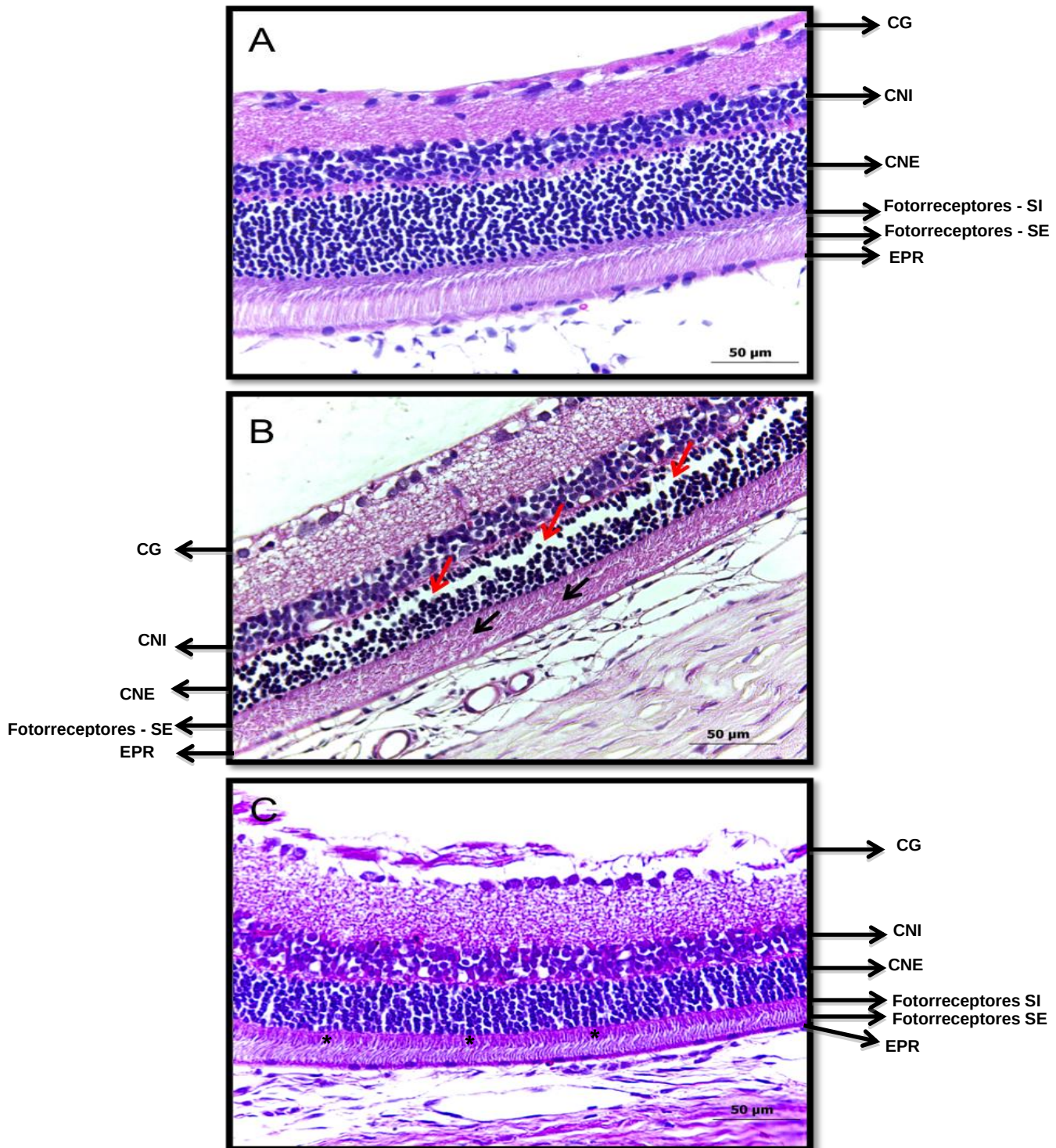


Figura 14. Fotomicrografias da retina de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. A – GC. B – GFoto. Observar a redução da espessura com perda de núcleos dos fotorreceptores na CNE (setas vermelhas) e desorganização e degeneração do segmento externo dos fotorreceptores (setas pretas) com a presença de vacúolos e perda da morfologia alongada e fusiforme. Observar também o desaparecimento do segmento interno dos fotorreceptores. C – GF 30. Apresenta uma manutenção da espessura da CNE e uma melhor preservação do formato alongado e fusiforme dos segmentos externos dos fotorreceptores. Observar também a preservação do segmento interno dos fotorreceptores (asteriscos). CG – Camada de Células Ganglionares. CNI – Camada Nuclear Interna. CNE – Camada Nuclear Externa. Fotorreceptores-SI – Segmento Interno. Fotorreceptores-SE – Segmento Externo. CG - Camada contendo os segmentos externos e internos dos fotorreceptores. EPR – Epitélio Pigmentar da Retina. Coloração H.E.

Em relação ao experimento Prevenção, conforme demonstra a figura 15, os valores mensurados da espessura total da retina, bem como, da camada nuclear externa, apresentaram diferenças significativas entre os Grupos, mostrando um maior valor para a medida da espessura do GFP.

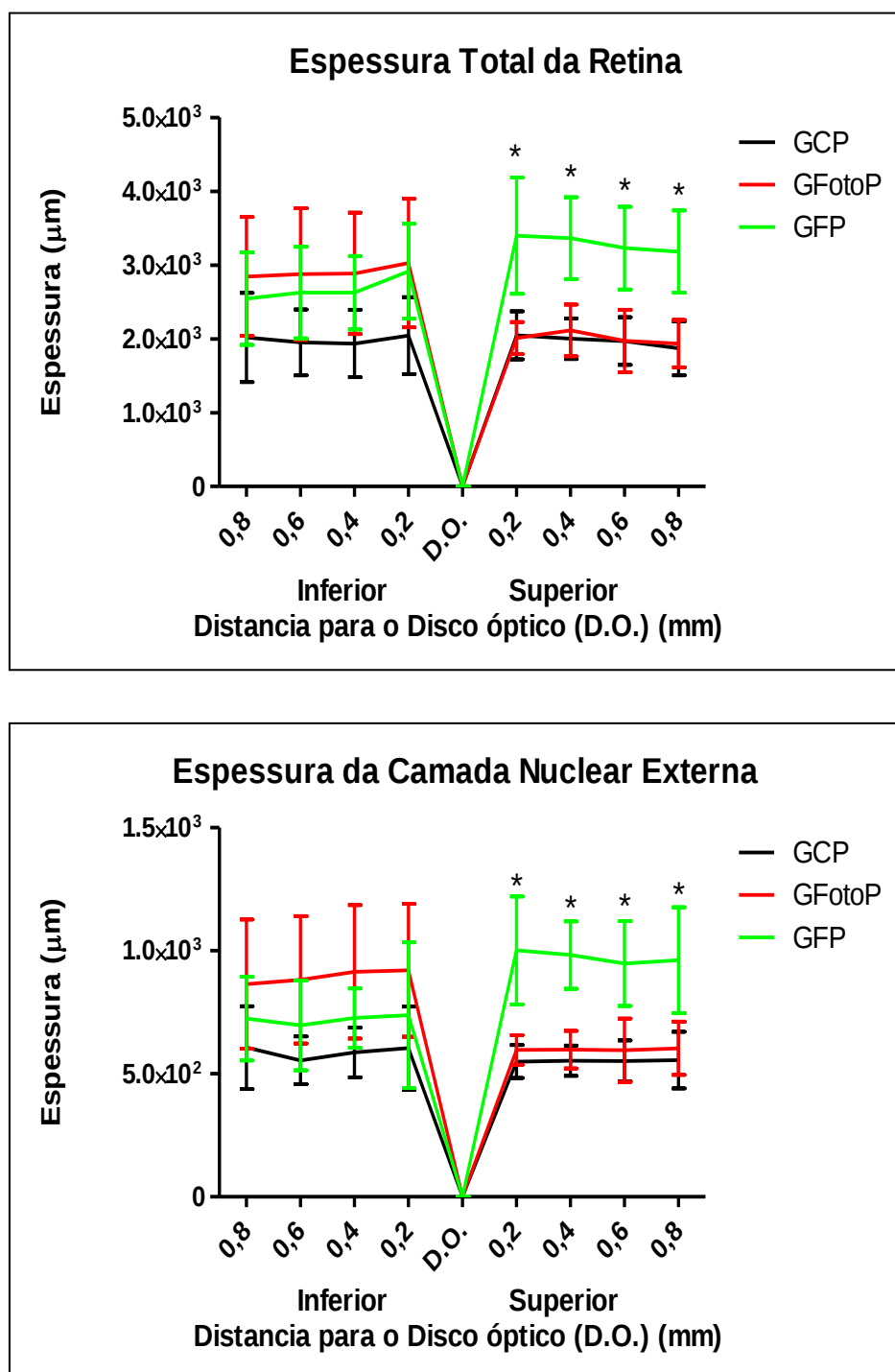


Figura 15. Espessura total da retina e da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. Observar o aumento da espessura nos animais do GFP. * $p < 0,05$ entre os GFotoP e GFP.

Em relação ao experimento Regeneração, a figura 16 demonstra que o GF 30 apresentou valores maiores para a espessura total da retina como também para a espessura da CNE quando comparados aos grupos GFoto, GF 7, GF 14 e GF 21, atingindo valores bem próximos do GC.

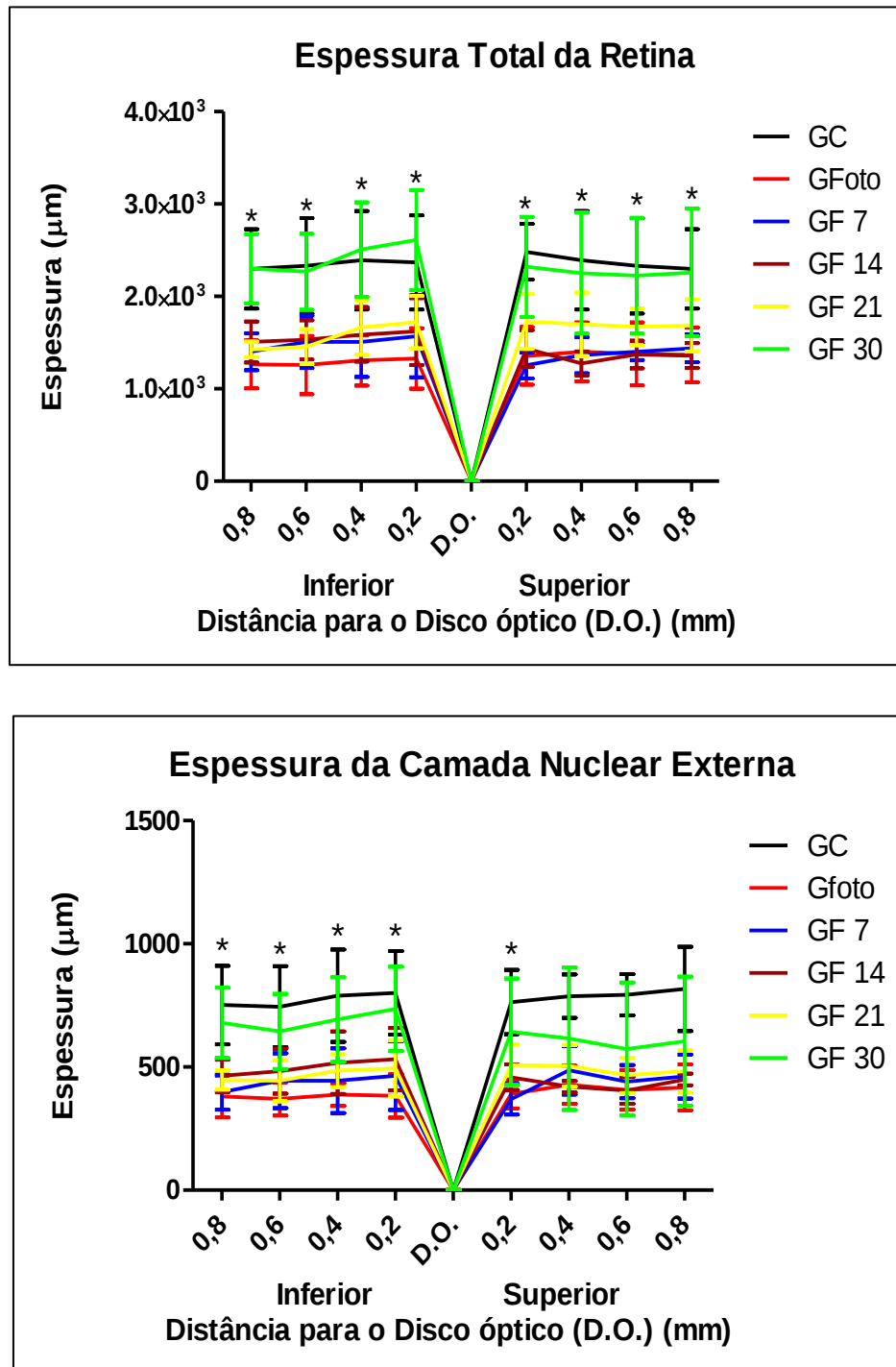


Figura 16. Espessura total da retina e da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. Observar o aumento da espessura dos animais submetidos ao tratamento com fluoxetina, em especial, dos animais do GF 30. * $p < 0,05$ entre os grupos GF 30 e GFoto.

5.2. APOPTOSE

Conforme se pode visualizar nas figuras 17, 18, 19 e 20, através do procedimento TUNEL, o presente trabalho demonstrou que a foto-exposição experimental induziu uma maior taxa de apoptose nos animais do GFotoP e GFoto. Com relação aos animais submetidos ao tratamento com fluoxetina, administrada tanto previamente como posteriormente à foto-exposição, esses animais apresentaram uma redução progressiva dos níveis de apoptose.

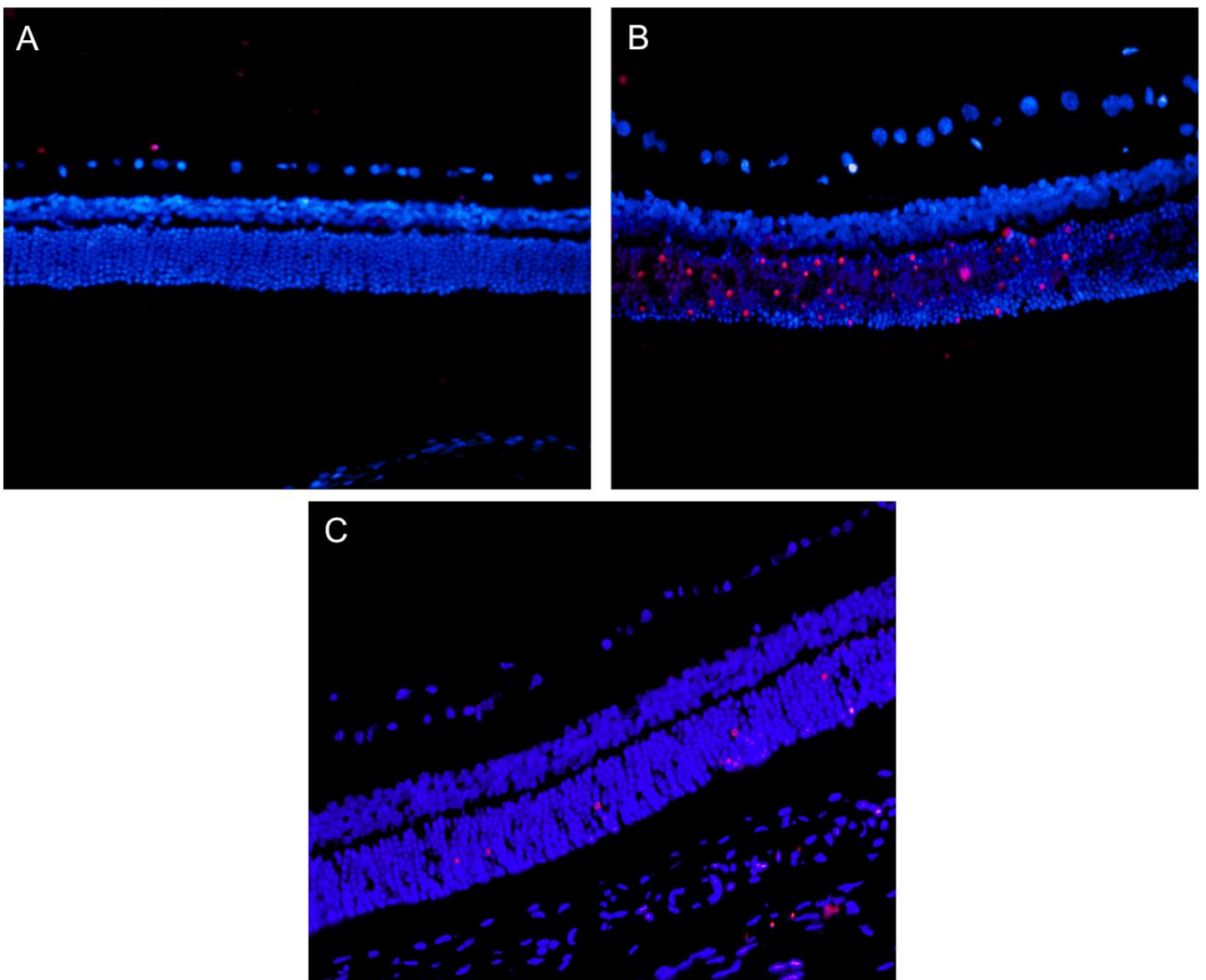


Figura 17. Fotomicrografias com fluorescência da retina de ratos submetidos à fotoexposição e à administração prévia da fluoxetina, demonstrando a marcação das células em apoptose pelo método TUNEL na cor vermelha. A – GC. B – GFotoP. C – GFP.

