Lucia de Fatima Sobral Sampaio

Receptores Nicotínicos de
Acetilcolina no desenvolvimento
da retina de pinto em cultura:
modulação por melatonina
endógena

São Paulo

2001

Lucia de Fatima Sobral Sampaio

Receptores nicotínicos de acetilcolina no
desenvolvimento da retina de pinto em cultura:
modulação por melatonina endógena.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na
Área de Fisiologia Geral.

Orientador(a): Regina P. Markus

São Paulo

2001

S 192r Sampaio, Lucia de Fatima Sobral
Receptores nicotínicos de acetilcolina
no desenvolvimento da retina de pinto em
cultura: modulação por melatonina
endógena.

VII, 67 p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia, 2001.

1. Receptores nicotínicos –
Desenvolvimento 2. Retina 3.
Melatonina

I. Título

LC QP 364.7

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Ao Andreh, filho nascido de mim e
à Letícia, filha nascida da
minha irmã.

“De fato, a objetividade científica só é possível se tivermos primeiro rompido com o objeto imediato, se tivermos recusado a sedução da primeira escolha, se tivermos estancado e contraditado pensamentos que nasçam da primeira observação. Toda objetividade, devidamente verificada, desmente o primeiro contato com o objeto. Ela deve primeiro criticar tudo: a sensação, o senso comum, a própria prática mais constante, inclusive a etimologia, porque a palavra, que é feita para cantar e seduzir, raramente coincide com o pensamento. Longe de se maravilhar, o pensamento objetivo deve ironizar. Sem essa vigilância malevolente não adquirimos jamais uma atitude verdadeiramente objetiva. Tratando-se de examinar homens, iguais, irmãos, a solidariedade é o fundo do método. Mas diante desse mundo inerte que não vive a nossa vida, que não sofre nossos pesares e que não exalta nossas alegrias, devemos cessar todas as expansões, devemos maltratar nossa pessoa. Os eixos da poesia e da ciência são em primeiro lugar inversos. Tudo que a filosofia pode esperar é tornar poesia e ciência complementares, uni-las como dois contrários bem feitos. É pois necessário opor ao espírito poético expansivo, o espírito científico taciturno para o qual a antipatia prévia é uma precaução salutar”.

Gaston Bachelard

La Psychanalyse du Feu, Gallimard, Collection 'Idées', cap. I, p. 9-10.
Tradução Nathanael C. Caixeiro.

Agradecimentos

Há quem passe pelo
bosque e só veja lenha
para a fogueira.

Tolstoi

Esse trabalho existe, graças a pergunta da Dra. Regina P. Markus sobre a modulação de receptores nicotínicos de acetilcolina por melatonina, graças a colaboração da Dra. Dânia Emi Hamassaki-Britto (USP), e graças a tudo o que eu aprendi com o Dr. Luiz Carlos Silveira (Universidade Federal do Pará), sobre retina e com o Dr. Roberto Paes de Carvalho (Universidade Federal Fluminense), sobre desenvolvimento de receptores de neurotransmissores.

Esse trabalho tem vida, graças aos grandes pequenos-auxílios que recebeu do grupo de trabalho do laboratório onde foi realizado (Laboratório de Cronofarmacologia), dos laboratórios vizinhos (Laboratório de Biologia e Fisiologia Celular da Relação Parasita-hospedeiro e o Laboratório de Fisiologia da Célula Pigmentar), e da secretaria do departamento (Dona Gisele Ortoni e Dona Cecília Farah).

Graças ao casal Jeruza e Manoel Sampaio, à Leila Sampaio, ao Waldene Lima, à Simone Sampaio, ao Waldemar Sampaio, à Ana Nóbrega, ao Ricardo Vieira, à Elizabeth Yamada, ao Osmar de Souza, à Cristiane Lopes, à Celina Lotufo, à Zulma Ferreira e ao Luiz Britto, por tudo.

Resumo

Receptores nicotínicos da acetilcolina são encontrados na retina de pintos desde o início do desenvolvimento embrionário. As propostas desse trabalho foram caracterizar esses receptores no desenvolvimento de células de retinas embrionárias de pinto com oito dias, em cultura, e investigar se luzindole, um antagonista de receptores de melatonina, interfere com a atividade, distribuição e número desses receptores. Os ensaios funcionais foram feitos através de microfisiometria, método no qual é medido o aumento da velocidade de acidificação do meio extracelular de células em cultura, provocado pela ativação de receptores por agonistas. Os resultados são expressos como o percentual de aumento da velocidade de acidificação do meio extracelular acetilcolina-estimulado sobre a velocidade de acidificação do meio extracelular basal (ECAR % basal). A eficácia da acetilcolina aumentou do quarto dia de cultura para o quinto dia, decaindo ao oitavo dia, sendo bloqueada de modo dependente de concentração por dihidro- β -eritroidina (a partir de 10 μ M), ao quarto dia e por α -bungarotoxina (10nM), ao quinto e sexto dia de cultivo, não ocorrendo o inverso. Para os ensaios de ligação, utilizou-se [125 I] α -bungarotoxina, e ao quarto dia de cultivo houve maior número de sítios, menor afinidade e maior grau de cooperatividade. Ao quinto dia de cultivo ocorreu o inverso. Foi investigado, por imunocitoquímica, o desenvolvimento da distribuição da imunorreatividade para as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$ e ambas foram encontradas em culturas de quatro e seis dias, estando $\alpha 3$ principalmente em corpos neuronais e dendritos proximais e $\alpha 8$ principalmente em prolongamentos. O tratamento crônico com luzindole não interferiu com o padrão de distribuição das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$ em culturas de quatro ou seis dias, em nenhum tempo de cultivo. Também não interferiu no número de sítios, na constante de associação e no tempo de equilíbrio da ligação de [125 I] α -bungarotoxina, nas culturas cultivadas por cinco dias. Entretanto, a resposta à acetilcolina em culturas de cinco e seis dias foi inibida de modo concentração e tempo dependente por luzindole, sem apresentar somação com a inibição por α -bungarotoxina. Concluiu-se que na cultura de células de retina a eficácia do agonista acetilcolina é dependente do desenvolvimento, se deve principalmente a receptores formados de subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$, ao quarto e quinto dias de cultivo, respectivamente, e que o bloqueio de receptores de melatonina com luzindole inibe a resposta à acetilcolina somente ao quinto e sexto dias de desenvolvimento, provavelmente, pela inibição de outro sistema de neurotransmissão, localizado nos mesmos neurônios que contém receptores sensíveis a α -bungarotoxina em suas ramificações, como o sistema glutamatérgico.

Abstract

Nicotinic acetylcholine receptors are expressed in the chick retina very early in embryonic development. The present study aimed to characterize the nicotinic acetylcholine receptors during embryonic chick retinal cell culture development and to investigate if luzindole, a melatonin receptor antagonist, is able to change the activity, distribution, and number of these receptors. The functional assays were done by microphysiometry, a method in which the increasing, agonist-stimulated, extracellular acidification rate is measured in cultured cells. The results are expressed in terms of the percentual of the acetylcholine-stimulated extracellular acidification rate over the basal extracellular acidification rate (% basal ECAR). The acetylcholine efficacy increased from the fourth to the fifth day, diminishing at the eighth culture day, and was inhibited, concentration-dependently, by dihydro- β -erythroidine (starting at 10 μ M), in the retinal cells cultured for four days, and by α -bungarotoxin (10nM), in the retinal cells cultured for five and six days. The opposite did not occur. We have used [125 I] α -bungarotoxin for the binding assays, and retinal cells cultured for four days presented in these assays a higher maximal-binding, smaller affinity, and higher degree of the cooperativity than retinal cells cultured for five days. Immunocytochemistry was used to characterize the development of the $\alpha 3$ and $\alpha 8$ subunits. Each of these subunits was characteristically distributed throughout the cell, independent of the age of culture. Alpha3 was mainly observed in the perikarya and proximal dendrites, whereas $\alpha 8$ was basically seen in processes. The distribution of the $\alpha 3$ and $\alpha 8$ immunoreactivity was not changed after chronic luzindole treatment. Also, the time of the equilibrium, the association rate, and the number of the [125 I] α -bungarotoxin (10nM) binding sites were not different with or without chronic luzindole treatment in cells cultured for five days. However, the acetylcholine efficacy in the retinal cells cultured for five and six days was inhibited by luzindole, an effect that was concentration and time dependent, and that exhibited no summation with the inhibition by α -bungarotoxin. In conclusion, the acetylcholine efficacy is dependent on retinal cell culture development, and it acts mainly through neuronal nicotinic receptors comprising $\alpha 3$ subunits in the fourth day, and $\alpha 8$ subunits in the fifth day. Acetylcholine action is inhibited by melatonin receptor blockage by luzindole only at the fifth and sixth days, probably by inhibition of other receptors located in the same cells that harbor α -bungarotoxin-sensitive receptors, such as glutamate receptors.

Índice

I- INTRODUÇÃO	1
I.1- Melatonina e Retina	1
I.1.1- A retina	1
I.1.2- Melatonina como neuromodulador da retina na fase de escuro	3
I.1.3- Os receptores de melatonina	7
I.1.4- Melatonina e Dopamina	9
I.2- Desenvolvimento, Farmacologia e Modulação de Receptores Nicotínicos de Acetilcolina na Retina	11
I.2.1- Neurogênese da retina de pintos e receptores nicotínicos de acetilcolina	11
I.2.2- Farmacologia dos receptores nicotínicos de acetilcolina na retina	14
I.2.3- Modulação de receptores nicotínicos e melatonina	16
II- OBJETIVOS	19
III- MATERIAIS E MÉTODOS	20
III.1- Animais	20
III.2- Cultura de Células de Retina	20
III.3- Microfisiometria	21
III.4- Imunocitoquímica	23
III.5- Ligação de radioligantes	23
III.6- Dosagem de Proteína	24
III.7- Análise dos Resultados	24
IV- RESULTADOS	26
IV.1- Receptores nicotínicos de acetilcolina na cultura de retina de pinto em Desenvolvimento	26
IV.2- Efeito do bloqueio de receptores de melatonina por luzindole	35
V- DISCUSSÃO	45
V.1- Caracterização dos receptores nicotínicos de acetilcolina no desenvolvimento de células de retinas de pinto em cultura	45
V.2- Investigação da ocorrência de modulação de receptores nicotínicos por melatonina endógena	50
VI- CONCLUSÕES	55
VII- BIBLIOGRAFIA	57

I- INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos o homem organiza suas atividades no tempo e cria rotinas. Hoje se sabe que o sol e as estações do ano, os mais antigos indicadores do tempo, agem em consonância com relógios internos e dessa relação surgem na natureza seres vivos de diferentes hábitos. Esta relação se dá através do hormônio melatonina, encontrada nos seres vivos do reino animal mesmo em estágios precoces do desenvolvimento embrionário.