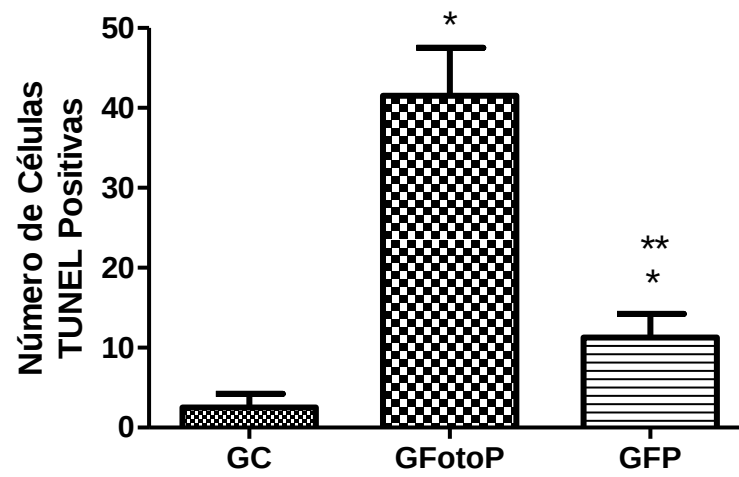


Figura 18. Número de células TUNEL positivas da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. * $p < 0.05$, GFotoP x GC e GFP x GC. ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP.

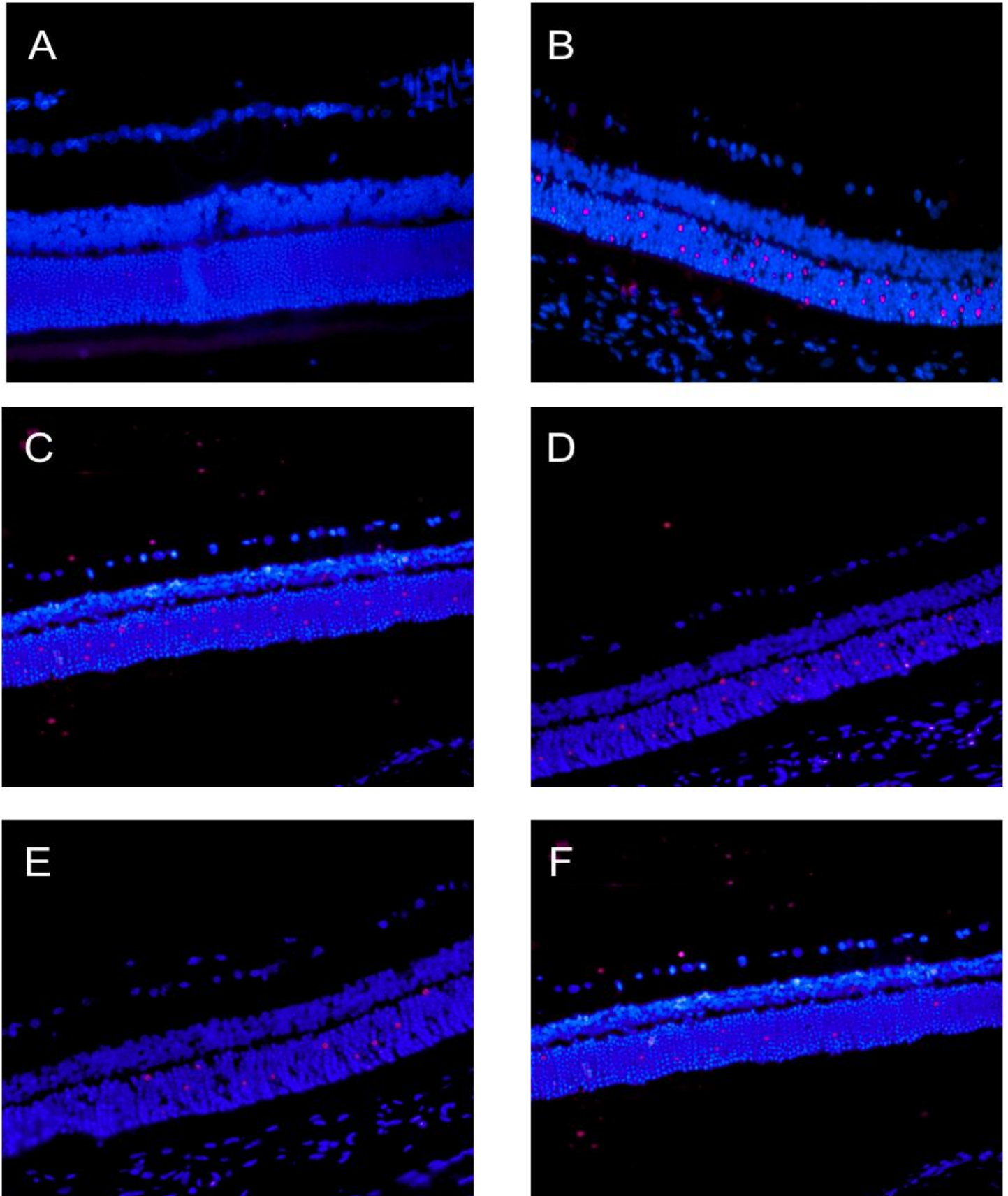


Figura 19. Fotomicrografias com fluorescência da retina de ratos submetidos à fotoexposição e à administração, posterior à foto-exposição, da fluoxetina, demonstrando a marcação das células em apoptose pelo método TUNEL na cor vermelha. A – GC, B – GFoto, C – GF 7, D – GF 14, E - GF 21, F – GF 30.

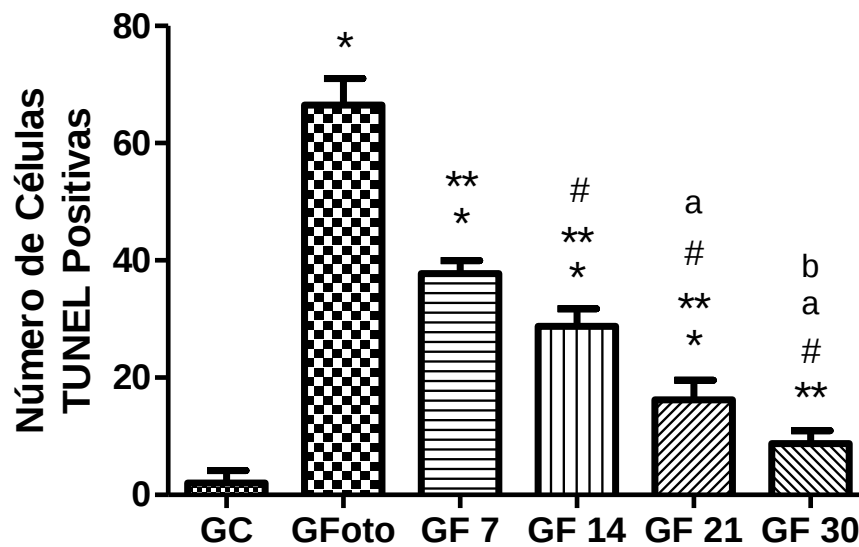


Figura 20. Número de células TUNEL positivas da camada nuclear externa de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior da fluoxetina. * $p < 0.05$, GFotoP x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC; ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto; # $p < 0,05$, GF 14 x GF 7, GF 21 x GF 7, GF 30 x GF 7; ^a $p < 0,05$, GF 21 x GF 14, GF 30 x GF 14; ^b $p < 0,05$, GF 30 x GF 21.

Ao se comparar o tratamento da administração prévia por 7 dias da fluoxetina e a administração 7 dias após a foto-exposição, pode-se perceber claramente uma proteção contra a apoptose dos fotorreceptores (figura 21).

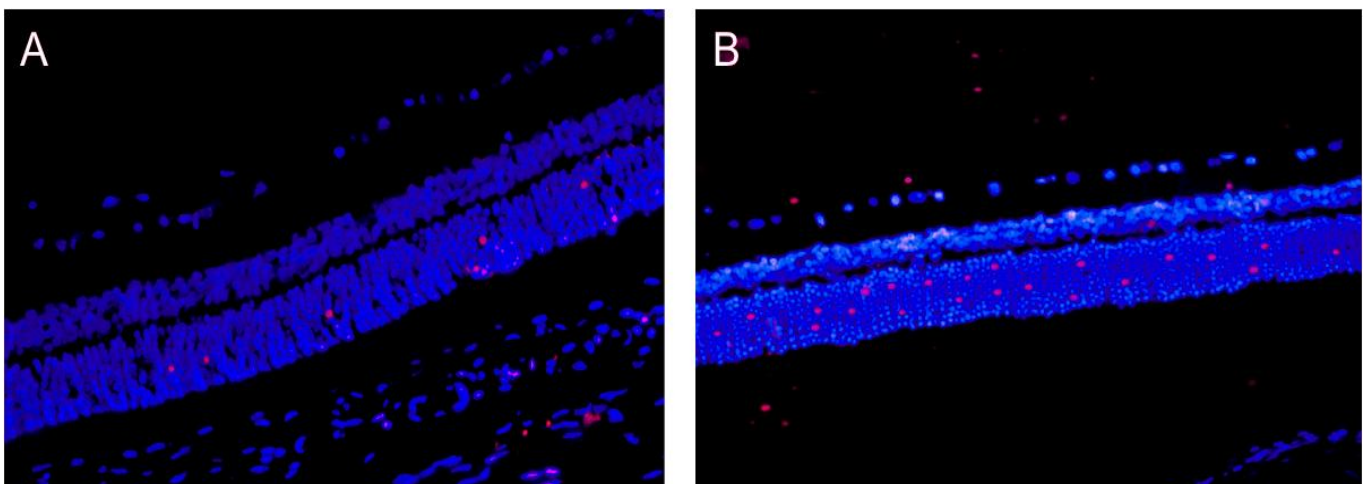


Figura 21. Fotomicrografias com fluorescência da retina de ratos submetidos à fotoexposição e à administração, da fluoxetina 7 dias antes da foto-exposição (A) e 7 dias após a foto-exposição (B), demonstrando a marcação das células em apoptose através do método TUNEL na cor vermelha.

5.3. ELETORRETINOGRAMA

Em relação ao experimento Prevenção, o exame de eletrorretinografia, em todas as suas formas (Escotópico, Fotópico, Misto e Flicker), demonstrou haver um menor tempo implícito (latência) na resposta das células da retina dos animais do GFP quando comparados ao GFotoP, inclusive, atingindo valores semelhantes ao GCP. Com relação à amplitude das ondas *a* e *b*, o ERG apresenta valores maiores para os animais do GFP em relação aos animais do GFotoP, sugerindo haver uma proteção da fluoxetina sobre as células da retina, quando administrada de forma prévia à foto-exposição (figuras 22, 23, 24, 25).

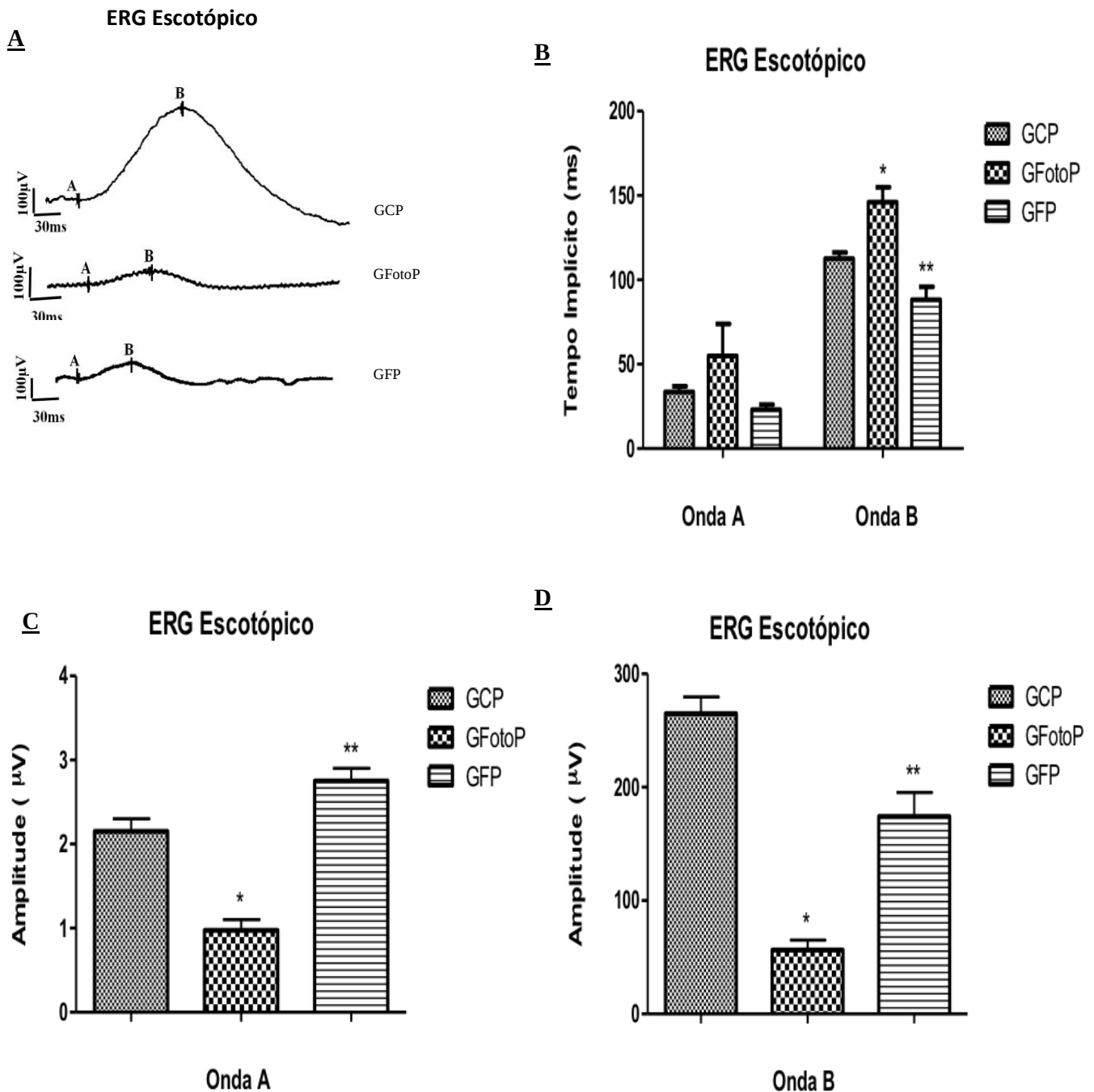


Figura 22. Eletroretinograma escotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletroretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP. **B** – Tempo implícito da resposta das células retiniana desde a emissão do flash de luz até o desencadeamento do potencial de ação. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da onda A, em μV . ** $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP.

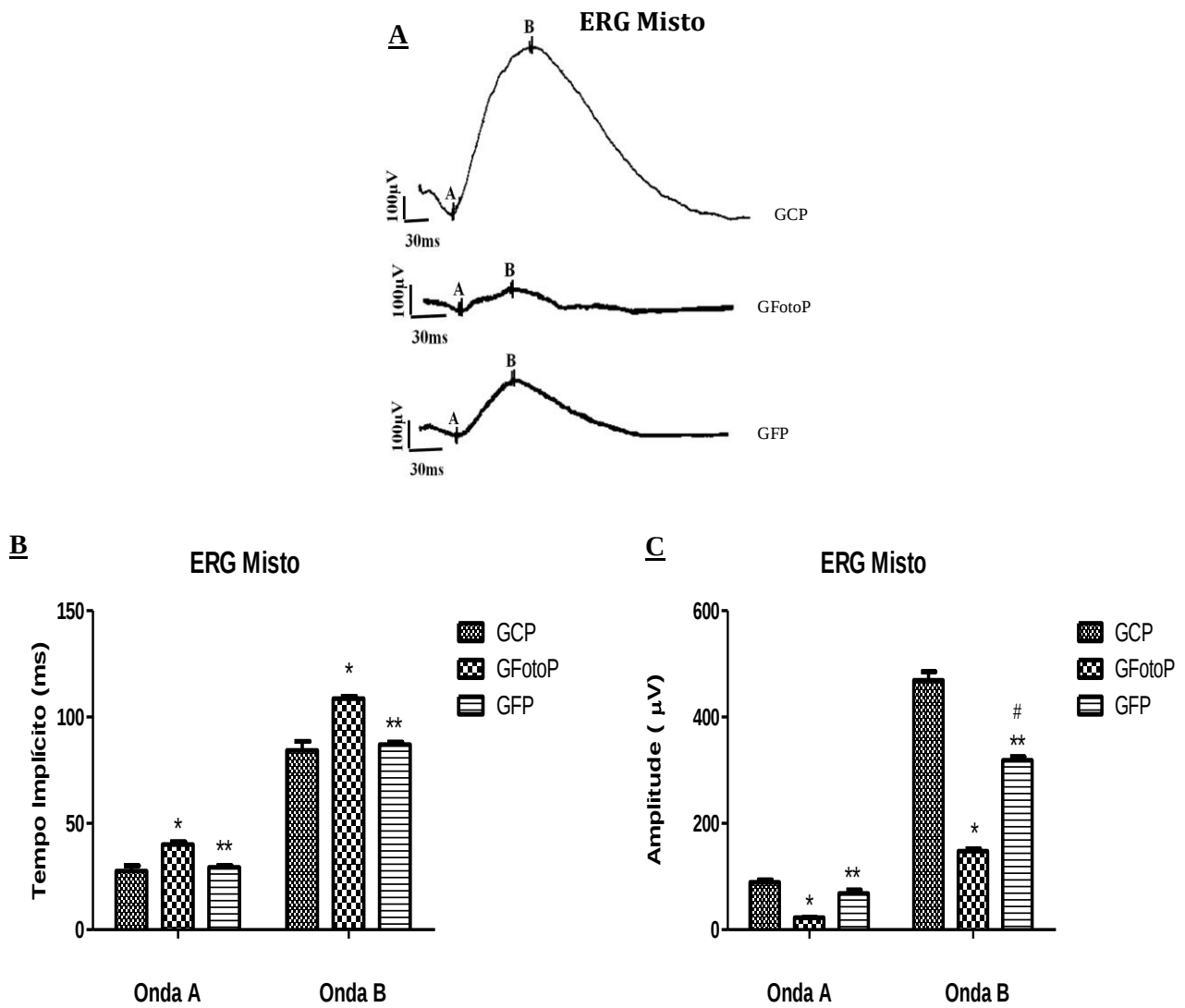


Figura 23. Eletrorretinograma escotópico misto de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP, aproximando-se do formato de onda adquirido dos animais do GCP. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da ondas A e B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP.; # $p < 0,05$, GFP x GCP.

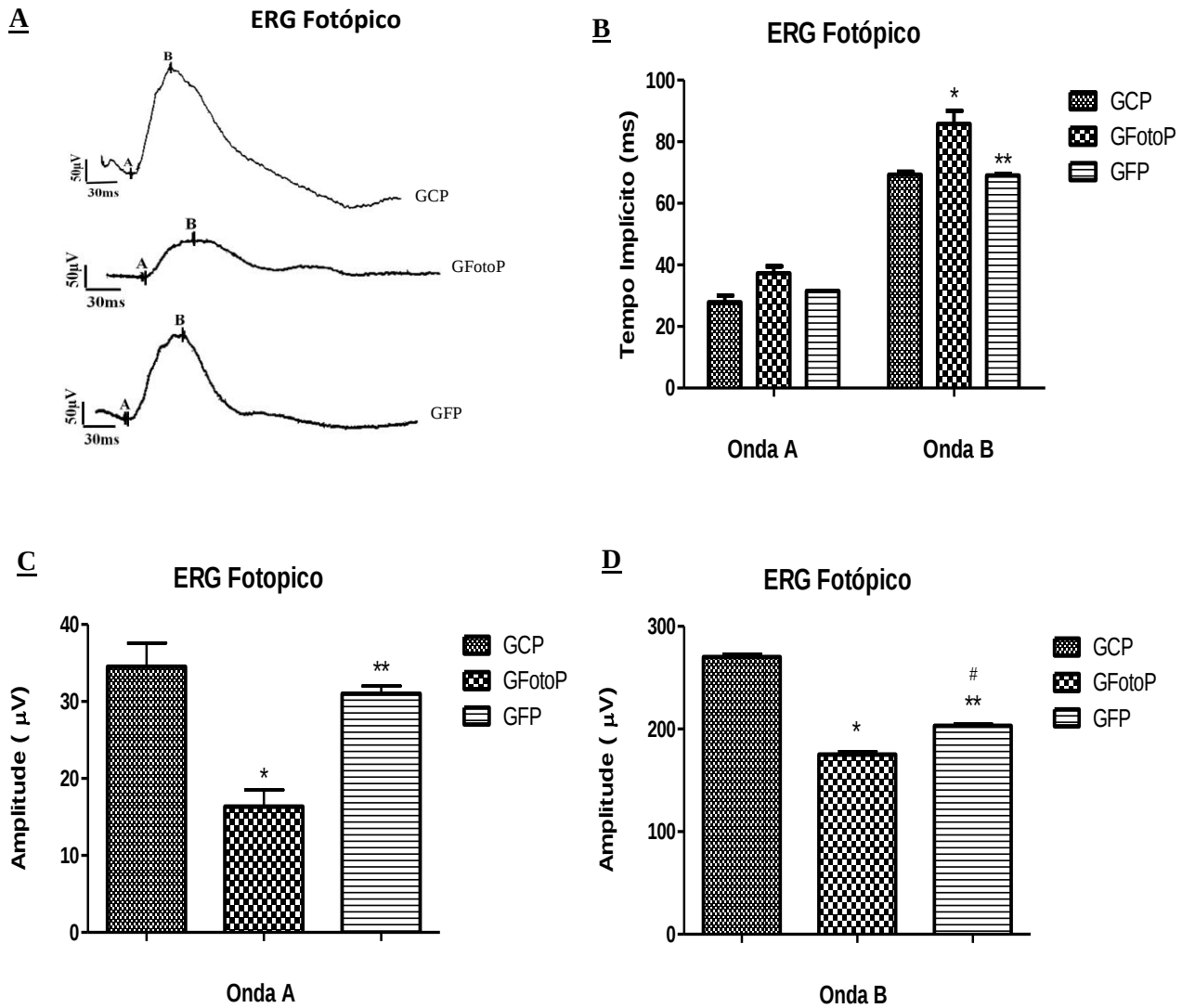


Figura 24. Eletrorretinograma fotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP, aproximando-se do formato de onda adquirido dos animais do GCP. **B** – Tempo implícito da resposta das células retiniana desde a emissão do flash de luz até o desencadeamento do potencial de ação. * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **C** – Amplitude da onda A, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP; # $p < 0,05$, GFP x GCP.

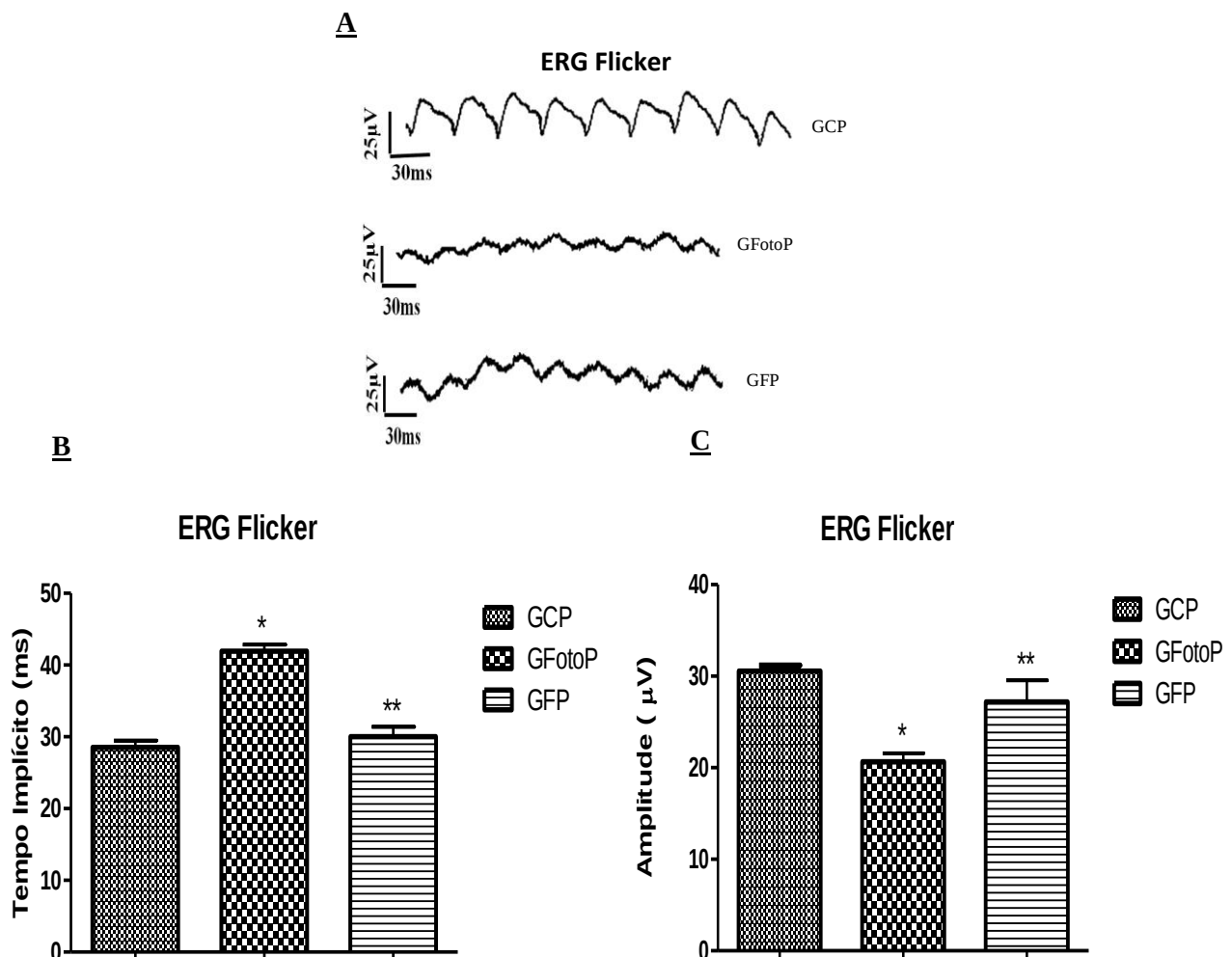


Figura 25. Eletroretinograma flicker de ratos submetidos à foto-exposição e à administração prévia da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletroretinograma dos grupos GCP, GFotoP e GFP. Observar uma melhora no formato da onda dos animais do GFP. **B** – Tempo Implícito do Flicker, em ms. **C** – Amplitude do Flicker, em μV . * $p < 0,05$, GFotoP x GCP; ** $p < 0,05$, GFP x GFotoP.

Com relação ao experimento regeneração, o ERG também demonstrou haver uma ação neuroregenerativa ou neuroprotetora da fluoxetina, visto um menor tempo implícito na resposta produzida pelos animais tratados, bem como uma maior amplitude das ondas a e b, em todas as formas do ERG, quando comparados com o GFoto. Salientamos também uma melhora significativa, ao ERG, dos animais do GF 30, demonstrando uma melhor ação da fluoxetina quando administrada por um período mais longo, de forma mais crônica (Figuras 26, 27, 28 e 29).

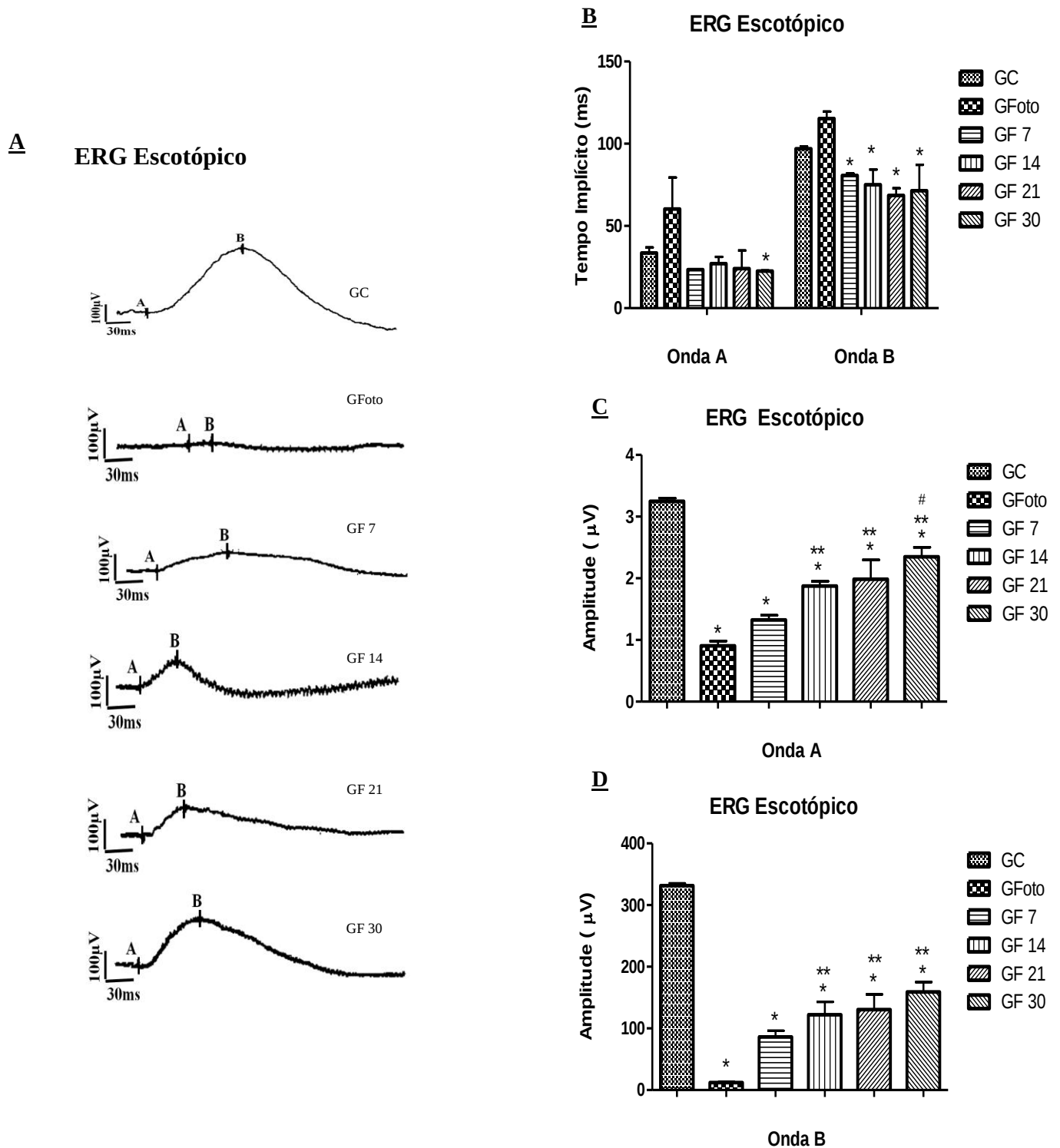


Figura 26. Eletrorretinograma escotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: * $p < 0,05$, GFoto x GF 30. Onda B: * $p < 0,05$, GFoto x GF 7; GFoto x GF 14; GFoto x GF 21; GFoto x GF 30. **C** – Amplitude da onda A, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. # $p < 0,05$, GF 30 x GF 7. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 30 x GFoto.