I.1- Melatonina e Retina

I.1.1- A retina

A retina está localizada na porção posterior do olho e é dividida em retina pigmentar e neural. A retina pigmentar é constituída de tecido epitelial pigmentar, enquanto a retina neural é constituída de cinco camadas, onde duas são formadas por fibras nervosas e três por corpos celulares. Da parte posterior para a anterior, encontra-se a camada nuclear externa, a camada plexiforme externa, a camada nuclear interna, a camada plexiforme interna e a camada de células ganglionares, cujos axônios vão formar o nervo óptico (Kolb, 1994).

Os feixes luminosos atravessam todas as camadas da retina, ilustradas na figura a seguir, até atingirem os segmentos externos dos fotorreceptores, localizados na camada nuclear externa. Dos fotorreceptores até as células ganglionares, o sinal percorre uma via vertical até as células da camada ganglionar, passando pela camada de células bipolares e recebendo modulação horizontal por células horizontais e amácrinas (Kolb, 1994). As células interplexiformes recebem impulsos nervosos da camada plexiforme interna e os

transmitem à plexiforme externa, como único componente de uma via centrífuga na retina. As células gliais na retina são as células de Müller, que estendem seus prolongamentos da porção mais externa da camada nuclear externa à superfície vitreal da retina (Meller, 1984).

Desenho esquemático de um corte de retina de vertebrados mostrando as camadas descritas no texto. Ref: <http://webvision.med.utah.edu/sretina.html#overview>.

O neurotransmissor responsável pela ativação da via vertical de condução de impulsos nervosos na retina (fotorreceptores → bipolares → ganglionares) é o glutamato (Ehinger e cols., 1988; Wu, 1994). As células horizontais modulam as sinapses entre fotorreceptores e células bipolares, utilizando o ácido gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmissor. A modulação horizontal das sinapses entre células bipolares e ganglionares é exercida pelas células amácrinas. O número de substâncias neuroativas associadas às células amácrinas é muito grande, compreendendo neurotransmissores como GABA, glutamato, glicina, acetilcolina, dopamina e serotonina, além de neuropeptídeos como colecistocinina, encefalina, glucagon, neurotensina, substância P, neuropeptídeo Y, somatostatina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP). As células interplexiformes mais estudadas são dopaminérgicas. As células ganglionares parecem ser principalmente glutamatérgicas. Algumas

células ganglionares, ditas deslocadas, são encontradas na camada nuclear interna, do mesmo modo que algumas células amácrinas, também ditas deslocadas, são encontradas na camada de células ganglionares (Wassle e Boycott, 1991).

Na ausência de luz os fotorreceptores liberam glutamato, que estimula receptores metabotrópicos em células bipolares de centro "on", inibindo a liberação de glutamato por essas células, e receptores ionotrópicos em células bipolares de centro "off", levando-as a liberar glutamato. Ao contrário, em presença de luz não há liberação de glutamato pelos fotorreceptores e a via vertical leva à ativação das células bipolares tipo "on". Em ambos os casos o sinal sofre modulação horizontal por células horizontais e amácrinas (Kolb, 1994; Duarte e cols., 1998).

A retina de pinto apresenta características morfológicas e funcionais já bastante conhecidas, facilitando o estudo comparativo de diversos aspectos morfofuncionais desse tecido. De especial importância é o fato de ser avascular e apresentar grande capacidade de metabolismo glicolítico (Coulombre, 1955).

I.1.2- Melatonina como neuromodulador da retina na fase de escuro

Em vertebrados, tanto a retina como a glândula pineal tem em comum a característica de sintetizar de forma circadiana (ciclos de aproximadamente 24h, em claro constante ou escuro constante e de exatas 24h, havendo sinalização do ambiente), e controlada pela iluminação ambiental o hormônio melatonina (5-OCH₃ N-acetilriptamina). Esse hormônio é sintetizado pelos pinealócitos na glândula e pelos fotorreceptores na retina, a partir de serotonina. Essa é acetilada pela enzima serotonina N-acetiltransferase (NAT;

acetilcoenzima A: arilalquilamina N-acetiltransferase, EC 2.3.1.87) formando N-acetilserotonina, que por sua vez é metilada pela enzima hidroxindol O-metiltransferase (HIOMT, EC 2.1.1.4) originando N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina (Bernard e cols., 1997; Klein e cols., 1983; Meissl, 1997; Tosini e Menaker, 1996; Zawilska e Iuvone, 1989).

O sinal sobre a luminosidade do ambiente é enviado através do tracto retino-hipotalâmico ao núcleo supraquiasmático e se projeta desse núcleo, por uma via de múltiplas sinapses para o gânglio cervical superior, de onde uma via simpática segue para a pineal (Klein e Moore, 1979). Durante o escuro, ocorre um aumento da liberação de noradrenalina na pineal. A membrana dos pinealócitos possui adrenoceptores dos subtipos α_1 e β_1 . Os adrenoceptores β_1 , quando ativados, estimulam a enzima adenilil-ciclase e conseqüentemente aumentam os níveis de AMPc (adenosina-3', 5'-monofosfato), o que é indispensável para aumentar a atividade da NAT (Klein e cols., 1983). Os adrenoceptores α_1 aumentam a concentração citosólica de Ca^{2+} , o que potencia a ação dos receptores β_1 (Sugden e cols., 1984). Esta é, de modo geral, a forma pela qual ocorre a tradução da iluminação ambiental para todo o organismo.

Em aves, a glândula pineal, além de sintetizar melatonina, é também fotorreceptora, observando-se em pinealócitos isolados em cultura liberação circadiana do hormônio melatonina, mostrando funcionamento de oscilador circadiano (Nakahara e cols., 1997). Os ritmos biológicos nos vertebrados são dirigidos por múltiplos osciladores além do relógio supraquiasmático, o oscilador principal (Underwood e cols., 1990). Uma função biológica fisiologicamente

rítmica é comandada por um oscilador quando é capaz de se auto-sustentar, ou seja, a ritmicidade é mantida mesmo quando são suprimidos os sinais ambientais e as eferências do sistema biológico onde está inserida. Esse padrão é diferente dos ritmos dirigidos por um oscilador localizado à distância (Remé e cols., 1991). Portanto, a liberação de melatonina pela pineal em aves tem controle intrínseco, além daquele exercido pelo relógio supraquiasmático.

A síntese de melatonina na retina de vertebrados ocorre preferencialmente na camada nuclear externa (Cahill e Besharse, 1992), onde a etapa limitante é a 5-hidroxilação do triptofano pela triptofano hidroxilase, produzindo o 5-hidroxi-l-triptofano, precursor da serotonina (Cahil e Besharse, 1990). Os níveis de RNAm da enzima triptofano hidroxilase são baixos no início do dia e atingem seu ponto mais alto ao anoitecer. Esse ritmo é mantido mesmo em escuro constante, e não é alterado por luz ou agonistas de receptores da família D2 de dopamina, como acontece com a NAT (Green e cols., 1995).

Em culturas de retinas de hamster, a existência de um oscilador na retina mantém o ritmo circadiano de síntese da melatonina (Tosini e Menaker, 1996; 1998). Essa síntese rítmica também é observada em culturas de fotorreceptores de *Xenopus*. Nessas preparações há troca de fase (cada ciclo de aproximadamente 24h corresponde a um período que é constituído de duas fases), através de exposição da preparação a luz, ou pela administração do agonista de receptores D₄ de dopamina quimpirole (Cahill e Besharse, 1993). As culturas tratadas com forskolina no fim do dia subjetivo apresentam avanço de fase (adianta a fase correspondente à noite subjetiva), enquanto o mesmo

tratamento, no fim da noite subjetiva, causa retardo de fase (retarda a fase correspondente ao dia subjetivo) do ritmo circadiano. Em todas as situações ocorre aumento agudo nos níveis de melatonina, mostrando o envolvimento de AMPc nas trocas de fase promovidas pela luz e por dopamina (Hasegawa e Cahill, 1998).

A detecção de baixos níveis de melatonina na retina de *Xenopus*, a despeito da sua grande capacidade de síntese, se deve a um sistema de catabolismo rápido onde o primeiro passo da via de degradação é a desacetilação pela enzima aril-acilamida amido-hidrolase (EC 2.5.1.13), que produz 5-metoxitriptamina, a qual é desaminada por monoamino oxidase (EC 1.4.3.4), produzindo o aldeído 5-metoxindolacético que pode ser oxidado para o ácido 5-metoxindolacético ou reduzido para 5-metoxitriptofol (Cahill e Besharse, 1989; Zawilska, 1992). A aril-acilamida amidohidrolase é relativamente seletiva para melatonina e é inibida por N-acetilserotonina e por seu produto 5-metoxitriptamina (Grace e Besharse, 1993). A desacetilação da melatonina como primeiro passo de sua via de degradação parece ocorrer não só na retina neural, mas também no epitélio pigmentar retiniano e na pele, ao menos em répteis e aves. Em todas as espécies estudadas a desaminase foi inibida por eserina (Grace e cols., 1991). A melatonina de origem na retina tem ações locais, sendo metabolizada dentro do olho, diferente do que ocorre com a melatonina produzida na pineal, que atinge a corrente sanguínea e é metabolizada no fígado e nos rins (Zawilska, 1992).

Na retina de pintos, o oscilador circadiano responsável pelo ritmo da NAT também está localizado nos fotorreceptores e a atividade da NAT é mensurável

a partir do sétimo dia embrionário, observando-se diferença entre claro-escuro a partir do décimo-nono dia, além de modulação por AMPc e cálcio (Iuvone, 1990; Bernard e cols., 1997). Assim como a atividade da NAT, os níveis de RNAm dessa enzima na retina também são regulados circadianamente (Bernard e cols., 1997) e estudos em culturas de células de retinas embrionárias de pinto, com predomínio de fotorreceptores, mostram que são apenas parcialmente modulados por AMPc (Grève e cols., 1999).

I.1.3- Os receptores de melatonina

A regulação circadiana do sistema melatoninérgico não compreende só a liberação do ligante melatonina, mas também a concentração de receptores que é de magnitude inversa (está em antifase) aos níveis de melatonina do ambiente onde o receptor está inserido (Roka e cols., 1999).

A clonagem do primeiro receptor de melatonina em *Xenopus laevis*, denominado Mel_{1c} (Ebisawa e cols., 1994), seguido dos receptores Mel_{1a} e Mel_{1b} em humanos, abriu caminho para a clonagem de receptores de melatonina em outras espécies, de mamíferos, aves, répteis e peixes. Receptores Mel_{1a}, Mel_{1b} e Mel_{1c} foram encontrados em pintos e peixes, e Mel_{1c} não foi encontrado em mamíferos. Esses receptores formam uma família original de receptores acoplados principalmente a proteínas G sensíveis a toxina de pertussis (G_i e G_o) (Ebisawa e cols., 1994; Reppert e cols., 1994; 1995; 1997).

A utilização de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina permitiu uma primeira classificação de receptores de melatonina em ML₁ e ML₂, o primeiro de alta afinidade a 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina e o segundo de baixa afinidade (Dubocovich, 1995). Atualmente, a classificação para mamíferos validada pela

NC- IUPHAR ("International Union of Pharmacology", subcomissão sobre receptores de melatonina), é mt_1 (Mel_{1a}), MT_2 (Mel_{1b}) e MT_3 (ML₂). O último caracteriza-se por uma rápida cinética de dissociação e foi recentemente purificado e identificado como a enzima quinona redutase 2 (QR2, EC 1.6.99.2), uma enzima relacionada à enzima detoxificante quinona redutase 1 (Nosjean e cols., 2000).

Farmacologicamente, os receptores mt_1 e MT_2 apresentam afinidade subnanomolar para melatonina e 2-iodomelatonina, dentro de uma mesma faixa de afinidade de agonistas onde 2-iodomelatonina > melatonina > 6-hidroxi melatonina >> prazosin (Dubocovich, 1995), mas podem ser diferenciados pelos antagonistas 4-fenil-2-propionamido-tetralina (4-P-PDOT) e 2-benzil-N-acetiltryptamina (luzindole), que são duzentas vezes mais seletivos para o receptor MT_2 . Quanto ao receptor MT_3 , é sensível a baixas concentrações de prazosin, tem como droga seletiva e de alta afinidade a 5-metoxycarbonilamino-N-acetyltryptamina (MCA-NAT) e pode ter sua atividade bloqueada por luzindole em doses maiores que 1 μ M (Nosjean e cols., 2001).

Os receptores de melatonina clonados são acoplados principalmente a proteínas G sensíveis a toxina de pertussis (G_i e G_o), mas tanto os receptores endógenos quanto os recombinantes podem estar relacionados a múltiplas proteínas G ou diferentes vias de transdução de sinal (Vanecek, 1998).

Em tecidos periféricos, os receptores de melatonina foram descritos em diversas estruturas: artéria caudal, ducto deferente e glândula supra-renal de ratos, ovário e testículos de aves, baço de cobaias e trato gastrointestinal de patos (Viswanathan e cols., 1990; Lee e Pang, 1991; Ayre e cols., 1992;

Persengiev, 1992; Poon e Pang, 1992; Carneiro e cols., 1993). Em regiões do sistema nervoso central, a distribuição e a densidade dos sítios de ligação para melatonina é bastante ampla, variando muito com a espécie estudada, onde a maior densidade de sítios é encontrada em vertebrados não-mamíferos (Vanecek, 1998).

Na retina de pintos, receptores de alta afinidade para melatonina foram localizados por autorradiografia na camada plexiforme interna (Laitinen e Saavedra, 1990), enquanto técnicas com maior poder de resolução permitiram que, na retina de rato, receptores mt_1 fossem localizados na camada plexiforme interna e na camada plexiforme externa (imunocitoquímica) e em células ganglionares, células amácrinas e células horizontais (hibridização *in situ*) (Fujieda e cols., 1999).

I.1.4- Melatonina e Dopamina

A dopamina e a melatonina são responsáveis por respostas do tecido retiniano ao dia e à noite, respectivamente. Em vertebrados que não possuem pupila contrátil para controlar a quantidade de luz que chega à retina, o movimento retinomotor observado durante o dia é contração dos cones, alongamento dos bastonetes e migração de grânulos pigmentares para a porção apical das células do epitélio pigmentar, sendo que à noite ocorre o movimento inverso. Em mamíferos e aves, a pupila controla a quantidade de luz que chega à retina, e a renovação dos discos do segmento externo dos fotorreceptores e sua fagocitose pelo epitélio pigmentar retiniano possuem ritmo diário. Os cones são regenerados durante a noite e os bastonetes durante o dia (Nguyen Legros e cols., 2000).

Os receptores de dopamina são do tipo metabotrópico e dividem-se em duas famílias: D1, formada pelos subtipos D₁ e D₅ e D2, formada pelos subtipos D₂, D₃ e D₄. Os receptores da família D1, quando ativados, estimulam a enzima adenilil-ciclase e os receptores da família D2 inibem essa enzima. Em retinas de pinto, tanto a atividade basal da adenilil-ciclase quanto a resultante do estímulo por dopamina, através de receptores da família D1, aumentam com o desenvolvimento embrionário, atingindo o máximo no primeiro dia pós-eclosão, que é mantido até a idade adulta (Agui e cols., 1988).

A estimulação do receptor D₄ por quimpirole, agonista de receptores D₄ e D₃, resulta em um declínio dependente de concentração da atividade noturna da NAT e do nível de melatonina (Zawilska e cols., 1996; 1997). O processo pelo qual a inibição ocorre ainda não está totalmente esclarecido. Receptores da família D2 não inibem a atividade da adenilil-ciclase em preparação de membranas celulares, mas ocorre inibição do acúmulo de AMPc em culturas de células de retina de pinto, em "eye cups" de olhos de pintos e em retinas inteiras de frangos. Essas observações sugerem que a inibição do acúmulo do nucleotídeo no tecido intacto ou em célula deve envolver um mecanismo indireto, um sistema envolvendo segundo mensageiros ou canais iônicos (Zawilska e cols., 1995). Provavelmente, os canais envolvidos no processo seriam os de cálcio, indispensáveis para a ativação da adenilil-ciclase do fotorreceptor (Iuvone e cols., 1991, Zawilska e cols., 1995). Assim, uma possível diminuição no transporte de cálcio mediado por receptores dopaminérgicos localizados no fotorreceptor (Derouiche e Asan, 1999) diminui a síntese de AMPc (Iuvone e cols., 1991) diminuindo a atividade da NAT

(Avendano e cols., 1990; Iuvone e cols., 1991; Zawilska, 1992; Zawilska e cols., 1995).

Por outro lado, a melatonina é responsável na retina pela inibição da liberação de dopamina dependente de cálcio e induzida pela luz (Dubocovich, 1983), inibe o acúmulo de AMPc estimulado por dopamina (Iuvone e Gan, 1995), e ambos os efeitos são inibidos de forma dependente de concentração por luzindole, antagonista competitivo não-seletivo de receptor de melatonina (Dubocovich, 1988 e Iuvone e Gan, 1994; 1995). A liberação de dopamina é muito mais sensível a estímulos do tipo claro ou escuro do que a melatonina, sugerindo que os níveis de dopamina não são simplesmente determinados pelos níveis de melatonina (Adachi e cols., 1999).

I.2- Desenvolvimento, Farmacologia e Modulação de Receptores Nicotínicos de Acetilcolina na Retina

I.2.1- Neurogênese da retina de pintos e receptores nicotínicos de acetilcolina

Na retina, a acetilcolina está relacionada com o crescimento e reparação de prolongamentos das células ganglionares (Lipton e cols., 1988 a), modulação pré-sináptica da liberação de glutamato pelas células ganglionares (Schmidt, 1988) e controle da seletividade direcional dessas células em relação ao campo receptor (Ariel e Daw, 1982).

Os receptores nicotínicos de acetilcolina são estruturas pentaméricas arranjadas de modo a formar um canal central, como mostrado na figura a seguir. Na retina, foram observados receptores nicotínicos formados de

subunidades α ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$) e β ($\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$), ou somente de subunidades α ($\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 7$, $\alpha 8$).

Os sítios para os ligantes colinérgicos encontram-se nas subunidades α e as subunidades β são tidas como estruturais e moduladoras da afinidade das subunidades α (Lukas e cols., 1999; Clementi e cols., 2000).

Receptores nicotínicos de acetilcolina, distribuídos de forma seletiva pelas diferentes células da retina de pinto, foram demonstrados por técnicas imuno-histoquímicas. A imunorreatividade para as subunidades $\alpha 3$ e $\beta 2$ na camada nuclear interna obedeceu ao mesmo padrão de distribuição, sugerindo co-localização, o mesmo ocorrendo parcialmente com as subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 8$ (Britto e cols., 1992). A subunidade $\alpha 8$ foi detectada nas células amácrinas, bipolares e ganglionares, enquanto a subunidade $\alpha 7$ (Keyser e cols., 1993) e subunidades $\alpha 3$ e $\beta 2$ foram identificadas nas células amácrinas e ganglionares (Hamassaki-Britto e cols., 1994). Em células ganglionares deslocadas podem ser encontradas as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 2$ (Gardino e cols., 1996).

Ao contrário da subunidade $\alpha 3$, a subunidade $\alpha 4$ foi detectada por imuno-histoquímica em pequena quantidade em células ganglionares e na camada nuclear interna da retina de pintos, sendo a expressão do RNAm da subunidade $\alpha 4$ na retina menor do que no cérebro de pintos (Whiting e cols., 1991). Também foi mostrada em retina de pintos a presença de receptores nicotínicos de acetilcolina formados por subunidades $\alpha 6$. Nesse trabalho,

receptores contendo subunidades $\alpha 6$, imunopurificadas de retina, radiomarcadas com [^3H] epibatidina, foram imunopurificados, imunoprecipitados, e foi possível sugerir que a composição desses receptores na retina de pintos pós-eclosão obedece à ordem de $\alpha 6\beta 4 > \alpha 6\beta 3 > \alpha 6\alpha 3 > \alpha 6\beta 2$ (Vailati e cols., 1999).