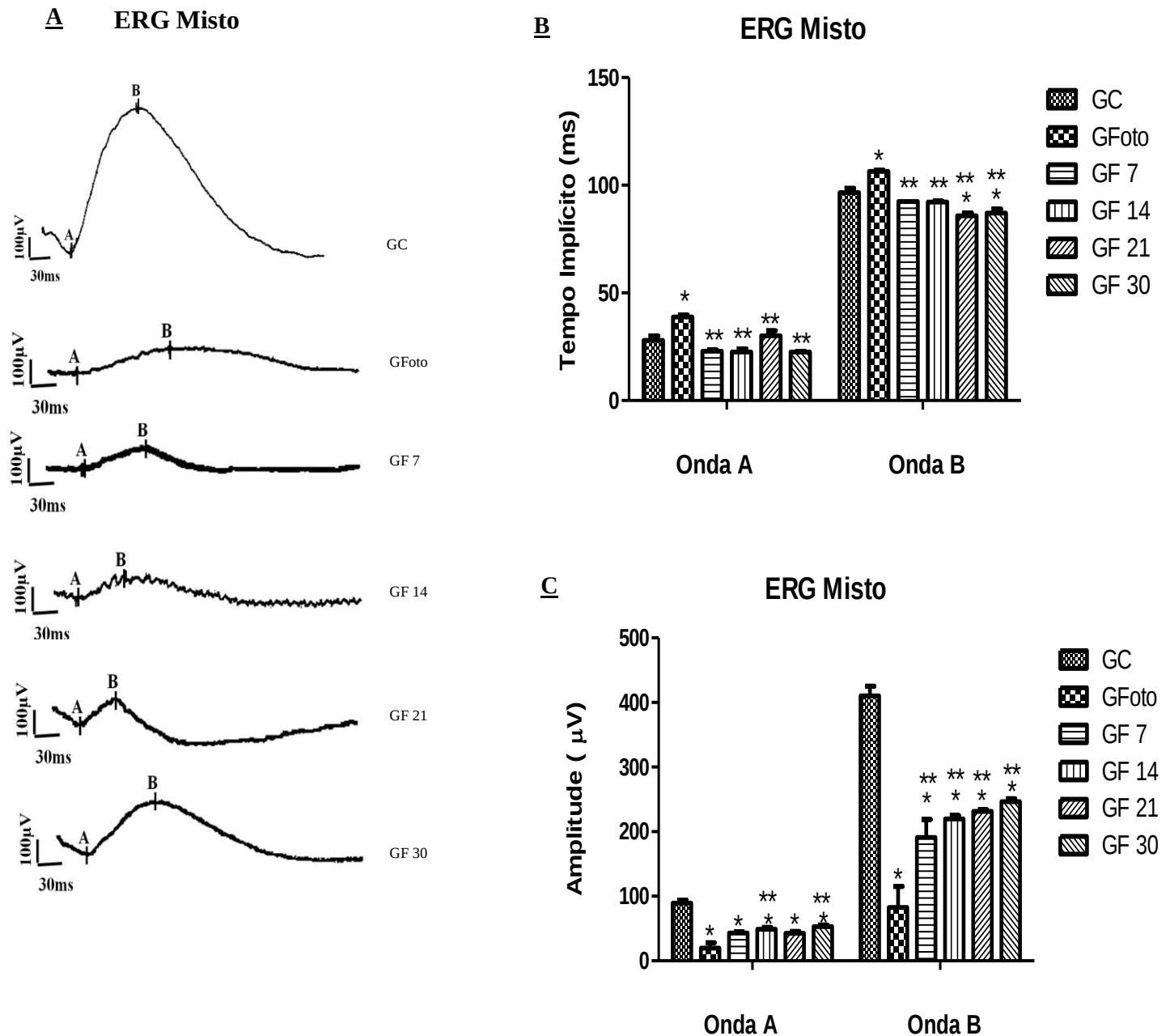


Figura 27. Eletrorretinograma escotópico misto de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: * $p < 0,05$, GFoto x GC. ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. Onda B: * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 21 x GC, GF 30 x GC. ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. **C** – Amplitude Onda A, em μV : * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC, GF 30 x GC. ** $p < 0,05$, GF 14 x GFoto, GF 30 x GFoto. Amplitude da Onda B, em μV : * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto.

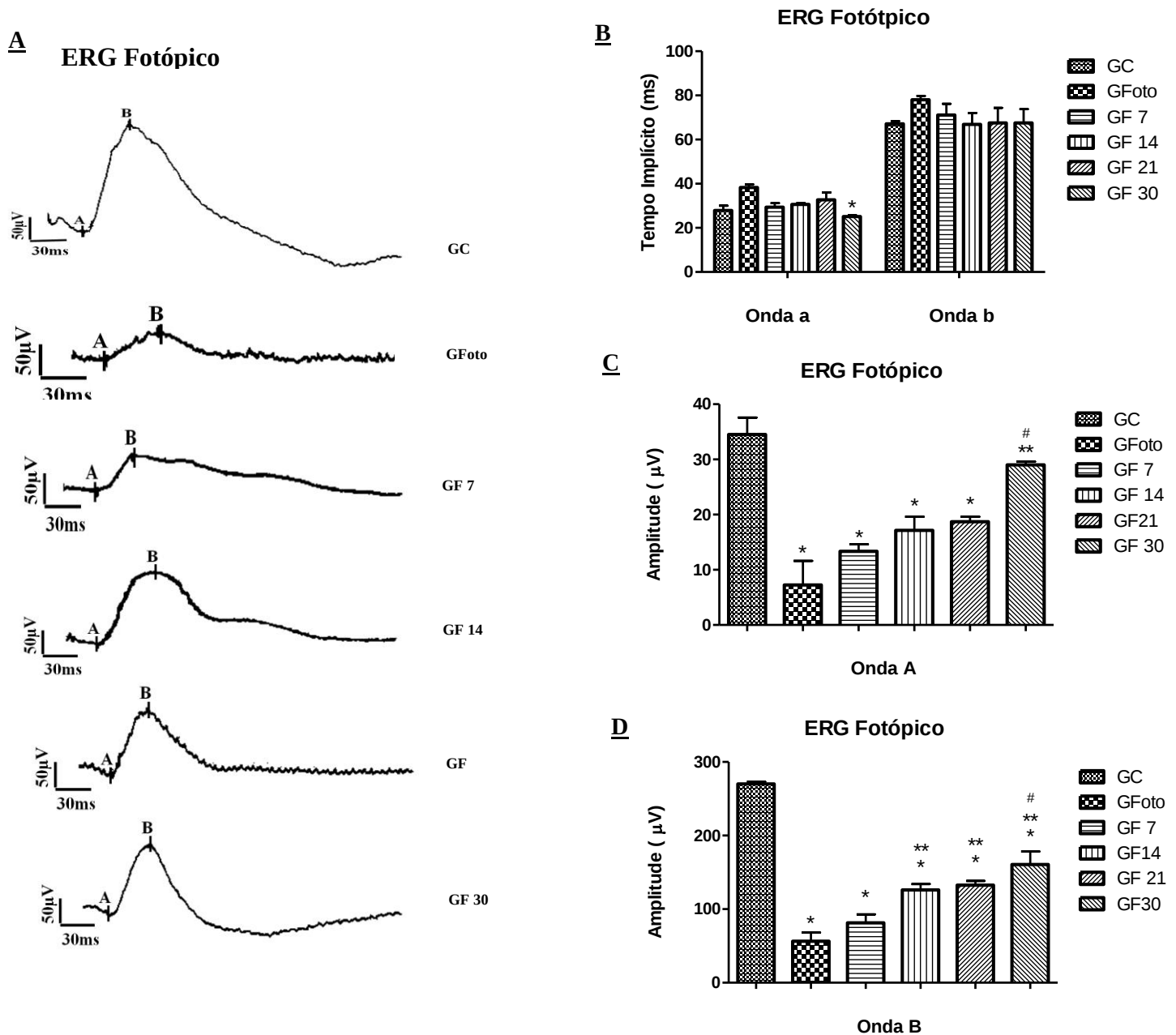


Figura 28. Eletrorretinograma fotópico de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. Onda A: * $p < 0,05$, GFoto x GF 30. **C** – Amplitude da onda A, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC; ** $p < 0,05$, GF 30 x GFoto. # $p < 0,05$, GF 30 x GF 7. **D** – Amplitude da onda B, em μV . * $p < 0,05$, GFoto x GC, GF 7 x GC, GF 14 x GC, GF 21 x GC e GF 30 x GC; ** $p < 0,05$, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. . # $p < 0,05$, GF 30 x GF 7.

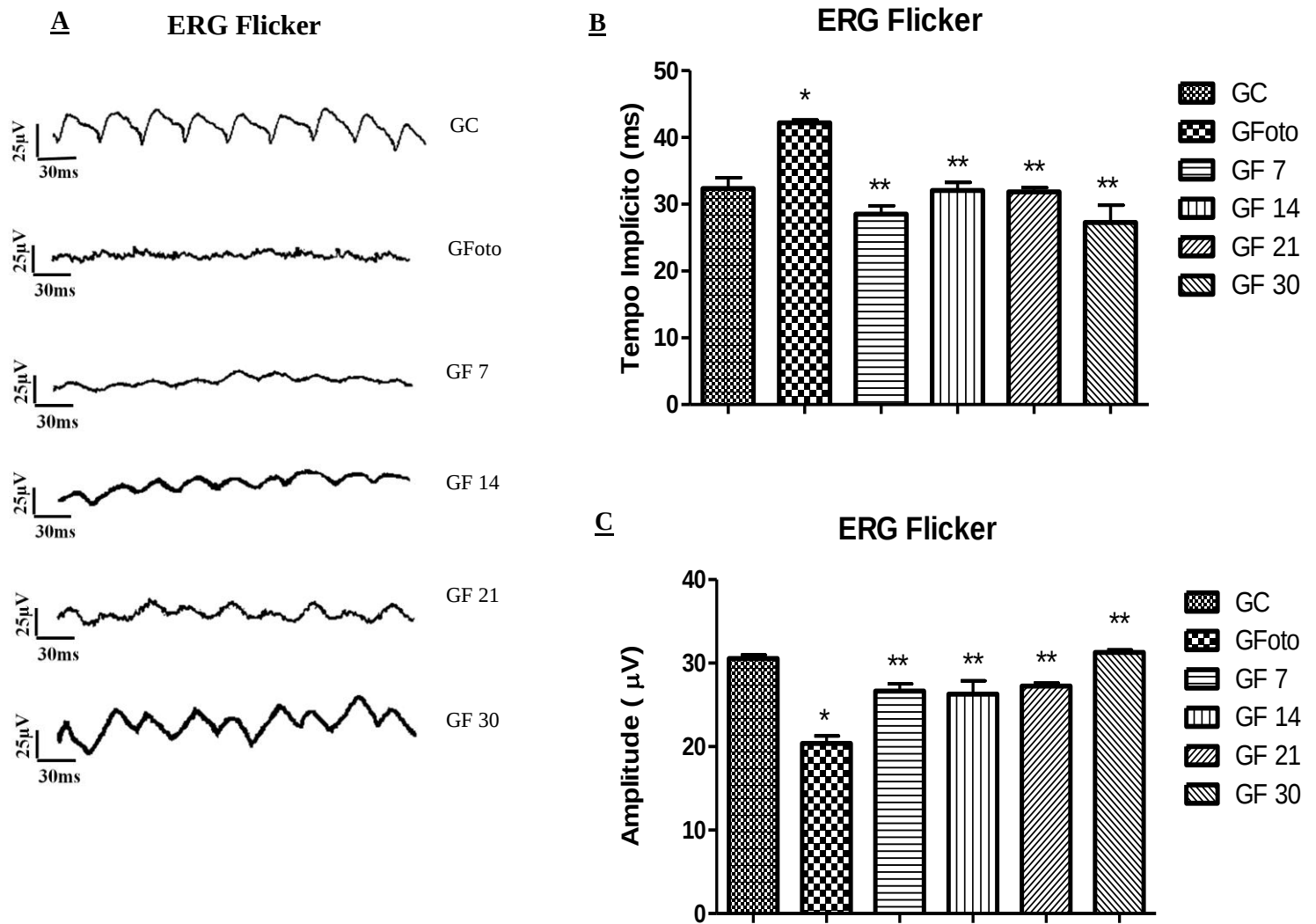


Figura 29. Eletrorretinograma flicker de ratos submetidos à foto-exposição e à administração posterior, de forma aguda e crônica, da fluoxetina. **A** – Formato da onda adquirida pelo eletrorretinograma dos grupos GC, GFoto, GF 7, GF 14, GF 21 e GF 30. Observar uma melhora do formato de onda dos animais do GF 30. **B** – Tempo implícito da resposta das células retinianas. * $p < 0,05$, GFoto x GC. ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto. **C** – Amplitude, em μV : * $p < 0,05$, GFoto x GC. ** $p < 0,05$, GF 7 x GFoto, GF 14 x GFoto, GF 21 x GFoto, GF 30 x GFoto.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou importantes modificações estruturais na histologia da retina, quanto à redução da espessura total da retina, como também, da CNE assim como uma maior degeneração com perda da morfologia do segmento externo e interno dos fotorreceptores dos animais submetidos apenas à foto-exposição, demonstrando eficácia do protocolo fotodegeneração experimental utilizado.

Em roedores noturnos, como os ratos, o dano decorrente da foto-exposição é tipicamente concentrado nos bastonetes e à extensa perda celular, especialmente, na CNE. Medidas da área e da espessura da CNE ou contagem dos núcleos de células visuais (fotorreceptores) são frequentemente usados para quantificar os efeitos nocivos da luz (ORGANISCIAK; VAUGHAM, 2010). Os danos na retina, em resposta à foto-exposição, são graduais, com áreas contendo pouco ou nenhum dano, próximo a regiões severamente acometidas (RAPP; WILLIAMS, 1980).

No presente estudo foi observado um maior dano (maior redução da espessura) na região mais dorsal e central da retina. Da mesma forma, Montalbán-Soler et al. (2012) demonstraram uma maior degeneração dos fotorreceptores na região dorso-central da retina de camundongos submetidos à fotoexposição. Alguns autores (BATELLE; LAVAIL, 1978; RAPP et al., 1985; PENN; ANDERSON, 1987) atribuem um menor dano na metade inferior da retina devido, principalmente, a uma menor quantidade de EROs, a um menor comprimento do segmento externo dos bastonetes e menor nível de concentração de rodopsina que a região dorsal. A redução de danos na retina periférica, segundo Liu et al. (1998) e Li et al. (2003), pode ser devido a uma melhor circulação intra-retinal e a uma maior síntese de fatores neuroprotetores em resposta à luz brilhante produzidos pelo EPR, próximo à zona marginal ciliar. De acordo com Stone et al. (1999), outro fator que pode interferir na regionalização do dano é a localização da iluminação do ambiente onde os animais estão acondicionados. Segundo este mesmo autor, o ângulo incidente da luz do ambiente de criação do animal ou na câmara de foto-exposição pode ter uma grande influência na região acometida do olho do animal. No presente trabalho, a iluminação da câmara de fotoexposição era proveniente do teto da câmara. Estes feixes luminosos ao incidirem na córnea (de curvatura convexa) dos animais, sofre

uma refração e muda a direção do feixe luminoso de forma que incide predominantemente na região dorso-central da retina.

O excesso de luz, além de outras modificações, leva a um aumento na produção de EROs (SPIKES; MACNIGHT, 1972). Os tecidos, que possuem uma grande concentração de membranas celulares, são, particularmente, mais severamente danificados porque o ataque de radicais livres nos ácidos graxos poliinsaturados induz uma reação em cadeia denominada peroxidação lipídica, que quebra estruturas membranosas (PRYOR et al., 1976). O segmento externo dos fotorreceptores é constituído por um conjunto de discos derivados da membrana celular, impregnados de fotopigmentos responsáveis pela fototransdução (COHEN, 1972). Desta forma, os fotorreceptores são diretamente atingidos pelos resíduos da fototransdução excessiva. A grande quantidade de radicais livres no meio intercelular induz a formação de proteínas e lipídios de membrana danificados, levando ao desequilíbrio da célula, que pode entrar em colapso e iniciar a cascata de eventos que culminarão na morte por apoptose (HAFEZI et al., 1997).

O presente trabalho demonstrou haver uma menor taxa de apoptose nos animais submetidos ao tratamento com a fluoxetina administrada tanto de forma prévia como posterior à foto-exposição. Segundo Réus et al. (2012), a fluoxetina pode elevar os níveis de Akt, CREB, BDNF e Bcl-2, substâncias envolvidas na regulação contra a apoptose celular. Tem sido demonstrado que antidepressivos (por exemplo, a fluoxetina) sobrerregulam a expressão da Bcl-2 (XU et al. 2003, CHIOU et al. 2006). Além disso, a estimulação do BDNF, juntamente com o complexo Akt, também estimulam a expressão da Bcl-2 (LAWLOR; ALESSI, 2001, HUANG; REICHARDT, 2003), considerada como um repressor da morte de células neuronais (MYERS et al., 1995).

A proteína Bcl-2 assim como BAD (proteína pró-apoptótica) regulam a liberação do citocromo C das mitocôndrias e, é sabido que o citocromo C desempenha um papel importante na iniciação da apoptose (LI et al., 1997). Agostinho et al. (2011a), avaliaram os efeitos da fluoxetina nos complexos de cadeias respiratórias mitocondriais e demonstraram que esta droga altera a atividade da cadeia respiratória em cérebros de ratos. Além disso, o tratamento de forma aguda com fluoxetina altera a atividade da enzima citrato sintase e, tanto de forma aguda como crônica, modifica a atividade da enzima creatina quinase (AGOSTINHO et al., 2009; AGOSTINHO et al., 2011b). Estas enzimas estão

envolvidas no metabolismo celular e fica demonstrado, claramente, que existe uma relação entre a fluoxetina e o metabolismo energético, fato que tem sido correlacionado com a atenuação da morte celular em distúrbios neuropsiquiátricos tratados com fluoxetina (BEM-SHACHAR; KARRY, 2008; QUIROZ et al., 2008).

A fluoxetina também possui características antioxidante (ZAFIR; BANU, 2007; NOVIO et al., 2011), anti-inflamatória (ABDEL-SALAM; BAIUOMY; ARBID, 2004), anti-apoptótica (KOLLA et al., 2005) e neuroprotetora (ZHANG et al., 2012). Conforme demonstrado neste trabalho, estas características da fluoxetina podem ter interferido positivamente numa proteção contra a morte dos fotorreceptores, demonstrado por uma menor taxa de apoptose, resultando numa maior espessura das camadas avaliadas em nosso estudo e, em melhores resultados dos traçados do ERG.

Os resultados do presente trabalho corroboram com alguns autores que utilizaram outras substâncias com características semelhantes à fluoxetina e também demonstraram um efeito positivo sobre a sobrevivência dos fotorreceptores de animais induzidos à foto-exposição.

Otsuka et al. (2013), utilizando Astaxantina, um carotenóide presente em animais marinhos (salmão, trutas, camarão, peixes), com funções antioxidantes (IWAMOTO et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2000; AOI et al., 2003), anti-tumoral (CHEW et al., 1999), anti-inflamatórias (OHGAMI et al., 2003), anti-diabéticas (UCHIYAMA et al., 2002) e hepatoprotetora (KANG; KIM; KIM, 2001), demonstraram uma importante função neuroprotetora na retina de ratos fotoexpostos. Tais autores constataram uma melhor resposta do ERG, uma maior espessura da CNE, menor índice apoptótico e uma menor concentração de EROs. Da mesma forma, em nosso trabalho, encontramos resultados semelhantes nos animais tratados com a fluoxetina.

O presente estudo demonstrou que uma maior sobrevivência dos fotorreceptores induz a melhores respostas no ERG, em especial, a um menor tempo implícito e em uma maior amplitude da onda a.

Montalbán-Soler et al. (2012), utilizando camundongos submetidos à fotodegeneração, afirmam que a porção mais externa da retina (EPR e CNE) não possuem bons mecanismos compensatórios contra os efeitos nocivos do excesso de luz. O que significa que a resposta dos fotorreceptores ao ERG (onda a) não se recupera ao longo do curso da fotodegeneração.

Todavia, segundo Richards, Emondi e Rohrer (2006), a retina interna (CNI e Camada Plexiforme) possui mecanismos compensatórios de regulação após serem submetidas ao excesso de luz. Uma dessas compensações pode ser a sinaptogênese ou a amplificação de sinapses existentes como tem sido observada em vários estudos que mostram o remodelamento da retina após foto-exposição ou em outros tipos de degeneração de fotorreceptores (JONES; MARC, 2005; MARC et al., 2008; CUENCA et al., 2010). Montalbán-Soler et al. (2012) também demonstraram que a PKC α e a sinaptofisina, proteínas relacionadas a mecanismos compensatórios, são reprimidas até 90 dias após a foto-exposição, recuperando seus valores normais aos 180 dias posteriormente à fotodegeneração na CNI e na camada plexiforme interna. Devido ao fato da PKC α ser uma proteína quinase associada a células bipolares (com importante papel regulatório em diversas funções celulares) e a sinaptofisina ser uma proteína integral da membrana situada nas vesículas pré-sinápticas que contém neurotransmissores, a recuperação dessas proteínas pode sugerir uma melhora do funcionamento das células bipolares e, conseqüentemente, da onda *b* no ERG. (MONTALBÁN-SOLER et al., 2012). Entretanto, esses mesmos autores afirmam que essa recuperação foi lenta e, então não explicaria a rápida recuperação da onda *b* em seu estudo. Que este mecanismo constitui apenas uma parte de outros mecanismos compensatórios mais complexos da retina que estão envolvidos em alterações retinianas, como a expressão do glutamato ou de outros receptores inibitórios.

O presente estudo demonstrou uma melhora tanto no tempo implícito como na amplitude da onda *b*, tanto nos animais tratados, de forma prévia, como nos animais dos grupos tratados posteriormente à foto-exposição até 30 dias. A recuperação desta onda *b*, de forma rápida, pode ter sido influenciada pela fluoxetina. Por ser um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, mantém a serotonina por mais tempo na fenda sináptica, estimulando seus receptores.

Em trabalho desenvolvido com ratos submetidos à foto-exposição com luz azul, Collier et al. (2011) demonstraram que a degeneração induzida pela luz pode ser prevenida ou suprimida pelo tratamento com agonistas dos receptores da serotonina (5-HT_{1A}). Os mecanismos, através dos quais os agonistas dos 5-HT_{1A}, atuam, ainda permanecem não completamente esclarecidos. No entanto, alguns mecanismos pontuais tem sido identificados, incluindo: hiperpolarização das membranas neuronais (TORUP et al., 2000; HENSLER, 2003) mediada pela

proteína G acoplada aos canais de K^+ (BODE-GREUEL et al., 1990), diminuindo a liberação do glutamato (MAULER et al., 2001) e bloqueando os canais de Ca^{++} ou canais de Na^+ (SUN; DALE, 1999; MELENA; CHIDLOW; OSBORNE, 2000). Além disso, esses receptores da serotonina podem participar da regulação de determinados genes que levam ao aumento da expressão de componentes do sistema de defesa antioxidante como a SOD e a catalase, de proteínas antipoptóticas (Bcl-e e Bcl-XL) e de inibidores da apoptose proteica (DRUSE et al., 2006; FEITAS et al., 2010).

Nossos resultados também corroboram com os relatos de Ojino et al. (2014), que utilizaram uma substância sintética (SUN N8075), um potente antioxidante, proveniente de uma modificação molecular da Flunarizina. Esta substância é um importante removedor de radicais livres como também um inibidor duplo dos canais de Na^+ e de Ca^{++} voltagem dependentes (ANNOURA et al., 2000). Tais autores demonstraram uma melhor espessura da CNE, uma maior amplitude das ondas a e b ao ERG, um menor índice de apoptose celular e menor estresse oxidativo.

Alguns estudos (EDWARD et al., 1991; INOKUCHI et al., 2009; IMAI et al. 2010) indicam que a formação de radicais livres e o excesso de Ca^{++} intracelular estão intimamente relacionados a danos na retina provenientes do excesso de luz. Desta forma, Ojino et al. (2014) demonstraram que o SUN N8075 pode prevenir contra danos celulares induzidos pela luz tanto pela remoção de radicais livres produzidos pelas EROs, por ser um potente antioxidante, como também pelo bloqueio de canais de Na^+ e Ca^{++} .

A fluoxetina, além de ser um inibidor seletivo da receptação da serotonina, com funções variadas (antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora), também pode atuar como inibidor de canais iônicos. Hahn et al. (1999), utilizando cultura de células (PC12), modelo de células neuronais para estudos eletrofisiológicos, demonstraram que a fluoxetina possui um potente efeito inibidor nos canais de K^+ , Na^+ e Ca^{++} . Da mesma forma, Dea'k et al. (2000), utilizando neurônios do hipocampo e córtex pré-frontal de embriões de ratos, demonstraram um poder inibitório da fluoxetina sobre os canais de cálcio tipo L, N e T (canais voltagem dependentes). Choi et al. (2004), também utilizando neurônios hipocampais, apresentaram uma ação da fluoxetina sobre a diminuição da frequência do potencial de ação e da amplitude do potencial de despolarização da membrana. Tais autores afirmam que esta modulação do potencial de membrana pode ser devido a uma

inibição das correntes de K^+ voltagem-dependentes e de diversas correntes iônicas (Na^+ e Ca^{++} , por exemplo), visto a fluoxetina não ser um bloqueador iônico seletivo. As correntes iônicas interferem na modulação do potencial de ação neuronal e modificações em qualquer uma dessas correntes podem acarretar em alteração na atividade do potencial de ação. Corroborando com tais resultados, Kim et al. (2005), demonstraram, através de cultura de células (PC12), que a fluoxetina claramente inibe uma corrente induzida pelo ATP que leva ao aumento da concentração de íons Ca^{++} intracelular. Tal efeito inibitório diminui tanto a entrada de Ca^{++} do meio extracelular para o meio intracelular como a liberação de Ca^{++} de reservas internas celulares. Esta redução da dinâmica dos íons Ca^{++} , também foi demonstrado por Steele, Chen e MacLeish (2005), que apresentaram uma diminuição da elevação dos níveis de Ca^{++} intracelular no compartimento somático e na porção terminal dos bastonetes de salamandra tratadas com fluoxetina. Como citado anteriormente, a elevada concentração Ca^{++} intracelular está diretamente relacionada com danos na retina provenientes do excesso de luz. Desta forma, tais efeitos inibitórios da fluoxetina podem atuar favorecendo a despolarização das membranas dos fotorreceptores, induzindo a uma menor taxa de fototransdução e, como consequência, uma menor produção de EROs e radicais livres, atuando como um fator neuroprotetor das células retinianas.

7. CONCLUSÃO

- A manipulação farmacológica dos animais experimentais com a fluoxetina, administrada previamente à foto-exposição, induziu uma possível prevenção da morte celular das células retinianas, demonstrada, no presente estudo, por uma menor taxa de apoptose celular, maior espessura das camadas da retina avaliadas e, funcionalmente, menor tempo implícito e melhor amplitude das ondas ao exame de eletrorretinograma.
- O tratamento com a fluoxetina após a foto-exposição, em especial, de forma crônica, retarda, ou até mesmo, inibe o processo degenerativo induzido pelo excesso de luz, demonstrado, pelo presente trabalho, através da uma menor apoptose de fotorreceptores, maior espessura das camadas retinianas e, também, por um melhor funcionamento da retina quando submetidas ao eletrorretinograma.
- A fluoxetina apresenta uma atividade neuroprotetora importante contra os efeitos nocivos do excesso de luz sobre a retina de ratos. Tal atividade pode estar relacionada às suas diversas funções, como: atividade anti-inflamatória, antioxidante, anti-apoptótica e neuroprotetora.
- A fluoxetina pode surgir como uma alternativa para o tratamento de processos degenerativos na retina. No entanto, diversos estudos devem ser realizados com o intuito de esclarecer, além de mais benefícios; também, possíveis efeitos colaterais da sua administração sistêmica.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O.M.E.; BAIUMOY, A.R.; ARBID, M. Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. **Pharmacological Research**. v. 49, p. 119-131, 2004.
- ACLAND, G.M.; AGUIRRE, G.D.; RAY, J.; ZHANG, Q.; ALEMAN, T.S.; CIDEIVAN, A.V.; PEARCE-KELLING, S.E.; ANAND, V.; ZENG, Y.; MAGUIRE, A.M.; JACOBSON, S.G.; HAUSWIRTH W.W.; BENNET, J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. **Nature Genetics**, v. 28, p. 92-95, 2001.
- AGOSTINHO, F.R.; RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; RIBEIRO, K.F.; FERREIRA, G.K.; JEREMIAS, I.C.; SCAINI, G.; REZIN, G.T.; STRECK, E.L.; QUEVEDO, J. Olanzapine plus fluoxetine treatment alters mitochondrial respiratory chain activity in the rat brain. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 23, p. 282-291, 2011a.
- AGOSTINHO, F.R.; RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; RIBEIRO, K.F.; FERRARO, A.K.; BENEDET, J. ROCHI, N.; SCAINI, G.; STRECK, E.L.; QUEVEDO, J. Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 487, p. 278-281, 2011b.
- AGOSTINHO, F.R.; SCAINI, G.; FERREIRA, G.K.; JEREMIAS, I.C.; RÉUS, G.Z.; REZIN, G.T.; CASTRO, A.A.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Effects of olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine on creatine kinase activity in rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 80, p. 337 – 340, 2009.
- AHNELT, P.K.; KERI, C.; KOLB, H. Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in human and primate retina. **Journal of Comparative Neurology**, v. 293, p. 39–53, 1990.
- AIELLO, L.P.; GARDNER, T.W.; KING, G.L.; BLANKENSHIP, G.; CAVALLERANO, J.D.; FERRIS, F.L. 3rd, KLEIN, R. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**. v. 21, n. 1, p.143-156, 1998.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997.
- ANNOURA, H.; NAKANISHI, K.; TOBA, T.; TAKEMOTO, N.; IMAJO, S.; MIYAJIMA, A.; TAMURA HORIKAWA, Y.; TAMURA, S. Discovery of (2S)-1-(4- amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-[4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1- piperazinyl]-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075): a dual Na⁺ and Ca²⁺ channel blocker with antioxidant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p. 3372–3376, 2000.
- AOI, W.; NAITO, Y.; SAKUMA, K.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; MAOKA, T.; TOYOKUNI, S.; OKA, S.; YASUHARA, M.; YOSHIKAWA, T. Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, p. 139–144, 2003.

BAI, O.; ZHANG, H.; LI, X.M. Antipsychotic drugs clozapine and olanzapine upregulate bcl-2 mRNA and protein in rat frontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1010, p. 81-86, 2004.

BARAOUCH, F.C.; MIYAMOTO, K.; ALLPORT J.R.; FUJITA, K.; BURSELL, S.E.; AIELLO, L.P.; LUSCINKAS, F.W.; ADAMIS, A.P. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 41, n. 5, p. 1153-1158, 2000.

BARISHAK, R. Y.; OFRI, R. Embryogenetics: gene control of the embryogenesis of the eye. **Veterinary Ophthalmology**, v.10, n. 3, p. 133 –136, 2007.

BATTELLE, B.A.; LaVAIL, M.M. Rhodopsin content and rod outer segment length in albino rats: modification by dark adaptation. **Experimental Eye Research**, v. 26, p. 487-497, 1978.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

BELKKHIRI, A.; DAR, A.A.; ZAIKA, A.; KELLEY, M.; EL-RIFAI, W. Darpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt dependent mechanism. **Cancer Research**, v. 68, p. 395-403, 2008.

BEN-SHACHAR, D.; KARRY, R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. 1-13, 2008.

BENNET, J.; TANABE, T.; SUN, D.; ZENG, Y.; KJELDBYE, H.; GOURAS, P.; MAGUIRE, A.M. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by *in vivo* gene therapy. **Nature Medicine**, v. 2, p. 649-654, 1996.

BEREZOVSKY, A. Validation of a new fiber electrode prototype for clinical electroretinography. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 71, n. 3, p. 316-20, 2008.

BERNTSON, A.; TAYLOR, W.R. Response characteristics and receptive field widths of on-bipolar cells in the mouse retina. **Journal of Physiology**. v. 524.3, p. 879-889, 2000.

BIANCHI, M.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A.E. Fluoxetine reduces inflammatory edema in the rat: involvement of the pituitary-adrenal axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 263, p. 81–84, 1994.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M.A.; UYDU, H.A. BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations

by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, p. 43–51, 2001.

BILOTTA, J.; SASZI, S.; SUTHERLAND, S.E. Rod contributions to the electroretinogram of the dark-adapted developing zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 222, p. 564–570, 2001.

BIRCH, D. G.; ANDERSON, J. L. Standardized Full-Field Electroretinography: Normal Values and Their Variation With Age. **Archives of Ophthalmology**, v. 110, p.1571-6, 1992.

BIRCH, D.G.; HOOD, D.C.; LOCKE, K.G.; HOFFMAN, D.R.; TZEKOV, R.T. Quantitative electroretinogram measures of phototransduction in cone and rod photoreceptors: normal aging, progression with disease, and test-retest variability. **Archives of Ophthalmology**, v.120, p. 1045–1051, 2002.

BLANCO, A.R.; SUDANO-ROCCARO, A.; SPOTO, G.C.; NOSTRO, A.; RUSCIANO, D. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 4339–4343, 2005.

BODE-GREUEL, K.M.; KLISH, J.; HORVATH, E.; GLASER, T.; TRABER J. Effects of 5-hydroxytryptamine_{1A}-receptor agonists on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. **Stroke**, v. 21, p. 164-166,1990.

BODIS-WOLNER, I. Retinopathy in parkinson disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n.11, p. 1493-1501, 2009.

BOWMAKER, J.K.; THORPE, A.; DOUGLAS, R.H. Ultraviolet-sensitive cones in the goldfish. **Vision Research**, v. 31, p. 349-352, 1991.

BOYCOTT, B.B.; WÄSSLE, H. The Morphological Types of Ganglion Cells of the domestic Cat's Retina. **Journal of Physiology**, v. 240, p. 397-419, 1974.

BRIGELL, M.; CHAIR; BACH, M.; BARBER, C.; MOSKOWITZ, A.; ROBSON, J. Guidelines for calibration of stimulus and recording parameters used in clinical electrophysiology of vision, ISCEV. **Documenta Ophthalmologica**, v. 107, p. 185–193, 2003.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Brain Research**, v. 25, p. 397-424, 2006.

BRINKMANN, R.; HUTTMANN, G.; ROUGENER, J.;ROIDER, J.; BIRNGRUBER, R.; LIN, C.P.Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p. 451--64, 2000.

BRUSTOILIM, D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; KAST, R.; ALTSCHULER, E.; SOARES, M. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: The antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 903–907, 2006.

BUCH, H.; NIELSEN, N.V.; VINDING, T.; JENSEN, G.B.; PRAUSE, J.U. LA COUR, M. 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. **Ophthalmology**, v. 112, n. 5, p. 787–798, 2005.

BUSH, R.A.; REMÉ, C.E.; MALNOE, A. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. **Experimental Eye Research**, v. 53, p. 741–752, 1991.

BUSH, R.A.; SIEVING, P.A. A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 35, p. 635–645, 1994.