O período de desenvolvimento dos embriões de pinto "in ovo" é em torno de 21 dias. A vesícula óptica primitiva diferencia-se um dia após a fecundação e ao redor do terceiro ou quarto dia observa-se a invaginação da retina neural, acolada à camada pigmentar, formando a vesícula óptica em bicamada. A mais alta atividade mitótica ocorre do terceiro ao sexto dia de incubação (Meller, 1984). Nos dias quatro e cinco já se podem detectar através de imuno-histoquímica as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$ (Hamassaki-Britto e cols., 1994). A subunidade $\alpha 8$ é expressa em concentrações crescentes durante todo o desenvolvimento do embrião, mantendo-se em níveis altos no adulto. Ao sétimo dia embrionário, há a expressão de subunidades $\alpha 7$ em níveis superiores aos encontrados para a subunidade $\alpha 8$, mas esses níveis se mantêm constantes até o período pós-eclosão, onde a proporção de cada subtipo é 26% para $\alpha 7$, 52% para $\alpha 8$ e 11% para $\alpha 7\alpha 8$ (Gotti e cols., 1994).

As primeiras células pós-mitóticas são células ganglionares, seguidas de células precursoras das amácrinas, horizontais e de células fotorreceptoras. As células bipolares e as células de Müller são as últimas a se tornarem pós-mitóticas. Ao completar a primeira semana, um grande número de células já saiu da fase mitótica e pode-se observar o início da migração de células da zona de matriz para a zona marginal e as transformações morfológicas do

citoplasma, que passa a apresentar características de neurônios adultos. Esse processo de aumento de organelas celulares é observado no pinto na segunda semana de incubação. Ainda na segunda semana, há o espessamento das camadas plexiformes externa e interna. Na terceira semana, o citoplasma basal das células apresenta um grande número de vesículas sinápticas e há formação das sinapses fotorreceptor → bipolar → horizontal e das sinapses na retina interna (Meller, 1984).

Estudos utilizando simultaneamente autorradiografia com [^3H] timidina e imuno-histoquímica mostraram que a subunidade $\alpha 8$ nas células bipolares e $\alpha 3$ nas células ganglionares deslocadas são ambas detectáveis somente após a diferenciação dessas células, enquanto são detectadas nas camadas de células amácrinas e ganglionares dois a três dias antes do fim do período mitótico (Gardino e cols., 1996). A subunidade $\beta 3$, é tomada como um marcador de células ganglionares em retinas de pinto, por sua expressão em células precursoras (Matter e cols., 1995), também é encontrada em retinas de pinto pós-eclosão, em associação com as demais subunidades (Vailati e cols., 2000). Portanto, os receptores nicotínicos de acetilcolina são detectados em retinas de pinto desde o início do desenvolvimento embrionário, mesmo antes de as células se diferenciarem.

I.2.2- Farmacologia dos receptores nicotínicos de acetilcolina na retina

No sistema nervoso central de vertebrados são encontrados sítios de alta afinidade e de baixa afinidade a nicotina. Os sítios de baixa afinidade a nicotina são de alta afinidade para α -BTX, originando a classificação, ainda em uso, de

receptores nicotínicos sensíveis e não-sensíveis a α -BTX (Carboneto e cols., 1978; Wonnacot, 1986).

Na retina foram detectados três tipos de receptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina (α -BTX). Esses são formados de subunidades $\alpha 7$ ou de subunidades $\alpha 8$ ou de ambas (Britto e cols., 1992; Keyser e cols., 1993; Gotti e cols., 1994; Lukas e cols., 1999). Estudos de ligação de [125 I] α -BTX em retinas de pinto pós-eclosão, onde as subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 8$ foram imunopurificadas, mostraram que α -BTX tem maior afinidade a $\alpha 7$ ($K_d = 1,2$ nM), quando comparada a l-nicotina ($K_i = 1,2$ μ M) ou a acetilcolina ($K_i = 14,3$ μ M). Os receptores formados por subunidades $\alpha 8$ apresentam dois sítios de ligação com afinidades diferentes entre si para α -BTX ($K_d = 52$ pM e 5,5 nM), l-nicotina ($K_i = 10$ nM e 4,5 μ M), e acetilcolina ($K_i = 300$ nM e 682 μ M). Apenas cerca de 8% da população do receptor $\alpha 8$ possui sítio de alta afinidade à α -BTX (pM) (Gotti e cols., 1997). Usando técnica semelhante, em retinas embrionárias de pinto, os valores de K_d para α -BTX achados foram de 2,1 nM para $\alpha 7$ e 17,2 nM para o sítio de baixa afinidade do receptor $\alpha 8$ (Keyser e cols., 1993). Desse modo, os receptores formados de subunidades $\alpha 7$ ou de subunidades $\alpha 8$ podem ser diferenciados por ensaios de ligação utilizando esse antagonista.

A ligação de [3 H] epibatidina a receptores $\alpha 6$ imunoimobilizados pelo anticorpo monoclonal para esta subunidade, em extrato de retina de pinto pós-eclosão, foi deslocada por agonistas nicotínicos na seguinte ordem de potência: epibatidina > citisina > nicotina > dimetilfenilpiperazina > acetilcolina > carbacol. Quanto aos antagonistas, a faixa de potência foi α -conotoxina MII ($K_i = 66$ nM) > metillicaconitina (K_i 1,3 μ M) > dihidro β -eritroidina (K_i 2,8 μ M)

(Vailati e cols., 1999). A determinação farmacológica de receptores formados pelas subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 4$ em retinas ainda não está bem estabelecida. Em relação aos receptores $\alpha 4$, citisina tem maior afinidade do que epibatidina (ambas as substâncias agonistas de receptores nicotínicos), que é o quadro oposto aos receptores $\alpha 3$ em cérebro de camundongos, onde epibatidina tem maior afinidade (Marks e cols., 1998). Quanto aos antagonistas, dihidro- β -eritroidina, antagonista competitivo, desloca a ligação de [3 H] epibatidina em cérebro de ratos, onde predomina o receptor $\alpha 4\beta 2$ e o receptor $\alpha 7$, com uma afinidade pelo receptor $\alpha 4\beta 2$ cerca de 7500 vezes maior do que aquela obtida para o deslocamento da ligação de [3 H] epibatidina em receptores formados por subunidades $\alpha 3\beta 4$, em células HEK293 (células embrionárias de rins humanos) (Xial e cols., 1998), podendo ser utilizada para diferenciar esses receptores. O antagonista não-competitivo, de uso corrente, é mecamilamina, um bloqueador de canal capaz de diferenciar receptores $\alpha 3\beta 4$ dos demais subtipos (Brioni e cols., 1997; Xiao e cols., 1998).

A diversidade de combinações de subunidades parece ser a regra em receptores nativos e a troca de qualquer das subunidades interfere na farmacologia do receptor (Parker e cols., 1998; Gotti e cols., 2000; Clementi e cols., 2000; Whiteaker e cols., 2000), por isso a dificuldade para a precisa caracterização farmacológica *in situ*.

I.2.3- Modulação de receptores nicotínicos e melatonina

A síntese de receptores nicotínicos de acetilcolina vem sendo relacionada a uma proteína primeiramente purificada de cérebro de pintos com a denominação de ARIA ("acetylcholine receptor induced activity"), que faz parte

de um grupo de proteínas sinalizadoras com alto grau de homologia estrutural, ligantes do receptor transmembrânico tirosina-cinase. É um fator trófico que aumenta e mantém seletivamente os níveis de receptores nicotínicos (Morley, 1998).

Receptores nicotínicos podem ser encontrados em membranas nos estados a seguir. No estado de repouso são aptos a serem ativados pelo ligante; no estado dessensibilizado, por um curto intervalo de tempo, denominado recuperação, esses canais não respondem ao ligante e em um terceiro estado dito desativado esses receptores são permanentemente incapazes de responder ao ligante (Simasko e cols., 1986). O estado funcional desativado é acompanhado de um fenômeno peculiar aos receptores nicotínicos denominado "up-regulation", onde ocorre um aumento da população intracelular de receptores. Esse fenômeno acontece principalmente com os receptores de maior afinidade a nicotina, e é dependente da concentração do agonista. Por exemplo, receptores formados de subunidades $\alpha 4$ requerem nesse caso uma concentração menor de nicotina que receptores $\alpha 7$, que por sua vez requerem uma concentração muito menor que os receptores formados de subunidade $\alpha 3$ (Whiteaker e cols., 1998). O mecanismo mais aceito para "up-regulation" é a diminuição da taxa de renovação de receptores na membrana e não parece ser um fenômeno fisiológico por conta das altas concentrações de nicotina requeridas, podendo ocorrer em casos de adição a nicotina, como nos fumantes (Peng e cols., 1997).

O número máximo de sítios de receptores sensíveis à α -BTX, em células de retina de pinto em cultura, é negativamente modulado por GMPc

(guanosina-3', 5'-monofosfato), cálcio e despolarização de membrana, e positivamente modulado por AMPc (Betz, 1983).

A atividade dos receptores nicotínicos de acetilcolina, quando reconstituídos em bicamadas lipídicas, depende da concentração de colesterol (Rankin e cols., 1997) e pode ser inibida por fosfolipídeos de cadeia curta (Braun e Haydon, 1991). A atividade desses canais *in situ* parece depender, além da composição de fosfolipídios da membrana, de fosforilação por proteína cinase C (PKC) e consequentemente das ondas de cálcio citosólicas (Mosior e Epan, 1997). A densidade de sítios de fosforilação por PKC varia entre as subunidades formadoras do canal e é maior entre os receptores com maior afinidade a nicotina e mais aptos ao processo de "up-regulation" (Eilers e cols., 1997; Oxale e cols., 1997; Ke e cols., 1998; Fenster e cols., 1999).

Vem sendo proposto que substâncias endógenas como 5-hidroxitriptamina e o neuropeptídeo substância P modulem diretamente o canal, de modo estérico e alostérico (Arias, 1998). Também indiretamente, através de segundos mensageiros, esses receptores podem ser modulados por adenosina (Sebastião e Ribeiro, 2000). O hormônio melatonina inibe o potencial excitatório pós-sináptico induzido por acetilcolina no plexo submucoso do tracto gastrointestinal de rato (Barajas-Lopez e cols., 1996) e no terminal nervoso simpático da porção prostática do ducto deferente de rato (Carneiro e Markus, 1990), a resposta à acetilcolina é aumentada por melatonina exógena e endógena (Carneiro e cols., 1991; 1993 e 1994).

A vasta rede de sinalização encontrada na retina, envolvendo múltiplos neurotransmissores, torna esse modelo efetivo para o estudo da modulação de

receptores nicotínicos por outras substâncias neuroativas como a melatonina, que vem sendo associada no sistema nervoso central ao acúmulo de fosfoinosítídeos (Popova e Dubocovich, 1995), ao acúmulo de GMPc, a inibição da atividade de fosfodiesterases (Failace e cols., 1996 a) e ao aumento da captação de cálcio (Failace e cols., 1996 b).

II- OBJETIVOS

- 1- Caracterização dos receptores nicotínicos de acetilcolina no desenvolvimento de células de retina de pinto em cultura.
- 2- Investigação da ocorrência de modulação de receptores nicotínicos por melatonina endógena no desenvolvimento de células de retina de pinto em cultura.

III- MATERIAIS e MÉTODOS

A acetylcholine bromide, a α -bungarotoxin, a trypsin e o luzindole, foram adquiridos do laboratório Sigma, St. Louis. Dubelcco's modified Eagle medium (DMEM) e Penicilin-Streptomycin, do laboratório GIBCO BRL. A atropine foi adquirida do laboratório Merck e a Dihydro- β -erythroidine HBr e a mecamilamine hydrochloride do laboratório RBI. A [^{125}I]-Tyr⁵⁴- α -bungarotoxin usada foi a do laboratório NEN_{TM} Life Science Products, Inc. Boston MA 02118.

Os anticorpos monoclonais (mAb 305 e mAb 315) foram doados pelo Dr. Jon Lindstrom (University of Pennsylvania) e os anticorpos secundários (anticorpo de cabra contra IgG de rato), marcados com FITC (fluorescein isothiocyanate) e TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) foram adquiridos do Jackson Labs., West Grove.

Todos os reagentes foram de pureza analítica.

III.1- Animais

Ovos embrionados de pintos da raça White Leghorn, doados pela Indústria de Biotecnologia Veterinária (BIOVET), foram mantidos a temperatura entre 37-39°C, em atmosfera umidificada até o oitavo dia de desenvolvimento. O estadiamento foi feito segundo Hamburger e Hamilton (1951).

III.2- Cultura de Células de Retina

As culturas foram feitas de acordo com De Mello e cols., 1982. As retinas foram dissecadas em solução fisiológica sem cálcio e magnésio (CMF)

tamponada com fosfato. A seguir, foi adicionada à suspensão tripsina (0,05%). As preparações foram incubadas a 37°C por 15 minutos, após os quais o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5ml de DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) contendo estreptomicina (80 µg/ml), penicilina (80 U.I./ml) e soro fetal bovino a 5%. O tecido foi então dissociado mecanicamente por 15-20 aspirações sucessivas com pipeta de vidro de 5ml. A suspensão celular foi diluída de modo a obter-se um número de células aproximado de 20×10^6 em 2 ml de meio. Após, foi transferida para placas ($1,76 \times 10^4$ células/mm²) que foram armazenadas em estufa a 37°C, em atmosfera umidificada constituída de 5% de CO₂. A troca de meio foi feita a cada 48h e as culturas foram utilizadas nos dias de cultivo quatro, cinco, seis e oito (C4, C5, C6 e C8).

III.3- Microfisiometria

O microfisiômetro (Cytosensor Microphysiometer, Molecular Devices®) mede as variações na taxa de acidificação extracelular (ECAR), induzidas por estímulo a receptores de membrana (Owicki e cols., 1994). Essas medidas foram feitas com células de retinas em cultura confinadas entre duas membranas de polycarbonato contida em uma câmara de porcelana, onde se encontra o semicondutor de silício. Essa câmara foi colocada no microfisiômetro e perfundida com meio de cultura (DMEM) sem bicarbonato de sódio (osmolaridade equilibrada com cloreto de sódio). A intervalos previamente estabelecidos, 1 min. e 20 seg. (sistema em questão), a bomba peristáltica interrompe a perfusão e é feita a medida da taxa de acidificação do meio

extracelular do intervalo de 8 segundos expressa em $\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$, durante 30 segundos, obtendo-se o registro:

O tempo total de cada ciclo foi 2 minutos. A parte inferior da câmara fica em contato com um sensor para medida do pH do meio extracelular. Dessa maneira, pode-se fazer medidas indiretas da resposta de receptores a agonistas e antagonistas através das alterações do metabolismo celular do sistema onde estão inseridos, seja uma população homogênea de células ou heterogênea, como é o caso da cultura de células de retina. Essas medidas são expressas como o percentual de aumento da velocidade de acidificação do meio extracelular acetilcolina-estimulado sobre a velocidade de acidificação do meio extracelular basal (ECAR % basal).

Foi usado como agonista a acetilcolina (ACh 30, 60, 125, 250, 500, 1000 e 2000 μM), e o intervalo entre as doses de 40 minutos foi o ideal para evitar dessensibilização. Os antagonistas usados foram α -bungarotoxina (α -BTX, 0,1 e 0,01 nM), mecamilamina (Meca, 1, 10 e 100 μM) e dihidro- β -eritroidina (DH β E, 10, 15, 30 e 100 μM). Os antagonistas testados foram administrados durante o experimento, dez minutos antes do agonista acetilcolina. A exceção foi α -BTX, que foi adicionada à preparação uma hora antes do experimento (incubada a 37°C), com lavagem das placas antes do experimento, suficiente para retirada de toda a toxina livre. Em todos os experimentos foi adicionada atropina ao

meio de perfusão (concentração final, 1 μ M), com o objetivo de bloquear receptores muscarínicos. Todos os experimentos foram realizados a 37°C.

Como na retina há síntese de melatonina (Iuvone, 1990), optou-se por bloquear a ação da melatonina endógena com luzindole, antagonista competitivo não seletivo de receptores de melatonina (Dubocovich, 1988), o qual foi adicionado ao meio de cultura nos dias de cultivo, 2 ou 3 ou 4.

III.4- Imunocitoquímica

Nos dias de cultivo quatro e seis, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PBS) 0,1 M e incubadas durante doze horas com anticorpos monoclonais contra as subunidades $\alpha 8$ (mab305) e $\alpha 3$ (mab315), (Hamassaki-Britto e cols., 1994). A seguir, as culturas foram incubadas com anticorpos secundários (anticorpo de cabra contra IgG de rato) marcados com FITC ou TRITC (1:200) por duas horas. As imagens foram observadas em microscópio confocal LSM410, Zeiss (linhas de laser, Ar 488 e HeNe 543), montadas com o programa Adobe Photoshop 5.0 (Deneba) e impressas em papel fotográfico. A manipulação das imagens foi restrita a ajustes de brilho da imagem total. Nenhuma imunorreatividade foi observada quando o anticorpo foi substituído por soro normal de rato.

III.5- Ligação de radioligantes

As células com quatro ou cinco dias de cultivo foram lavadas com meio sem soro (pH 7,4) e incubadas com [125 I]- α -BTX por 60 minutos a 37°C. Nos ensaios para estimativa da constante de associação K+1, as células foram

incubadas com concentrações fixas de [125 I]- α -BTX nos intervalos de 2,5; 5; 10; 15; 30; 60; 90 e 120 minutos a 37°C. A ligação inespecífica foi obtida pré-incubando as células com nicotina 1mM por 30 min. A reação foi interrompida com tampão fosfato gelado, seguida de solubilização das células por NaOH (0,1M). Uma amostra dessa solução foi adicionada ao líquido de cintilação (EcolumeTM, ICN Biomedicals). A contagem foi feita em cintilador Packard 2300 TR (eficiência 64,6%). A ligação inespecífica correspondeu de 20 a 50% da ligação total, respectivamente em pontos em torno do K_d e nos pontos correspondentes a concentrações saturantes.

III.6- Dosagem de Proteína

O conteúdo de proteína foi dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando soro albumina bovina como padrão.

III.7- Análise dos Resultados

A afinidade do agonista nos ensaios funcionais foi estimada determinando-se os valores de pD₂, ou seja, o logaritmo negativo da concentração que produz 50% da resposta máxima induzida pelo agonista em estudo (-log EC₅₀). A partir de cada curva concentração-resposta individual obteve-se um valor de pD₂ e a média e o erro padrão da média (epm) foram calculados a seguir. O número de observações (n), para análise estatística, foi definido como o número de experimentos independentes, exceto para os resultados apresentados nas Figuras 7 e 8, onde é definido como o número de culturas independentes. Os resultados foram analisados por teste *t*, quando

apenas duas médias tiveram que ser comparadas. A comparação de mais de duas médias foi feita por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

Os ajustes de todas as curvas foram feitos pelo método não-linear. Para todas as análises, tanto dos resultados funcionais quanto dos ensaios de ocupação por radioligantes, utilizou-se o programa "Graph-Pad Prism", exceto para a estimativa do valor de $K+1$ que foi obtida aplicando-se a equação de pseudo-primeira ordem ($K+1 = \text{"slope"} / [L] \text{ Be} / B_{\text{max}}$), onde foi utilizado o programa para obtenção da inclinação da reta tangente ("slope"). A estimativa de B_e (ocupação no equilíbrio para cada dose) foi feita ajustando uma hipérbole em cada caso (foi aceito $r^2 > 0,5$ em cada caso). O B_{max} (número máximo de sítios ocupados pelo ligante) foi obtido nas curvas de saturação para cada dia de cultivo estudado.

IV- RESULTADOS

IV.1- Receptores nicotínicos de acetilcolina na cultura de retina de pinto em Desenvolvimento

Acetilcolina promoveu um aumento dependente da concentração na velocidade de acidificação basal do meio extracelular (ECAR), em culturas de retinas de embrião de pinto de oito dias com quatro, cinco, seis e oito dias de cultivo (C4, C5, C6 e C8) (Fig. 1).

Figura 1: Curva concentração - resposta de acetilcolina no desenvolvimento da cultura de células de retina de pinto. O pD_2 para cada idade embrionária: C4, $3,40 \pm 0,05$, $n = 7$; C5, $3,57 \pm 0,10$, $n = 11$; C6, $3,44 \pm 0,05$, $n = 7$ e C8, $3,46 \pm 0,41$, $n = 5$. Cada ponto representa média $\pm$ epm.