BUTTEMEYER, R.; PHILIPP, A.W.; SCHLENZKA, L.; MAIL, J.W.;

BEISSENHIRTZ, M.; LISDAT, F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 3116–3120, 2003.

CAI, X.; CONLEY, S.M.; NAASH, M.I. RPE65: Role in the Visual Cycle, Human retinal disease, and gene therapy. **Ophthalmic Genetics**, v. 30, n. 2, p. 57–62, 2009.

CAO, W.; LI, F.; STEINBERG, R.H.; LAVAIL, M.M. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. **Experimental Eye Research**, v. 72, p. 591–604, 2001.

CAVAILLON, J.M. **Les cytokines**. Paris: Masson, 1996.

CAYOUE, M.; BEHN, D.; SENDTNER, M.; LACHAPPELLE, P.; GRAVEL, C. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 9282–9293, 1998.

CHAUM, E. Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 57–75, 2003.

CHEN, J.H.; TIPOE, G.L.; LIONG, E.C.; SO, H.S.; LEUNG, K.M.; TOM, W.M.; FUNG, P.C.; NANJJI, A.A. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 742–751, 2004.

CHEW, B.P.; PARK, J.S.; WONG, M.W.; WONG, T.S. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. **Anticancer Research**, v. 19:1849–1853, 1999.

CHIOU, S.H.; KU, H.H.; TSAI, T.H.; LIN, H.L.; CHEN, L.H.; CHIEN, C.S.; HO, L.L.; LEE, C.H.; CHANG, Y.L. Moclobemide upregulated Bcl-2 expression and induced neural stem cell differentiation into serotonergic neuron via extracellular regulated kinase pathway. **British Journal of Pharmacology**, v.148, p. 587-598, 2006.

CHOI, J.S.; CHOI, B.H.; AHN, H.S.; KIM, M.J.; HAN, T.H.; RHIE, D.J.; YOON, S.H.; JO, Y.H.; KIM, M.S.; HAHN, S.J. Fluoxetine inhibits A-type potassium currents in primary cultured rat hippocampal neurons, **Brain Research**, v. 1018, p. 201 – 207, 2004.

CHUCAIR, A. J.; ROTSTEIN, N.P.; SANGIOVANNI, J.P.; DURING, A.; CHEW, E.Y.; POLITI, L.E. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 11, p. 5168-5177, 2007.

CINGOLANI, C.; ROGERS, B.; LU, L.; KACHI, S.; SHEN, J.; CAMPOCHIARO, P.A. Retinal degeneration from oxidative damage. **Free Radical & Biology Medicine**, v. 40, n. 4, p. 660-669, 2006.

CLARKE, A.M.; GEERAETS, W.J.; HAM JR, W.T. An equilibrium thermal model for retinal injury from optical sources. **Applied Optics**, v. 8, n. 5, p. 1051-5, 1969.

COHEN, A.I. Rods and cones, in Fuortes M.G.F., Ed **Handbook of sensory physiology**, vol 7/2, Berlin, Springer- Verlag, 1972.

COHEN, A.I. The retina, in HART Jr, W.M. Ed Adler's **Physiology of the eye**. Mosby Year Book, 1992.

COLEMAN, H.R.; CHAN, C.C.; FERRIS, F.L.; CHEW, E.Y. Age-Related Macular Degeneration. **Lancet**, v. 372, n. 9652, p. 1835-1845, 2008.

COLLIER, R.I.; PATEL, Y.; MARTIN, E.A.; DEMBINSKA, O.; HELBERG, M.; KRUEGER, D.S.; KAPIN, M.A.; ROMANO, C. Agonists at the serotonin receptor (5-HT_{1a}) protect the retina from severe photo-oxidative stress. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n.5, p. 2118-2126, 2011.

COPENHAGEN, D. R.; JAHR, C. E. Release of endogenous excitatory aminoacids from turtle photoreceptors. **Nature**, v. 341, p. 536-539, 1989.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews of Cancer**, v. 2, p. 647-56, 2002.

COSTA, B .L.; FAWCETT, R.; LI, G.Y.; SAFA, R.; OSBORNE, N.N. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates light-induced photoreceptor damage. **Bulletin, EUA**, v. 76, n. 4, p. 412-423, 2008.

COVINGTON, H.E.; VIALOU, V.; NESTLER, E.J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 683-93, 2010.

CRISPI, F. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces striatal in vivo levels of voltammetric nitric oxide (NO): A feature of its antidepressant activity? **Neuroscience Letters**. v. 470, p. 95-99, 2010.

CUENCA, N.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, L.; CAMPELLO, L.; MANEU, V.; De La VILLA, P.; LAX, P.; PINILLA, I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 43, p.17-75, 2014.

CUENCA, N.; PINILLA, I.; FERNANDEZ-SANCHEZ, L.; SALINAS-NAVARRO, M.; ALARCON-MARTINEZ, L.; AVILES-TRIGUEROS, M.; DE La VILLA, P.; MIRALLES DE IMPERIAL, J.; VILLEGAS-PEREZ, M.P.; VIDAL-SANZ, M. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. **Experimental Eye Research**, v. 91, p. 273-85, 2010.

DAWSON, W.W; TRICK, G.L; LITZKOW, C.A. Improved Electrode for Electroretinography. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 18, n.9, p.988-91, 1979.

DE MONASTERIO, F.M.; GOURAS, P.; TOLHURST, D.J. Trichromatic Colour Opponency in Ganglion Cells of the Rhesus Monkey Retina. **Journal of Physiology**. v. 251, p. 197-216, 1975.

DEÁK, F.; LASZTÓCZI, B.; PACHER, P.; PETHEÖ, G.L.; Kecskeméti, V.; SPÄT, A. Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells, **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1029–1036, 2000.

DICK, E.; MILLER, R.F. Extracellular K⁺ activity changes related to electroretinogram components. I. Amphibian (I-type) retinas. **The Journal of General Physiology**, v. 85, p. 885–909, 1985.

DOWLING, J.E. Organization of vertebrate retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 9, p. 655-680, 1970.

DOWLING, J.E.; BOYCOTT, B.B. Organization of the primate retina: electron microscopy. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 166, p. 80-111, 1966.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DRUSE, M.J.; TAIUDDIN, N.F.; GILLESPIE, R.A.; LE, P. The effects of ethanol and the serotonin_{1A} agonist ipsapirone on the expression of the serotonin_{1A} receptor and several antiapoptotic proteins in fetal rhombencephalic neurons. **Brain Research**, v. 1092, p. 79–86, 2006.

DRZYZGA, L.R.; MARCINOWSKA, A.; OBUCHOIWICZ, E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 248-57, 2009.

ECKERT, R.; RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Animal Physiology Mechanisms and Adaptations**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Co., 1998.

EDWARD, D.P.; LAM, T.T.; SHAHINFAR, S.; LI, J.; TSO, M.O. Amelioration of light-induced retinal degeneration by a calcium overload blocker. Flunarizine. **Archives of Ophthalmology**, v. 109, p. 554–562, 1991.

EKESTEN, B. **The Science and the Practice of Clinical Electrorretinography**. Dusseldorf, Berlin, 2009.

EMAMIAN, E.S.; HALL, D.; BIRNBAUM, M.J.; KARAYORGOU, M.; GOGOS, J.A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. **Nature Genetics**, v. 36, p. 131-7, 2004.

FAKTOROVICH, E.G.; STEINBERG, R.H.; YASUMURA, D.; MATTHES, M.T.; LAVAIL, M.M. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. **Nature**, v. 347, p. 83–86, 1990.

FARAH, M.H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 2, p. 264-274, 2006.

FERRIS III, F.L. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**. v.16, p.322-325, 1993.

FETTER, R. D.; CORLESS, J. D. Morphologic components associated with frog outer segments disk margins. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, p. 646-657, 1987.

FONG, D.S.; AIELLO, L.P.; FERRIS, F.L.; KLEIN R. Diabetic retinopathy. **Diabetes Care**. v.27, p. 2540-2553, 2004.

FREITAS, R.L.M.; SANTOS, I.M.; SOUZA, G.F.; TOME, A.R.; SALDANHA, G.B.; FRIETAS, R.M. Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine- induced seizures is reversed by buspirone. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 505–509, 2010.

GALECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIENKIEWICZ, M.; ZBORALSKI, K.; GALECKA, E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid

therapy in depressive patients. **Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.**, v. 24, 277–286, 2009.

GAO, H.; HOLLYFIELD, J.G. Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 62, p. 181–189, 1996.

GARDNER, T.W. LIETH, E.; KHIN, S.A.; BARBER, A.J.; BONSALE, D.J.; LESHER, T.; RICE, K.; BRENNAN JR, W.A. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, n. 11, p. 2423-7, 1997.

GARDNER, T.W.; ANTONETTI, D.A.; BARBER, A.J.; LANOUE, K.F.; LEVISON, S.W. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. **Survey of Ophthalmology**. v. 47, n.2, p.253-262, 2002.

GARGINI, C.; DEMONITIS, G.C.; CERVETTO, L.; BISTI, S. Analysis of pharmacologically isolated components of the ERG. **Vision Research**, v. 39, p. 1759-1766, 1999.

GEHRS, K.M.; ANDERSON, D.H.; JOHNSON, L.V. Age-related macular degeneration – emerging pathogenetic and therapeutic concepts. **Annals of Medicine**, v. 38, n. 7, p. 450-471, 2006.

GERBER, H.P.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B.A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 30-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 30336- 43, 1999.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

GIROTTU, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry Photobiology B**, v. 63, p. 103--13, 2001.

GLICKMAN, R.D.; JACQUES, S.L.; SCHWARTZ, J.A.; RODRIGUEZ, T.; LAM, K.; BUHR, G. Photodisruption increases the free radical reactivity of melanosomes isolated from retinal pigment epithelium. **Laser-tissue interaction VII. Proceedings of SPIE**, v. 2681, 1996.

GOLDMAN, A.I.; HAM JR, W.T.; MUELLER, A.H. Ocular damage thresholds and mechanisms for ultrashort pulses of both visible and infrared laser radiation in the rhesus monkey. **Experimental Eye Research**., v. 24, p. 45--56, 1977.

GOURAS, P. Color Vision. **Progress in Retinal and Eye Research**., v. 3, p. 227-

261, 1986.

GREEN, D.G.; KAPOUSTA-BRUNEAU, N.V. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. **Visual Neuroscience**, v. 16, p. 727–741. 1999.

GRIMM, C.; REMÉ, C.E.; ROL, P.O.; WILLIAMS, T.P. Blue light's effects on rhodopsin: Photoreversal of bleaching in living rats eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 12, p. 3984-3990, 2000.

GU, X.; MEER, S.G.; MIYAGI, M.; RAYBORN, M.E.; HOLLYFIELD, J.G.; CRABB, J.W.; SALOMON, R.G. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 42027-42035, 2003.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 469–487, 2003.

HAFEZI, F.; STEINBACH, J.P.; MARTI, A.; MUNZ, K.; WANG, Z.Q.; WAGNER, E.F.; AGUZZI, A.; REMÉ, C.E. The absence of *c-fos* prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration *in vivo*. **Nature Medicine**, v. 3, n. 3, p.346-349, 1997.

HAHN, S.J.; CHOI, J.S.; RHIE, D.J.; OH, C.S.; JO, Y.H.; KIM, M.S. Inhibition by fluoxetine of voltage-activated ion channels in rat PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 367, p. 113–118, 1999.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochemical Science**, v. 3, p. 509–15, 2006.

HAM JR, W.T.; MUELLER, H.A.; GOLDMAN, A.I.; NEWMAN, B.E.; HOLLAND, L.M.; KUWABARA, T. Ocular hazard from picosecond pulses of Nd: YAG laser radiation. **Science**, v. 185, n. 4148, p. 362--3, 1974.

HAM JR, W.T.; MUELLER, H.A.; SLINEY, D.H. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. **Nature**, v. 260, p.153--5, 1976.

HAMMONDS, M.D.; SHIM, S.S. Effects of 4-week treatment with lithium and olanzapine on levels of brain-derived neurotrophic factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein in the sub-regions of the hippocampus. **Basic Clinical of Pharmacology and Toxicology**, v.105, p. 113-119. 2009.

HANITZSCH, R. Dependence of the b-wave on the potassium concentration in the isolated superfused rabbit retina. **Documenta Ophthalmology**, v. 51, p. 235–240.,1981.

HANITZSCH, R.; KUPPERS, L.; FLADE, A. The effect of GABA and the GABA-uptake-blocker NO-711 on the b-wave of the ERG and the responses of horizontal cells to light. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, 242, 784–791. 2004.

HARE, W.A.; TON, H. Effects of APB, PDA, and TTX on ERG responses recorded using both multifocal and conventional methods in monkey. **Documenta Ophthalmology**, v.105, p.189–222, 2002.

HENDRIKS, J.; TEUNISSEN, C.H.; DE VRIES, H.; DIJKSTRA, C.H. Macrophages and neurodegeneration. **Brain Research Reviews**, v. 48, p.185–195, 2005.

HENSLER, J.G. Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. **Life Science**, v. 72, p. 1665–1682, 2003.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; ARMUTCU, F.; OZEN, M.E.; BULUT, M.; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, H.A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives of Medical Research**, v. 38, p. 247-52, 2007.

HILLENKAMP, F. Laser radiation tissue interaction. **Health Physics**, v. 56, p. 613-6, 1989.

HISATOMI, O.; IMANISHI, Y.; SATO, T.; TOKUNAGA, F. Arrestins expressed in killifish photoreceptors cells. **FEBS Letters**, v. 411, p. 12-18, 1997.

HISATOMI, O.; KAYADA, S.; TANNIGUCHI, Y. KOBAYASHI, Y.; SATOH, T.; TOKUNAGA, F. Primary structure and characterization of a bullfrog visual pigment contained in small single cones. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 119, p. 585-591, 1988.

HISATOMI, O.; SATOH, T.; TOKUNAGA, F. The primary structure and distribution of killifish visual pigments. **Vision Research**, v. 37, p. 3089-3096, 1997.

HOLDER, G.E.; CELESIA, G.G.; MIYAKE, Y.; TOBIMATSU, S.; WELEBER, R.G. International Federation of Clinical Neurophysiology: Recommendations for visual system testing. **Clinical Neurophysiology**, v.121, p. 1393–1409, 2010.

HSIUNG, S.C.; ADLERSBERG, M.; ARANGO, V.; MANN, J.J.; TAMIR, H.; LIU, K.P. Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, p.182-94, 2003.

HUANG, E.; REICHARDT, L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, p. 609-42, 2003.

HUANG, Y.Y.; PENG, C.H.; YANG, Y.P.; WU, C.C.; HSU, W.M.; WANG, H.J.; CHANG, K.H.; CHOU, Y.P.; CHEN, S.J.; CHANG, Y.L. Desipramine activated Bcl-2 expression and inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived adult neural stem cells. **Trends in Pharmacological Science**, v. 104, p. 61-72, 2007.

HWANG, E.S.; KIM, G.H. Biomarkers of oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, n. 1, p. 1–10, 2007.

IMAI, D.; YONEYA, S.; GEHLBACH, P.L.; WEI, L.L.; MORI, K. Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, p. 570–578, 2005.

IMAI, S.; INOKUCHI, Y.; NAKAMURA, S.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; HARA, H. Systemic administration of free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. **European Journal of Pharmacology**, v. 642, p. 77–85, 2010.

INOKUCHI, Y.; SHIMAZAWA, M.; NAKAJIMA, Y.; KOMURO, I.; MATSUDA, T.; BABA, A.; ARAIE, M.; KITA, S.; IWAMOTO, T.; HARA, H. A Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform, NCX1, is involved in retinal cell death after *N*-methyl-D-aspartate injection and ischemia-reperfusion. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 906–917, 2009.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; KURATA, H.; MATSUMOTO, A.; MIKI, W.; KAMIYAMA, M.; ITAKURA, H.; YAMAMOTO, S.; KONDO, K. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 7, p. 216–222, 2000.

JACOB, M.M; SOUZA, G.S; SILVEIRA, L.C.L; GOMES, B.D. Eletroretinograma de campo total: das origens celulares à aplicação clínica. **Neurociências**, v.7, n.2, p.107-117, 2011.

JACQUES, S.L. Laser-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical. **Surgical Clinics of North America**, v. 72: 531--58, 1992.

JAGER, R.D.; MIELER, W.F.; MILLER, J. W. Age-Related Macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 2606-2617, 2008.

JAMISON, J.A.; BUSH, R.A.; LEI, B.; SIEVING, P.A. Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG. **Visual Neuroscience**, v. 18, p. 445–455 2001.

JOHNSON, L.N.; CASHMAN, S.M.; READ, S.P.; KUMAR-SINGH, R. Cell penetrating peptide POD mediates delivery of recombinant proteins to retina, cornea and skin. **Vision Research**, v. 50, p. 686–697, 2010.