A resposta máxima à acetilcolina, medida em % sobre o valor basal da velocidade de acidificação extracelular (ECAR % basal), apresentou diferença de acordo com a idade da cultura, sendo de maior magnitude em culturas de cinco e seis dias, decaindo no oitavo dia. Não houve diferença significativa de pD_2 (log negativo da concentração do agonista que produz metade do efeito máximo, ou seja $-\log EC_{50}$) entre os tempos de cultivo estudados. Portanto, para melhor caracterizar os receptores envolvidos na resposta à acetilcolina testou-se o efeito dos antagonistas α -BTX, mecamilamina e dihidro- β -eritroidina nesta preparação. Esses antagonistas não alteraram os níveis basais de velocidade de acidificação extracelular, em nenhuma das concentrações utilizadas.

Figura 2: Células de retina cultivadas por quatro dias. Alfa-bungarotoxina não inibe o efeito da acetilcolina sobre a velocidade de acidificação extracelular (ECAR), $n = 3$. Cada ponto representa média $\pm$ epm. Os valores de pD_2 : controle, $3,40 \pm 0,05$; α -BTX 0,01 μ M, $3,40 \pm 0,20$; α -BTX 0,1 μ M $3,70 \pm 0,12$.

Nas culturas de quatro dias a α -BTX, antagonista competitivo de receptores nicotínicos formados de subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 8$, não inibiu o efeito da acetilcolina sobre a velocidade de acidificação extracelular, observando-se desvio para a esquerda principalmente na curva referente a α -BTX 0,1 μ M (Fig. 2).

Figura 3: Mecamilamina (símbolos cheios) inibe o efeito máximo de acetilcolina (símbolos vazados) sobre a velocidade de acidificação extracelular (ECAR) em culturas de quatro dias, acima, $n = 4$, $p < 0,01$; mas não em culturas de cinco dias, abaixo (o), $n = 3$. Cada ponto representa média $\pm$ epm.

Mecamilamina, reduziu o efeito máximo da acetilcolina sobre a velocidade de acidificação extracelular basal das células retinianas em cultura na concentração de 100 μM . Não houve efeito sobre as culturas de cinco dias de cultivo (Fig. 3). Entretanto, dihidro- β -eritroidina, administrada por 10 minutos antes do agonista, nas doses de 10, 15, 30 e 100 μM , levou a uma inibição dependente de concentração do efeito da acetilcolina (250 μM) sobre a velocidade de acidificação extracelular basal, mas somente em culturas de quatro dias de cultivo, sem nenhum efeito detectável por microfisiometria em culturas de cinco dias de cultivo (Fig. 4).

Figura 4: Células de retina embrionária de pinto de oito dias em cultura. Inibição dependente de concentração por dihidro- β -eritroidina (DH β E) do efeito de acetilcolina (250 μM) sobre velocidade de acidificação extracelular no quarto dia de cultivo (barra cheia) e ausência de inibição no quinto dia de cultivo (barra hachuriada). Cada ponto representa média $\pm$ epm, $n = 3$.

Diferente do observado em culturas de quatro dias, em culturas com cinco e seis dias de cultivo, pré-incubadas por uma hora com α -BTX (0,01 μ M), houve inibição de $53,77 \pm 8,79\%$ ($n=4$) do aumento da velocidade extracelular produzido por acetilcolina, sem alteração dos níveis basais de velocidade de acidificação extracelular produzidos pelas células de retina de pinto em cultura (Fig. 5).

Figura 5: Alfa-bungarotoxina inibe o aumento da velocidade de acidificação extracelular basal (ECAR) de células de retinas cultivadas por cinco e seis dias, induzido por acetilcolina. Cada ponto representa média $\pm$ epm, $n = 4$.

Uma vez caracterizado o envolvimento de receptores sensíveis a α -BTX no aumento da eficácia do agonista acetilcolina nas culturas de cinco e seis dias, foram feitos experimentos de saturação com [125 I] α -BTX em culturas com quatro e cinco dias, para investigar se estava havendo aumento de número e / ou de afinidade dos receptores sensíveis a α -BTX (Fig. 6).

Figura 6: Curva de saturação da ligação específica de $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BTX}$ em células intactas de retina de embriões de oito dias com quatro (C4) e cinco dias de cultivo (C5). Acima (hipérbole quadrática): C4, $B_{\text{max}} = 233,10 \pm 31,29$ fmol/mg-proteína; $K_d = 17,74 \pm 4,46$ nM. C5, $B_{\text{max}} = 86,94 \pm 8,86$ fmol/mg-proteína; $K_d = 5,90 \pm 1,62$ nM. Abaixo (sigmóide): C4, $\log \text{IC}_{50} = 0,92 \pm 0,03$, $nH = 4,38 \pm 1,18$; C5, $\log \text{IC}_{50} = 0,68 \pm 0,10$, $nH = 2,70 \pm 1,40$. Cada ponto representa média $\pm$ epm, $n = 4$.

Os parâmetros de ocupação de [^{125}I] α -BTX, incubada por uma hora, à temperatura de 37°C, obtidos para células de retina embrionária intactas em cultura por quatro dias foram C_4 , $B_{\text{max}} = 233,10 \pm 31,29$ fmol/mg-proteína; $K_d = 17,74 \pm 4,46$ nM, e para as culturas de cinco dias $B_{\text{max}} = 86,94 \pm 8,86$ fmol/mg-proteína; $K_d = 5,90 \pm 1,62$ nM. Através do logaritmo das concentrações [nM], foi calculado para culturas de quatro e cinco dias o nH e log IC50. Respectivamente, nH = $4,30 \pm 1,10$ e $2,80 \pm 1,00$, e log IC50 = $0,90 \pm 0,03$ e $0,60 \pm 0,10$. Portanto, as culturas de quatro dias apresentam número de sítios para [^{125}I] α -BTX maior que as de cinco dias. Em contrapartida, nas culturas de cinco dias a afinidade desses sítios é maior do que nas de quatro dias (Fig. 6).

O nH encontrado, nas duas idades estudadas, indica cooperatividade na ligação de [^{125}I] α -BTX a receptores nicotínicos em células intactas de retina embrionária, ou seja, ligação a mais de um sítio nicotínico com diferentes afinidades a [^{125}I] α -BTX, fazendo com que a relação droga-receptor deixe de ser linear, como observado na Figura 6. Nesses casos a cinética de associação pode dar informações importantes sobre a velocidade de associação e tempo de equilíbrio (tempo onde a relação entre a velocidade de associação e a de dissociação é nula porque ocorre a ocupação máxima de sítios). A análise desses experimentos foi feita ajustando as curvas para associação exponencial em duas fases (foi o melhor ajuste em todos os casos). A constante de associação de pseudo-primeira ordem $K+1$, em cada caso, foi calculada no intervalo de maior linearidade.

No ensaio de associação de [125 I] α -BTX, em concentração abaixo do Kd (10 nM) para culturas de quatro dias, à temperatura de 37°C, o equilíbrio foi atingido aos 30 minutos. A constante de associação calculada através da equação de pseudo-primeira ordem, no intervalo de 2,5 a 30 minutos, K+1 foi igual a $0,039 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ("slope" = $0,065 \pm 0,020$) (Fig. 7).

Figura 7: Decurso temporal da ligação de [125 I] α -BTX (10 nM), à temperatura de 37°C, em células de retina de embriões de oito dias com quatro dias de cultivo, $r^2 = 0,82$, $n = 3$.

Nas culturas de cinco dias os ensaios de associação de [125 I] α -BTX, em concentração abaixo do Kd (4 nM), à temperatura de 37°C, o equilíbrio foi atingido aos 60 minutos. No intervalo de cinco a sessenta minutos, o valor da constante de associação K+1 foi igual a $0,086 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ("slope" = $0,044 \pm 0,011$) (Fig. 8).

Figura 8: Decurso temporal da ligação de $[^{125}\text{I}] \alpha\text{-BTX}$ (4 nM), a temperatura de 37°C, em células intactas de retina de embriões de oito dias com cinco dias de cultivo, $r^2 = 0,74$, $n = 3$.

IV.2- Efeito do bloqueio de receptores de melatonina por luzindole

A caracterização funcional dos receptores nicotínicos envolvidos na resposta à acetilcolina nas idades de cultura estudadas, mostrou participação principalmente de receptores sensíveis a α -BTX em culturas com cinco ou mais dias de cultivo, sendo que aos quatro dias o efeito pareceu se dever principalmente a receptores insensíveis a α -BTX. Utilizamos luzindole, antagonista de receptor de melatonina, para investigar se a melatonina produzida pelas culturas estaria modulando receptores nicotínicos nos dois estágios de desenvolvimento estudados.

Investigou-se primeiramente como as subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$ se distribuem em culturas de retina, se essa distribuição se mantém no desenvolvimento da cultura e se o tratamento com luzindole ($10\mu\text{M}$) muda o padrão de distribuição dessas subunidades. Foram utilizados anticorpos monoclonais contra as subunidades $\alpha 8$ (mab305) e $\alpha 3$ (mab315). As subunidades $\alpha 3$ (Fig. 9) e $\alpha 8$ (Fig. 10) apresentaram distribuição diferencial. Ambos subtipos foram encontrados em culturas de quatro, cinco e seis dias de cultivo. As subunidades $\alpha 3$ estão presentes primordialmente no citoplasma e na membrana celular de pericários e dendritos proximais, enquanto as subunidades $\alpha 8$ estão presentes em corpos celulares, mas principalmente em processos varicosos. Não houve mudança no padrão de distribuição entre as idades estudadas quando as culturas foram tratadas com luzindole.

Figura 9: Imagens digitais obtidas em microscópio confocal de células retinianas com quatro e seis dias de cultivo, marcadas com anticorpo monoclonal contra a subunidade $\alpha 3$ e visualizadas com TRITC (acima) ou FITC (abaixo), respectivamente na ausência ou presença de luzindole (Lu).

$\alpha 3$

Figura 10: Imagens digitais obtidas em microscópio confocal de células retinianas com quatro e seis dias de cultivo, marcadas com anticorpo monoclonal contra a subunidade $\alpha 8$ e visualizadas com TRITC na ausência (acima) ou presença (abaixo) de luzindole (Lu).