JOLY, S.; FRANCKE, M.; ULBRICHT, E.; BECK, S.; SEELIGER, M.; HIRRLINGER, P.; HIRRLINGER, J.; LANG, K.S.; ZINKERNAGEL, M.; ODERMATT, B.; SMARDZIIA, M.; REICHENBACH, A.; GRIMM, C.; REMÉ, C.E. Resident Microglia and Bone Marrow Immigrants Remove Dead Photoreceptors in Retinal Lesions. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 6, p. 2310–2323, 2009.

JOLY, S.; PERNET, V.; CHEMTOB, S.; DI POLO, A.; LACHAPELLE, P. Neuroprotection in the Juvenile Rat Model of Light-Induced Retinopathy: Evidence Suggesting a Role for FGF-2 and CNTF. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 5, p. 2311-2320, 2007.

JONAS, E.A.; HOIT, D.; HICKMAN, J.A.; BRANDT, T.A.; POLSTER, B.M.; FANNJIANG, Y.; MCCARTHY, E.; MONTANEZ, M.K.; HARDWICK, J.M.; KACZMAREK, L.K. Modulation of synaptic transmission by the BCL-2 family protein BCL-xL. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 8423-31, 2003.

JONES, B.W.; MARC, R.E. Retinal remodeling during retinal degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 81, p. 123-137, 2005.

JOSELEVITCH, C. Human retinal circuitry and physiology. **Psychology & Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 141-165, 2008.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of Neural Science**. 4a ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.M.; SIEGELBAUM, S.; HUDPETH, A.J. **Princípios de Neurociência**. 5a ed. New York: McGraw-Hill, 2014.

KANEKO, H.; NISHIGUCHI, K.M.; NAKAMURA, M.; KACHI, S.; TERASAKI, H. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v 49, n. 9, p. 4162-4168, 2008.

KANG, J.O.; KIM, S.J.; KIM, H. Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl4-treated rats. **Methods Find in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 79–84, 2001.

KANG, W.S.; LIM, I.H.; YUK, D.Y.; CHUNG, K.H.; PARK, J.B.; YOO, H.S.; YUN, Y.P. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. **Thrombosis Research**, v. 96, p. 229–237, 1999.

KAREGE, F.; PERROUD, N.; BURKHARDT, S.; SCHWALD, M.; BALLMANN, E.; LA HARPE, R.; MALAFOSSE, A. Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Biological Psychiatry**, v. 61, p. 240-5, 2007.

KARLSTETTER, M.; WALCZAK, Y.; WEIGELT, K.; EBERT, S.; VAN DEN BRULLE, J.; SCHWER, H.; FUCHSHOFER, R.; LANGMANN, T. The novel activated

microglia/macrophage WAP domain protein, AMWAP, acts as a counter-regulator of proinflammatory response. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3379-3390, 2010.

KATSIKIS, P.D.; COHEN, S.B.; LONDEI, M.; FELDMANN, M. Are CD4⁺ Th1 cells pro- inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. **International Immunology**, v.7, p. 1287–94, 1995.

KELLER, C.; GRIMM, C.; WENZEL, A.; HAFEZI, F.; REMÉ, C. Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 2, p. 476-480, 2001.

KHANZODE, S.D.; DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report**, v. 8, p. 365–70, 2003.

KIM, J.K.; CHOI, J.S.; LEE, Y.M.; SHIM, E.Y.; HONG, S.H.; KIM, M.J.; MIN, D.S.; RHIE, D.J.; KIM, M.S.; JO, Y.H.; HAHN, S.J.; YOON, S.H. Fluoxetine inhibits ATP-induced [Ca²⁺]_i increase in PC12 cells by inhibiting both extracellular Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular stores, **Neuropharmacology**, v. 49, p. 265-274, 2005.

KIRBY, E.; BANDELOW, S.; HOGERVORST, E. Visual impairment in Alzheimer's disease: a critical review. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, p. 15-34, 2010.

KLEIN, R.; KLEIN, B.E.K.; MOSS, S.E., CRUICKSHANKS, K.J. The Wisconsin epidemiological study of diabetic retinopathy. **Archives of Ophthalmology**, v. 112, p. 1217-1228, 1994.

KOBAYASHI, M. In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 550–555, 2000.

KOCK, J.M.; HINZE-SELCH, D.; STINGELE, K.; HUCHZERMEIER, C.; GODER, R.; SEECK-HIRSCHNER, M.; ALDENHOFF, J.B. Changes in CREB phosphorylation and BDNF plasma levels during psycho- therapy of depression. **Psychotherapy Psychosomatics**, v. 78, n. 3, p.187-219, 2009.

KOFUJI, P.; CELEN, P.; ZAHS, K.R.; SURBECK, L.W.; LESTER, H.A.; NEWMAN, E.A. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 5733–5740, 2000.

KOH, S.H.; LEE, S.M.; KIM, H.Y.; LEE, K.Y.; LEE, Y.J.; KIM, H.T.; KIM, J.; KIM, M.H.; HWANG, M.S.; SONG, C.; YANG, K.W.; LEE, K.W.; KIM, S.H.; KIM, O.H. The

effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. **Neuroscience Letters**, v. 395, p. 103–107, 2006.

KOLB, H. How the retina works? **American Scientist**, v. 91, p. 28–35, 2003.

KOLB, H. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi impregnated cell. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 258, p. 261-283, 1970.

KOLB, H.; FERNANDEZ, E.; NELSON, R. **Webvision The Organization of the Retina and Visual System**. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center, 1995. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11530/>> Acesso em: 20 Oct. 2014.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J.S.; LI, X.M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC2 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 30, n.3, p. 196-201, 2005.

KOSTEN, T.A.; GALLOWAY, M.P.; DUMAN, R.S.; RUSSEL, D.S.; D'SAC, C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the Bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1545-58, 2008.

KOWALSKA, M.; KOWALSKA, H.; ZAWADZKA-GLOS, L.; DEBSKA, M.; SZERSZEN, E.; CHMIELIK, M.; WASIK, M. Dysfunction of peripheral blood granulocyte oxidative metabolism in children with recurrent upper respiratory tract infections. **International Journal Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 67, p. 365–71, 2003.

KRADY, J.K.; BASU, A.; ALLEN, C.M.; XU, Y.; LANOUE, K.F.; GARDNER, T.W.; LEVISON, S.W. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. **Diabetes**, v. 54, n.5, p.1559-65, 2005.

KRISHNA, V.R.; ALEXANDER, K.R.; PEACHEY, N.S. Temporal properties of the mouse cone electroretinogram. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, p. 42–48, 2002.

KUBERA, M.; BASTA-KAIM, A.; HOLAN, V.; SIMBIRTSEV, A.; ROMAN, A.; PIGAREVA, N.; PROKOPIEVA, E.; SHAM, J. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 20, p. 781–9, 1998.

KUBERA, M.; LIN, A.H.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; VAN BOCKSTAELE, D.; MAES, M. Anti-Inflammatory Effects of Antidepressants Through Suppression of the Interferon- γ /Interleukin-10 Production Ratio. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 199-206, 2001.

KUBERA, M.; SYMBIRTSEV, A.; BASTA-KAIM, A.; BORYCZ, J.; ROMAN, A.; PAPP, M.; CALESSON, M. Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. **Polish Journal of Pharmacology**, v.48, p. 503–6, 1996.

KUBOTA, S.; KURITHARA, T.; EBINUMA, M.; KUBOTA, M.; YUKI, K.; SASAKI, M.; NODA, K.; OZWAA, Y.; OIKE, Y.; ISHIDA, S.; TSUBOTA, K. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. **American Journal of Pathology**, v. 177, n. 4, p.1725-1731, 2010.

LAMB, T. D.; PUGH JUNIOR, E. N. Dark adaptation and the visual retinoid cycle. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 23, p. 307-380, 2004.

LAMB, T.D., PUGH JR, E.N. Phototransduction, Dark Adaptation, and Rhodopsin Regeneration - The Proctor Lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.47, n.12, p.5138–52, 2006.

LANGMANN, T. Microglia activation in retinal degeneration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p.1-7, 2007.

LAVAIL, M. M.; GORRIN, G.M.; REPACI, M.A.; THOMAS, L.A.; GINSBERG, H.M. Genetic regulation of light damage to photoreceptors. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 28, n. 7, p. 1043-1048, 1987.

LAVAIL, M.M.; YASUMURA, D.; MATTHES, M.T.; LAU-VILLACORTA, C.; UNOKI, K.; SUNG, C.H.; STEINBERG, R.H. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, p. 592–602, 1998.

LAWLOR, M.; ALESSI, D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2903-10, 2001.

LEE, A.L.; WO, O.; SAPOLSKY, R.M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar Disorder**, v. 4, n. 2, p. 117–128, 2002.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociências**. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

LI, F.; CAO, W.; ANDERSON, R.E. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 4968-4975, 2003.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDIO, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, p. 479-89, 1997.

LIEBMAN, P.A.; ENTIRE, G. Visual pigments from frog and tadpole (*Rana pipiens*).

Vision Research, v. 8, p. 761-775, 1968.

LIETH, E.; LANOUE, K.F.; BERKICH, D.A.; XU, B.; RATZ, M.; TAYLOR, C.; HUTSON, S.M. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 6, p. 1712-23, 2001.

LINDSTEN, T.; ZONG, W.X.; THOMPSON, C.B. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. **Neuroscientist**, v. 11, p. 10-5, 2005.

LIU, C.; PENG, M.; LATIES, A.M. WEN, R. Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 1337-1344, 1998.

LONZE, B.E.; GINTY, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous. **Neuron**, v. 35, p. 605-23, 2002.

LUND, D.J.; BEATRICE, E.S. Ocular hazard of short pulse argon laser irradiation. **Health Physics**, v. 36, p. 7--11, 1979.

LYU, S.Y.; RHIM, J.Y.; PARK, W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, 1293–1301, 2005.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.461, p.25–46, 1999.

MAES, M.; DELANGE, J.; RANJAN, R.; MELTZER, H.Y.; DESNYDER, R.; COOREMANS, W.; SCHARPÉ, S. Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs. **Psychiatry Research**, v. 15, p. 1–11. 1997

MAES, M.; SONG, C.; LIN, A.H.; BONACCORSO, S.; KENIS, G.; DE JONGH, R.; BOSMANS, E.; SCHARPÉ, S. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, 370–9, 1999.

MAHADIK, S.P.; EVANS, D.R. Is Schizophrenia a metabolic brain disorder? Membrane phospholipid dysregulation and its therapeutic implication. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 26, n. 1, p. 85-102, 2003.

MAHROO, O.; LAMB, T. Recovery of the human photopic electroretinogram after bleaching exposures: estimation of pigment regeneration kinetics. **Journal of Physiology**, v. 554, p. 417–437, 2003.

MAKKONEN, L.; KOKKI, H.; KUIKKA, J.; TURPEINEN, U.; RIIKONEN, R. Effects of fluoxetine treatment on striatal dopamine transporter binding and cerebrospinal fluid

insulin-like growth factor-1 in children with autism. **Neuropediatrics**, v. 42, p. 207-209, 2011.

MANDAL, M.N.; PATLOLLA, J.M.; ZHENG, L.; AGBAGA, M.P.; TRAN, J.T.; WICKER, L.; KASUS-JACOBI, A.; ELLIOTT, M.H.; RAO, C.V.; ANDERSON, R.E. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 672-679, 2009.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Medicine**, v. 7, p. 541-7, 2001.

MARC, R.E.; JONES, B.W.; WATT, C.B.; VAZQUEZ-CHONA, F.; VAUGHAN, D.K.; ORGANISCIAK, D.T. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. **Molecular Vision**, v. 14, p. 782-806, 2008.

MARC, R.E.; SPERLING, H. G. Cromatic organization of the primate's cones. **Science**, v. 196, p. 454-456, 1977.

MARCUS, M; CABAEL, L.; MARMOR, M. Utility in clinical practice of standard vs. high-intensity ERG a-waves. **Documenta Ophthalmologica**, v. 113, p. 145–153, 2006.

MARMOR, M.F.; FULTON, A.B.; HOLDER, G.E.; MIYAKE, Y.; BRIGELL, M.; BACH, M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Documenta Ophthalmologica**, v. 118, p. 69-77, 2009.

MARSHALL, J. Thermal and mechanical mechanisms in laser damage to the retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 9, p. 97-115, 1970.

MASLAND, R.H. The fundamental plan of the retina. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 9, p. 877-86, 2001.

MASSEY, S. C.; MILLER, R. F. Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: Evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. **Journal of Physiology**, v. 405, p. 635-655, 1988.

MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 339-45, 1999.

MAULER, F.; FAHRIG, T.; HORVATH, E.; JORK R. Inhibition of evoked glutamate release by the neuroprotective 5-HT_{1A} receptor agonist Bay x 3702 in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 888, p. 150–157, 2001.

McGEE SANFTNER, L.H.; ABEL, H.; HAUSWIRTH, W.W.; FLANNERY, J.G. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a

transgenic rat model of retinitis pigmentosa. **Molecula Therapy**, v. 4, p. 622–629, 2001.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MELENA J.; CHIDLOW, G.; OSBORNE, N.N. Blockade of voltage-sensitive Na⁺ channels by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH DPAT: possible significance for neuroprotection. **European Journal of Pharmacology**, v. 406: p. 319 –324, 2000.

MEYDANI, S.N.; WU, D.; SANTOS, M.S.; HAYEK, M.G. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1462S–76S, 1995.

MILLER, P.E.; MURPHY, C. J. Vision in Dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 12, p. 1623-1634, 1995.

MIURA, G.; WANG, M.H.; IVERS, K.M.; FRISHMAN, L.J. Retinal pathway origins of the pattern ERG of the mouse. **Experimental Eye Research**, v. 89, p.49–62, 2009;

MIYAMOTO, K.; KHOSROF, S.; BURSELL, S.E.; ROHAN, R.; MURATA, T.; CLERMEONT, A.C.; AIELLO, L.P.; OQURA, Y.; ADAMIS, A.P. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p. 10836-10841, 1999.

MOLDAY, R. S. Photoreceptor Outer Segment Proteins, Phototransduction and Retinal Degenerative Diseases: The Friedenwald Lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 39, p. 2493-2509, 1998.

MONTALBÁN-SOLER, L.; ALARCÓN-MARTINEZ, L.; JIMENEZ-LOPEZ, M.; SALINAS-NAVARRO, M.; GALINDOROMERO, C.; SÁ, F.B.; GARCIA-AVUSO, D.; AVILES-TRIGUEROS, M.; VIDAL SANZ, M.; AGUDO-BARRIUSO, M.; VILLEGAS-PEREZ, M.P. Retinal compensatory changes after light damage in albino mice. **Molecular Vision**, v. 18, p. 675-693, 2012.

MORETTI, M.; COLLA, A.; BALEN, G.O.; SANTOS, D.B.; BUDNI, J.; FREITAS, A.E.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.S. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, p. 331-340, 2012.

MORLEY, N.; CLIFFORD, T.; SALTER, L.; CAMPBELL, S.; GOULD, D.; CURNOW, A. The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p.15–22. 2005.

MOSS, S.E.; KLEIN, R.; KLEIN, B.E. The incidence of vision loss in a diabetic population. **Ophthalmology**, v. 95, n.10, p.1340-1348, 1988.

MYERS, K.M.; FISKUM, G.; LIU, Y.; SIMMENS, S.J.; BREDESEN, D.E.; MURPHY, A.N. Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. **Journal of Neurochemistry**, v.65, p. 2432-40, 1995.

NAGAI, K.; JIANG, M.H.; HADA, J.; NAGATA, T.; YAJIMA, Y.; YAMAMOTO, S.; NISHIZAKI, T. (-)-Epigallocatechin gallate protects against NO stress-induced neuronal damage after ischemia by acting as an anti-oxidant. **Brain Research**, v. 956, p. 319–322, 2002.

NAKANO, M.; OSADA, K.; MISONOO, A.; FUJIWARA, K.; TAKAHASHI, M.; OGAWA, Y.; HAGA, T.; KANAI, S.; TANAKA, D.; SASUGA, Y.; YANAGIDA, T.; ASAKURA, M.; YAMAGUCHI, N. Fluvox- amine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. **Life Sciences**, v. 86, p. 309-14, 2010.

NEWMAN, E.A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends in Neuroscience**, v. 26, n. 10, p. 536-42, 2003.

NEWMAN, E.A. Regional specialization of retinal glial cell membrane. **Nature**, v. 309, p. 155–157, 1984.

NEWMAN, E.A.; ODETTE, L.L. Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. **Journal of Neurophysiology**, v. 51, p. 164–182, 1984.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 851-76, 2008.

NIBUYA, M.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in the rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 2365-72, 1996.

NOVIO, S.; NUNEZ, M.J.; AMIGO, G.; FREIRE-GARABAL, M. Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraint-stressed mice. **Basic & clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 365-371, 2011.

OFRI, R.; NARFSTROM, K. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 10-22, 2007.

OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; KOTAKE, S.; NISHIDA, T.; MIZUKI, N.; YAZAWA, K.; OHNO, S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro

and in vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 2694–2701, 2003.