$\alpha 8$

O tratamento com luzindole (10 μ M), do segundo ao sexto dia de cultivo não modificou o conteúdo de proteína da cultura. Obteve-se para o controle $0,57 \pm 0,04$ mg/ml e para luzindole $0,51 \pm 0,05$ mg/ml. Também não houve alteração de distribuição de subunidades $\alpha 3$ ou $\alpha 8$, contudo luzindole inibiu de modo dependente de concentração o aumento da velocidade de acidificação extracelular produzido por acetilcolina (1mM) em culturas de cinco e seis dias de cultivo (Fig. 11).

Figura 11: Células de retina de embrião de pinto com cinco e seis dias de cultivo, em presença de luzindole desde o segundo dia de cultivo, ●. Inibição, dependente da concentração de luzindole, do aumento da velocidade de acidificação extracelular basal das células produzido por ACh (1mM), ○. Cada ponto representa média $\pm$ epm, n= 3.

Alta concentração de luzindole (100 μM) não modificou a velocidade de acidificação extracelular induzida por acetilcolina em células cultivadas por quatro dias, semelhante ao ocorrido quando as células foram tratadas com α -BTX (Fig. 12).

Figura 12: Efeito do tratamento com luzindole (100 μM), ou α -BTX (0,01 μM), ou ambos sobre a curva dose-resposta de ACh em C4 e C5. Cada ponto representa média $\pm$ epm, n = 3.

Em culturas de cinco dias de cultivo, a inibição produzida por luzindole (100 μ M) na velocidade de acidificação extracelular e a inibição produzida por α -BTX não foram aditivas, indicando que receptores de melatonina e receptores sensíveis a α -BTX encontram-se nas mesmas células (Fig. 12).

Figura 13: Decurso temporal do efeito inibitório do bloqueio de receptores de melatonina sobre o aumento da velocidade de acidificação extracelular produzido por acetilcolina, em células de retina com cinco dias de cultivo. Entre parênteses, a idade da cultura quando foi administrado luzindole (10 μ M). Cada ponto representa média $\pm$ epm, n =3 e p<0,01 (**), em relação ao controle.

O efeito inibitório do luzindole (10 μ M) nas culturas cultivadas por cinco dias foi dependente do tempo de incubação, sendo de valor maior quando aplicado no segundo dia ou a partir do terceiro dia de cultivo (inibição de 47,55 $\pm$ 3,37%, n = 3) (Fig. 13). Quando o tratamento foi realizado por 24h, do terceiro para o quarto dia de cultivo, o resultado foi semelhante a quando se

incubava com luzindole a partir do quarto dia, respectivamente $29,55 \pm 9,7\%$ (n=4) e $22,68 \pm 5,13\%$ (n = 3).

A investigação sobre uma possível alteração nos parâmetros de ocupação de receptores nicotínicos por α -BTX, em células retinianas em cultura tratadas cronicamente com luzindole, foi feita nos experimentos de associação de [125 I] α -BTX na concentração cerca de duas vezes o valor do Kd para células intactas de retina de embriões de oito dias com cinco dias de cultivo (10nM), utilizada nos experimentos funcionais à temperatura de 37°C (Fig. 14).

Figura 14: Decurso temporal da ligação de [125 I] α -BTX (10 nM) em células intactas de retina de embriões de oito dias com cinco dias de cultivo, tratadas ou não com luzindole (10 μ M), desde o terceiro dia de cultivo, $r^2 = 0,73$ (controle) e 0,74 (luzindole), n = 3.

Nesses ensaios, o equilíbrio da ligação de [125 I] α -BTX foi alcançado aos 60 minutos, e os valores encontrados para a constante de associação no intervalo de 10 a 60 minutos, para C5 foram $K+1 = 0,036 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ("slope" = $0,027 \pm 0,010$) e para C5 tratado cronicamente com luzindole, $K+1 = 0,029$

$10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ("slope" = $0,022 \pm 0,006$). Não há alteração do número de sítios (Be, controle, $129,5 \pm 55,5$ e Be, luzindole, $115,3 \pm 32,58$; $p > 0,05$).

O bloqueio de receptores de melatonina com luzindole não refletiu na cinética de associação de [^{125}I] α -BTX (10nM) e não alterou o número de sítios de [^{125}I] α -BTX. Portanto, a inibição promovida pelo bloqueio de receptores de melatonina parece tratar-se ou de um efeito indireto (via outro sistema de neurotransmissão), ou o tratamento com o luzindole mantém esses receptores inativos. Na retina podem estar ocorrendo simultaneamente as duas coisas.

V- DISCUSSÃO

V.1- Caracterização dos receptores nicotínicos de acetilcolina no desenvolvimento de células de retinas de pinto em cultura

A expressão das subunidades formadoras de receptores nicotínicos de acetilcolina no desenvolvimento da retina de pinto tem sido muito bem documentada (Hamassaki-Britto e cols., 1994; Gotti e cols., 1994; Matter e cols., 1995; Gardino e cols., 1996), entretanto esse é o primeiro trabalho mostrando a atividade desses receptores medida por microfisiometria no desenvolvimento da retina de pinto em cultura.

O efeito da acetilcolina sobre a velocidade de acidificação extracelular basal de neurônios retinianos é dependente do estágio de desenvolvimento das culturas. Houve aumento de resposta máxima entre os dias de cultivo quatro e cinco. O efeito máximo ocorreu em C5 e C6. A baixa resposta a acetilcolina observada em C8, deveu-se a morte neuronal e proliferação de glias, característica do período de desenvolvimento da cultura (Sampaio e Paes de Carvalho, 1998).

O fato de não haver alteração de pD_2 indicaria predomínio de receptores com a mesma afinidade aparente ao ligante acetilcolina no efeito observado, entretanto, a microfisiometria é uma medida indireta da atividade de receptores, e, no caso das culturas utilizadas, trata-se de um sistema heterogêneo de neurônios, envolvendo múltiplos sistemas de neurotransmissão. As diferenças de eficácia (resposta máxima) da acetilcolina, sugerem o envolvimento de sistemas de neurotransmissão diferentes, ou receptores

nicotínicos diferentes na resposta a cada idade. Receptores muscarínicos de acetilcolina que poderiam fazer parte desse grupo de receptores foram descartados pela presença de atropina (1 μ M) em todos os experimentos.

Alpha-BTX não teve efeito sobre a resposta à acetilcolina em culturas de quatro dias de cultivo. Mecamilamina inibiu o efeito máximo somente na concentração de 100 μ M, enquanto dihidro- β -eritroidina promoveu inibição concentração-dependente a partir de 10 μ M, do efeito da acetilcolina em culturas de quatro dias. A faixa de potência da dihidro- β -eritroidina foi próxima a encontrada para bloquear o efluxo de rubídio em células HEK transfetadas com receptor $\alpha 3\beta 4$ (20 μ M), no entanto, como esse efluxo de rubídio também foi bloqueado por 10 μ M de mecamilamina é improvável que esse receptor seja o responsável pelo efeito máximo da acetilcolina observado. Nesse mesmo sistema (células HEK), a concentração de dihidro- β -eritroidina para bloquear o efluxo de rubídio (20 μ M) foi cerca de 10 vezes menor que a encontrada para o deslocamento de [3 H] epibatidina ($K_i > 200\mu$ M), mostrando que esse antagonista distingue entre dois estados de um mesmo receptor, como a passagem do estado de repouso para o estado dessensibilizado, por prolongada exposição ao agonista, encontrado nos experimentos de ocupação (Xiao e cols., 1998). Para receptores formados de subunidade $\alpha 6$, o K_i obtido para dihidro- β -eritroidina em experimento de deslocamento de [3 H] epibatidina, foi de 2,5 μ M (Vailati e cols., 1999). Caso essa população de receptores fosse responsável pela resposta inibitória à acetilcolina, nessa idade da cultura, seria esperado bloqueio em concentração abaixo de 2,5 μ M. Portanto, a população de receptores nicotínicos responsável pelo aumento da velocidade de acidificação

basal em resposta a acetilcolina em culturas de quatro dias é mais sensível a dihidro- β -eritroidina (μM) que a mecamilamina e pode conter principalmente subunidades $\alpha 3$, formando receptores diferentes de $\alpha 3\beta 4$. A falta de resposta perceptível por microfisiometria à administração de mecamilamina e dihidro- β -eritroidina em culturas de cinco dias deveu-se ao predomínio de outros receptores como responsáveis pela resposta à acetilcolina observada nessa idade.

Alpha-BTX inibe a liberação de dopamina estimulada por nicotina sistêmica (Fu e cols., 2000), a retração de neuritos induzida por acetilcolina ou nicotina em neurônios do gânglio ciliar de pintos em cultura (Pugh e Berg, 1994), a resposta eletrofisiológica à nicotina de receptores $\alpha 7$ de ratos transfectados em oócitos de *Xenopus* (Kempsil, 1999) e o efeito da acetilcolina sobre a acidificação extracelular medido por microfisiometria em células retinianas de pinto com cinco ou seis dias de cultivo (presente trabalho). Esse resultado indica a participação de receptores dos tipos formados por $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 7\alpha 8$ no efeito máximo da acetilcolina observado em culturas com 5 e 6 dias de cultivo, que não se encontravam ativos ao quarto dia.

A possibilidade de haver aumento de número de sítios de α -BTX, do quarto para o quinto dia de cultivo foi descartada por resultados obtidos nos experimentos de saturação. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostram diminuição do número de sítios de α -BTX em culturas de retina de pinto a partir do quarto dia de cultivo (Betz, 1981; De Pomerai e cols., 1983), oposto do observado no desenvolvimento do embrião, como já descrito. Os valores de K_d encontrados nas duas idades, 17,6 nM (C4) e 5,9 nM

(C5), são semelhantes aos estimados para o receptor $\alpha 8$ em retinas de pinto pós eclosão (5,5 nM) (Gotti e cols., 1997) e em retinas embrionárias (17,2 nM) (Keyser e cols., 1993). O melhor ajuste das curvas de saturação foi o de sítio único sugerindo o predomínio de uma única população de receptores, não sendo detectados o sítio correspondente ao receptor $\alpha 7$ e nem o sítio de alta afinidade do receptor $\alpha 8$ (Gotti e cols., 1997) nessa preparação. Contudo, não podemos descartar a presença desses receptores, mesmo em baixas concentrações, principalmente na cultura de quatro dias.