OJINO, K.; SHIMAZAWA, M.; OHNO, Y.; OTSUKA, T.; TSURUMA, K.; HARA, H. Protective Effect of SUN N8075, a free radical scavenger, against excessive light-induced retinal damage in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 424–430, 2014.

OKOYE, G.; ZIMMER, J.; SUNG, J.; GEHLBACH, P.; DEERING, T.; NAMBU, H.; HACKETT, S.; MELIA, M.; ESUMI, N.; ZACK, D.J.; CAMPOCHIARO, P.A. Increased expression of brain derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 4164–4172, 2003.

ORGANISCIK, D.T.; VAUGHAM, D.K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, p. 113-134, 2010.

OTSUKA, T.; SHMAZAWA, M.; NAKANISHI, T.; OHNO, Y.; INOUE, Y.; TSURUMA, K.; ISHIBASHI, T.; HARA H. The Protective Effects of a Dietary Carotenoid, Astaxanthin, Against Light-Induced Retinal Damage, **Journal of Pharmacological Science**, v.123, p. 209 – 218, 2013.

PAPERMASTER, D. S. DREYER, W. J. Rhodopsin content in the outer segment membrane of bovine and frog retinal rods. **Biochemistry**, v. 13, p. 2438-2444, 1974.

PARANHOS, F.R.L; PARANHOS JR, A.; NEHEMY, M.B. Eletroretinograma: considerações a respeito dos limites de normalidade e comparação entre valores normais de dois diferentes laboratórios. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 65, p. 213-6, 2002.

PARK, S.W.; LEE, S.K.; KIM, J.M.; YOON, J.S.; KIM, Y.H. Effects of quetiapine on the brain- derived neurotrophic factor expression in the hippocampus and neocortex of rats. **Neuroscience Letters**, v. 402, p. 25-29, 2006.

PENN, J.S.; ANDERSON, R.E. Effect of light history on rod outer segment membrane composition in the rat. **Experimental Eye Research**, v. 44, p. 767-778, 1987.

PEREIRA, J.M.; MENDIETA, L.; SACAI, P.Y.; SALOMÃO, S.R. BEREZOVSKY, A. Estudo Normativo do eletroretinograma de campo total em adultos jovens. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 137-44, 2003.

PILAR-CUÉLLAR, F.; VIDAL, R.; PAZOS, A. Subchronic treatment with fluoxetine and ketan- serin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, b-catenin and antidepressant-like effects. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 177-83, 2012.

PINILLA, I.; LUND, R.D.; SAUVE, Y. Cone function studied with flicker electroretinogram during progressive retinal degeneration in RCS rats. **Experimental**

Eye Research, v. 80, p. 51–59, 2005.

PINTO, L.H.; INVERGO, B.; SHIMOMURA, K.; TAKAHASHI, J.S.; TROY, J.B. Interpretation of the mouse electroretinogram. **Documenta Ophthalmology**. v. 115, p. 127–136, 2007.

PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin- like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, p. 370--9, 1976.

PUGH JR, E.N; LAMB, T.D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms and amplification, recovery and light adaptation. In: **Handbook of Biological Physics** (pp. 183-255). Elsevier Science B.V, 2000.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. **Neuroscience**. 2. ed. EUA. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

QIU, H.; FUJIWARA, E.; LIU, M.; LAM, B.L.; HAMASAKI, D.I. Evidence that a-wave latency of the electroretinogram is determined solely by photoreceptors. **Japanese Journal of Ophthalmology**. v. 46, p.426–32, 2002.

QUIROZ, J.A.; GRAY, A.N.; KATO, T.; MANJI, H.K. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 2551-65, 2008.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 16, p. 534–54, 2000.

RAISON, C.L.; CAPURON, L.; MILLER, A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 24–31, 2006.

RAMMAL, H.; BOUAYED, J.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. **European Journal of Pharmacology**. v. 589, p.173–5, 2008.

RAPP, L.M.; WILLIAMS, T.P. A parametric study of retinal light damage in albino and pigmented rats. In: WILLIAMS, T.P.; BAKER, B.N. (Eds.), **The Effects of Constant Light on Visual Processes**. New York: Plenum Press, 1980, pp. 133-159.

RAPP. L.M.; NAASH, M.I.; WIEGAND, R.D., JOEL, C.D.; NIELSEN, J.C., ANDERSON, R.E. **Morphological and biochemical comparisons between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration**. New York, Alan R Liss; 1985,p. 421-437.

READ, S.P.; CASHMAN, S.M.; KUMAR-SINGH, R. A poly(ethylene) glycolylated peptide for ocular delivery compacts DNA into nanoparticles for gene delivery to post-mitotic tissues *in vivo*. **Journal of Gene Medicine**, v. 12, p. 86–96, 2010.

REDMOND, T.M.; YU, S.; LEE, E.; BOK, D.; HAMASAKI, D.; CHEN, N.; GOLETZ, P.; MA, J.X.; CROUCH, R.K.; PFEIFER, K. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. **Nature Genetics**, v. 20, p. 344 –351, 1998.

REMÉ, C. E. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 8, p. 2671-2682, 2005.

REMÉ, C. E.; GRIMM, C.; HAFEZI, F.; ISELI, H.P.; WENZEL, A. Why study rod cell death in retinal degenerations and how? **Documenta Ophthalmologica**, v. 106, n. 1, p. 25–29, 2003.

REMÉ, C. E.; GRIMM, C.; HAFEZI, F.; WENZEL, A.; WILLIAMS, T.P. Apoptosis in the retina: The silent death of vision. **News in Physiological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 120-125, 2000.

RÉUS, G.Z.; ABELARIA, H.M.; AGOSTINHO, F.R.; RIBEIRO, K.F.; VITTO, M.F.; LUCIANO, T.F.; SOUZA, C.T.; QUEVEDO, J. The administration of olanzapine and fluoxetine has synergistic effects on intracellular survival pathways in the rat brain. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46,p. 1029-1035, 2012.

RÉUS, G.Z.; ABELARIA, H.M.; AGOSTINHO, F.R.; RIBEIRO, K.F.; VITTO, M.F.; LUCIANO, T.F.; SOUZA, C.T.; QUEVEDO, J. The administration of olanzapine and fluoxetine has synergistic effects on intracellular survival pathways in the rat brain. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46,p. 1029-1035, 2012.

REZNICHENKO, L.; AMIT, T.; YODIM, M.B.; MANDEL, S. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth. **Journal of Neurochemistry**, v. 93, p. 1157–1167, 2005.

RICHARDS, A.; EMONDI, A.A.; ROHRER, B. Long-term ERG analysis in the partially light-damaged mouse retina reveals regressive and compensatory changes. **Vision Neuroscience**, v. 23, p. 91-97, 2006.

ROOF, D.J.; HEUSER, J. E. Surface of photoreceptor disk membrane components. **The Journal of Cell Biology**, v. 95, p. 487-500, 1982.

SANES, J.R.; ZIPURSKY, S.L Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. **Neuron**, v. 66, p.15-36, 2010.

SANGIOVANNI, J.P.; CHEW, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p.87-138, 2005.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, S.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative system. **Hum Psychopharmacology**, v. 22, p. 67–73, 2007.

SCHIEPERS, O.J.; WICHERS, M.C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog Neuro-Psychopharmacol & Biological Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201–217, 2005.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal Physiology Adaptation and Environment** .5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

SCHRODER, S.; PALINSKI, W.; SCHMID-SCHONBEIN, S. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. **American Journal of Pathology**. v. 139, p.81-98, 1991.

SCHUETZ, E.; THANOS, S. Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. **Current Drug Targets**, v. 5, n. 7, p. 619-627, 2004.

SEIDEL, A.; AROLT, V.; HUNSTIGER, M.; RINK, L.; BEHNISCH, A.; KIRCHNER, H. Cytokine production and serum proteins in depression. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 41, p. 534–8, 1995.

SHISHKINA, G.T.; KALININA, T.S.; BEREZOVA, I.V.; DYGALO, N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 1046-57, 2012.

SLATTER, D. **Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

SLATTER, D. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: ROCA, 2005. p. 283-338.

SLAUGHTER, M. M.; MILLER, R. F. An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. **Science**, v. 219, p. 1230-1232, 1983.

SONG, C.; LEONARD, B.E. An acute phase protein response in the olfactory bulbectomized rat: effect of sertraline treatment. **Medicine Science Research**, v. 22, p. 313–4, 1994.

SONG, J.M.; LEE, K.H.; SEONG, B.L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v. 68, p. 66–74, 2005.

SPIKES, J.D.; MACNIGHT, M.L. Photodynamic effects on molecules of biological importance: amino acids, peptides and proteins. **Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 124--36, 1972.

STEELE JR, E.C.; CHEN, X.; MCLEISH, P.R. Fluoxetine inhibits calcium-activated currents of salamander rod photoreceptor somata and presynaptic terminals via modulation of intracellular calcium dynamics, **Molecular Vision**, v. 11, p.1200-10, 2005.

STONE, J.; MASLIM, J.; VALTER-KOCSI, K.; MERVIN, K.; BOWERS, F.; CHU, Y.; BARNETT, N.; PROVIS, J.; LEWIS, G.; FISHER, S.K.; BISTI, S.; GARGINI, C.; CERVETTO, L.; MERIN, S.; PEÉR, J. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. **Progress in Retininal and Eye Research**, v. 18, n. 6, p. 689-735, 1999.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 845-881, 2005.

SUN, Q.Q.; DALE, N. G-proteins are involved in 5-HT receptor-mediated modulation of N- and P/Q- but not T-type Ca^{2+} channels. **Journal of Neuroscience**, v.19, p. 890 – 899, 1999.

SUNG, C. H.; CHUANG, J. Z. The cell biology of vision. **The Journal of cell Biology**, v. 190, n. 6, p. 953-963, 2010.

SZEL, A.; DIAMANSTEIN, T.; ROHLICH, P. Identification of blue-sensitive cones in the mammalian retina by antiviral pigment antibody. **Journal of Comparative Neurology**, v. 273, p. 593-602, 1988.

SZEL, A.; ROHLICH, P. Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. **Experimental Eye Research**, v. 55, p. 47–52, 1992.

TEDESCHI, E.; SUZUKI, H.; MENEGAZZI, M. Antiinflammatory action of EGCG, the main component of green tea, through STAT-1 inhibition. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 973, p. 435–437, 2002.

TERAKITA, A. The Opsins. **Genome Biology**, v. 6, n. 3, p. 213-219, 2005.

THE WISCONSIN EPIDEMIOLOGIC STUDY OF DIABETIC RETINOPATHY III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. **Archives of Ophthalmology**, v.102, p.527-532, 1984.

TOKUNAGA, F.; HISATOMI, O.; SATOH, T.; TANIGUCHY Y.; MATSUDA, S.; IMANISHI, Y.; HONKAWA, H.; TAKAHASHI, Y.; KOBAYASHI Y.; YOSHIDA, M.; TSUKAHARA Y. Evolution of visual pigments and related molecules. **Novartis foundation Symposium**, v. 224, p. 44-53, 1999.

TORUP, L.; MOLLER, A.; SAGER, T.N.; DIEMER, N.H. Neuroprotective effect of 8-OH DPAT in global cerebral ischemia assessed by stereological cell counting.

European Journal of Pharmacology, v. 395, p. 137–141, 2000.

TSUBOI, H.; TATSUMI, A.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, F.; SHIMOI, K.; KINAE, N. Possible connection among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **Journal of Affective Disorders**, v. 91, p. 63–70, 2006.

UCHIYAMA, K.; NAITO, Y.; HASEGAWA, G.; NAKAMURA, N.; TAKAHASHI, J.; YOSHIKAWA, T. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. **Redox Report**, v. 7, p. 290–293, 2002.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) VIII. Study design, progress and performance. **Diabetologia**, v. 34, p. 877–890, 1991.

USUKURA, J.; YAMADA, E. Molecular organization of the rod outer segment. A deep etching study with rapid freezing using unfixed frog retina. **Biomed Research**, v. 2, p. 77–193, 1981.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VERDON, W.A.; SCHNECK, M.E.; HAEGERSTROM-PORTNOV, G. A comparison of three techniques to estimate the human dark-adapted cone electroretinogram. **Vision Research**, v. 43, p. 2089–2099, 2003.

VILLEGAS-PEREZ, M.P. et al. Quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult rats and mice. **Ophthalmic Research**, v. 37, n. S1, p. 31, 2005.

WACHTMEISTER, L. Oscillatory Potentials in the Retina: What do they Reveal. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 14, n. 4, p.485–521, 1998.

WALLS, G. L. The reptilian retina. **American Journal of Ophthalmology**, v. 17, p. 892–915, 1934.

WALSH, N.; VALTER, K.; STONE, J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. **Experimental Eye Research**, v. 72, p. 495–501, 2001.

WELEBER, R.G. The effect of age on human cone and rod ganzfeld electroretinograms. **Association for Research in Vision and Ophthalmology**, v. 20, n.3, p. 392–9, 1981.

WENZEL, A.; REMÉ, C.E. WILLIAMS, T.P.; HAFEZI, F.; GRIMM C. The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light- induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 53–58,

2001.

WHIKEHART, D. R. **Biochemistry of the Eye**. 2.ed. EUA: Butterworth-Heinemann 1994.

WILCOCK, B. P. Eye, Eyelids, Conjunctiva, and Orbit: In M. MCGAVIN, M.;

ZACHERY, J.F. (Eds.), **Pathologic basis of Veterinary Disease**. 4. Ed., Mosby Elsevier, 2007, pp. 1349-1412,

WILDE, M.I.; BENFIELD, P. Fluoxetine. A pharmacoeconomic review of its use in depression. **Pharmacoeconomics**, v. 13, p. 543-561, 1998.

WOLF, G. The visual cycle of the cone photoreceptors of the retina. **Nutrition Reviews**, v. 62, p. 283 – 286, 2004.

WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Prozac (Fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication. **Life Sciences**, v. 57, n. 5, p. 411-441, 1995.

WONG, D.T.; HORNG, J.S.; BYMASTER, F.P.; HAUSER, K.L.; MOLLOY, B.B. A selective inhibitor of serotonin uptake lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sciences**, v. 15, n. 3, p. 471-479, 1974.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 764-774, 2005.

WU, J.; MARMORSTEIN, A.D.; KOFUJI, P.; PEACHEY, N.S. Contribution of Kir4.1 to the mouse electroretinogram. **Molecular Vision**, v. 10, p. 650–654. 2004.

XIA, Z.; DEPIERRE, J.W.; NASSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. **Immunopharmacology**, v. 34, p. 27–37, 1996.

XIE, D.; LIU, G.; ZHU, G.; WU, W.; GE, S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects cultured spiral ganglion cells from H₂O₂-induced oxidizing damage. **Acta Otolaryngologica**, v. 124, p. 464–470, 2004.

XIE, Z.; WU, X.; GONG, Y.; SONG, Y.; QIU, Q.; LI, C. Intraperitoneal injection of Ginkgo biloba extract enhances antioxidation ability of retina and protects photoreceptors after light-induced retinal damage in rats. **Current Eye Research**, v. 32, n. 5, p. 471-9, 2007.

XU, H.; CHEN, M.; MAYER, E.J.; FORRESTER, J.V. DICK, A.D. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. **Glia**, v. 55, n. 11, p.1189-1198, 2007.

XU, H.; STEVEN, R.J.; LI, X.M. Dose-related effects of chronic antidepressants on neuro-protective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 53-62, 2003.

YAU, K. W.; HARDIE, R. C. Phototransduction Motifs and Variations. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 246-264, 2009.

YIN, H.; PARDUE, M.T. Performance of the DTL electrode compared to the Jet contact lens electrode in clinical testing. **Documenta Ophthalmologica**, v. 108, p. 77–86, 2004.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, p. 163–74, 1996.

YOSHINO, K.; OGAWA, K.; MIYASE, T.; SANO, M. Inhibitory effects of the C-2 epimeric isomers of tea catechins on mouse Type IV allergy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4660–4663. 2004.

ZAFIR, A.; BANU, N. Antioxidant potencial of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 572, p. 23-31, 2007.

ZEISS, C. J.; JOHNSON, E. A. Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 3, p. 971-976, 2004.

ZHANG, B.; OSBORNE, N.N. Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate. **Brain Research**, v. 1124, p. 176-187, 2006.

ZHANG, B.; RUSCIANO, D.; OSBORNE, N.N. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. **Brain Research**, v. 1198, p.141-152, 2008.

ZHANG, F.; ZHOU, H.; WILSON, B.C.; SHI, J.; HONG, J.; GAO, H. Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. **Parkinson and Related Disorders**. v. 18 (S1): S213-S217, 2012.

ANEXO



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,

Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	054/2014
Número do processo	23082.008587/2014
Data de emissão da licença	05 de maio de 2014
Título do Projeto	Análise do papel neuroprotetor da fluoxetina sobre a degeneração retiniana induzida por fotoexposição
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Fabício Bezerra de Sá
Colaboradores	Joaquim Evêncio Neto; Vitor Caiaffo Brito.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Rato isogênico; total de 40 animais.



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim

(Presidente em Exercício da CEUA-UFRPE)