Nas culturas de quatro dias de cultivo, os parâmetros de ocupação de receptores nicotínicos por [125 I] α -BTX encontrados indicam alto grau de cooperatividade, denotando sítios em diferentes estados de afinidade a [125 I] α -BTX, o mesmo não acontecendo com culturas de cinco dias, onde o $nH = 2,70 (\pm 1,40)$ é compatível com o dito pela literatura de que para cada receptor nicotínico ligam-se duas moléculas tanto do ligante endógeno acetilcolina quanto do antagonista α -BTX (Wonnacot, 1986; Lippiello, 1987). Nos experimentos de associação, a ocupação total dos sítios de α -BTX nas culturas de quatro dias foi alcançada na metade do tempo em relação à ocupação máxima de sítios nas culturas de cinco dias de cultivo, a qual foi de 60 minutos tanto em concentração abaixo do K_d quanto em concentração saturante. Esse resultado indica que, nas culturas de quatro dias, o grau de cooperatividade da ocupação de receptores nicotínicos por [125 I] α -BTX é maior do que nas de cinco dias.

Quando ocorre cooperatividade o K_d não depende do número de sítios porque a relação entre K_d e B_{max} deixa de ser linear (Lippiello, 1987). Por esse

motivo, pode-se inferir que do quarto para o quinto dia de cultivo ocorre mudança de estado de afinidade do grupo de receptores sensíveis α -BTX, onde predominam receptores formados de subunidades $\alpha 8$. Como a eficácia do agonista acetilcolina dobrou do quarto para o quinto dia de cultivo e esse efeito deveu-se a receptores sensíveis a α -BTX, a mudança de afinidade do receptor em questão é acompanhada também da passagem do estado inativo para o estado ativo. Associando com os valores de Kd obtidos em ensaios com receptores imunopurificados de retina, trata-se da passagem do valor de Kd do sítio de baixa afinidade para α -BTX do receptor $\alpha 8$ embrionário (17,2 nM, em Keyser e cols., 1993) para o sítio de baixa afinidade para α -BTX encontrado pós-eclosão (5,5 nM, em Gotti, 1997).

Imunorreatividade para as subunidades $\alpha 3$ foi detectada em dendritos proximais e corpos neuronais, enquanto foi observada imunorreatividade para a subunidade $\alpha 8$ também em corpos neuronais, mas principalmente em prolongamentos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos em retina intacta (Hamassaki-Britto e cols., 1994) e com os de Vogel e Nirenberg (1976), que mediram por autorradiografia a ligação de [125 I] α -BTX no desenvolvimento de retinas de pinto intactas e em cultura de células de retina em agregado. Nesse trabalho a distribuição de sítios para [125 I] α -BTX foi predominantemente na camada plexiforme interna e nas culturas, em prolongamentos. Na retina intacta o número de sítios aumentou depois do início do período de formação de sinapses (ao décimo terceiro dia embrionário), principalmente na retina interna. Nas culturas de células de retina aqui utilizadas essas sinapses estariam se formando ao quarto dia de cultivo.

V.2- Investigação da ocorrência de modulação de receptores nicotínicos por melatonina endógena

Na retina e no núcleo supraquiasmático encontram-se os principais osciladores circadianos. Na retina, o oscilador está localizado nos fotorreceptores e a atividade da NAT não apresenta diferença entre claro-escuro no oitavo dia embrionário de pintos (Iuvone, 1990; Bernard e cols., 1997), quando foram feitas as culturas utilizadas nesse trabalho. Mesmo em culturas de retina, com predomínio de fotorreceptores, não é observado ritmo na atividade da NAT (Grève e cols., 1999). Entretanto, são encontrados receptores ativos de melatonina em cultura de retina de pinto (Iuvone e Gan, 1994).

O conteúdo de proteína das culturas e o arranjo das células em cultura não foram alterados pelo tratamento com luzindole, indicando que esse tratamento não está ocasionando morte celular, ou alteração grosseira na distribuição geral das células. Esse dado está de acordo com outro trabalho que mostra que a ação da melatonina na sobrevivência de neurônios não ocorre via receptor de membrana (Skaper e cols. 1998).

Luzindole inibiu a eficácia da acetilcolina (1mM) na mesma faixa de concentração em que inibiu a mobilização de fosfoinosítídeo de membrana em fatias de cérebro de pinto, efeito esse atribuído ao receptor ML2 (Popova e Dubocovich, 1995), atual *MT3/QR2* o qual é bloqueado por luzindole em doses acima de 1 μ M (Nosjean, 2001).

A diminuição da eficácia da acetilcolina nas culturas onde os receptores de melatonina foram cronicamente bloqueados com luzindole foi dependente da

concentração e do tempo de incubação com esse antagonista, mas ocorreu somente em culturas de cinco dias, com magnitude semelhante à inibição observada para α -BTX, não havendo efeito aditivo quando as duas substâncias foram co-administradas. Portanto a diminuição da eficácia da acetilcolina pelo tratamento com luzindole ocorre por fatores localizados nas mesmas células que receptores sensíveis a α -BTX.

Do quarto para o quinto dia de cultivo observou-se aumento da eficácia da acetilcolina. O tratamento com luzindole interferiu nessa janela de desenvolvimento, inibindo significativamente a resposta à acetilcolina quando administrado nas primeiras doze horas do quarto dia ou nas doze horas restantes, mas apresentando efeito inibitório máximo quando administrado desde o final do terceiro dia de cultivo. Como o quarto dia de cultivo corresponderia ao período de formação de sinapses na retina intacta, seria possível sugerir que outras vias de neurotransmissão, além da colinérgica, estejam envolvidas na eficácia da acetilcolina e que o bloqueio de receptores de melatonina com luzindole esteja interferindo na formação dessas sinapses. Contudo, em uma investigação bastante preliminar dessa hipótese, não houve mudança no padrão de distribuição das subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 8$ quando as culturas foram tratadas com luzindole, em nenhuma das duas idades observadas. Também não houve diminuição do número de sítios de [125 I] α -BTX, ou da constante de associação, ao quinto dia de cultivo com as culturas tratadas com luzindole desde o terceiro dia.

Uma possibilidade interessante para explicar a diminuição da eficácia da acetilcolina, quando as culturas foram tratadas cronicamente com luzindole,

baseia-se no fato de que o bloqueio crônico de receptores de melatonina com luzidole pode estar provocando um estado de claro-constante na retina, para todas as ações da melatonina via receptor de membrana, que passam a estar inibidas.

Em culturas de células de retina ocorre liberação tônica de acetilcolina (Lipton, 1988 b) e melatonina inibe a liberação de acetilcolina na retina, em concentrações fisiológicas (Mitchell e Redburn, 1991). O bloqueio crônico de receptores de melatonina aumentaria a liberação de acetilcolina e não interferiria com a atividade de receptores formados por subunidades $\alpha 3$ e $\alpha 6$, menos sensíveis a dessensibilização. Contudo, receptores sensíveis a α -BTX (Whiteaker e cols., 1998) como o receptor $\alpha 8$, que é tão sensível quanto o $\alpha 7$, a exposição continuada ao agonista (Brioni e cols., 1997), se tornariam inativos. Além disso, melatonina aumenta a captação de cálcio em sinaptossomas de retina (Faillace e cols., 1996 b). Este efeito estaria inibido pelo tratamento crônico com luzindole, do mesmo modo que a mobilização de fosfoinosítídeo de membrana por melatonina (Popova e Dubocovich, 1995) estaria inibida, o que, somado, diminuiria a atividade da enzima PKC (Mosior e Epan, 1997), responsável pelo retorno do receptor ao estado de repouso (Eilers e cols., 1997). A liberação de glutamato, que é aumentada na retina por melatonina (Faillace e cols., 1996 b), estaria inibida pelo bloqueio de receptores de melatonina e porque os receptores sensíveis a α -BTX, localizados em células bipolares e ganglionares (Keyser e cols., 1993), cuja ativação libera glutamato (Schmidt, 1988; Brioni e cols., 1997), estão inativos. Esse modelo pode incluir o aumento da liberação de dopamina, pelo bloqueio da inibição melatoninérgica

(Dubocovich, 1988). A dopamina também diminuiria a resposta, por bloquear receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Do Nascimento e cols., 1998).

Em resumo, o aumento da velocidade de acidificação extracelular basal de células de retinas de embriões de pinto de oito dias em cultura, por ação do agonista acetilcolina, é dependente do desenvolvimento da cultura. O bloqueio crônico de receptor de melatonina com luzindole não muda a distribuição de subunidades $\alpha 8$, nem a constante de associação e o tempo de equilíbrio da ligação de [^{125}I] α -BTX, bem como não muda o número de sítios de ligação de [^{125}I] α -BTX. A inibição da eficácia da acetilcolina pelo antagonista de receptor de melatonina luzindole ao quinto e sexto dias de cultivo provavelmente se deve a inibição de outra via de neurotransmissão, que co-localiza com receptores nicotínicos sensíveis a α -BTX, como a glutamatérgica.

VI- CONCLUSÕES

VI.1- Acetilcolina aumenta a velocidade de acidificação extracelular basal de células retinianas de embriões de pinto de oito dias em cultura. Esse efeito:

- é maior em células cultivadas por cinco e seis dias em relação às cultivadas por quatro dias.
- no quarto dia de cultivo, se deve principalmente a receptores nicotínicos de acetilcolina sensíveis a concentrações de dihidro- β -eritroidina acima de 10 μ M.
- no quinto e sexto dia de cultivo é inibido por α -BTX.

VI.1.2- A ocupação de receptores nicotínicos de acetilcolina por [125 I] α -BTX em culturas de células de retina de embriões de pinto de oito dias cultivadas por quatro dias foi caracterizada por menor afinidade, maior número de sítios e alto grau de cooperatividade, quando comparada com culturas de cinco dias, onde a afinidade foi maior, o número de sítios foi menor e o nH foi compatível com duas moléculas de [125 I] α -BTX para cada receptor. Em ambos os casos os valores de Kd encontrados correspondem ao do receptor formado de subunidades α 8 na retina.

VI.2- O aumento da velocidade de acidificação extracelular basal de células retinianas de embriões de pinto de oito dias em cultura induzido por acetilcolina, no quinto e sexto dia de cultivo, é inibido quando as culturas são tratadas cronicamente com luzindole,

- de modo dependente do tempo de incubação e da concentração desse antagonista.
- sem apresentar inibição adicional àquela produzida por α -BTX, sugerindo co-localização de receptores nicotínicos de acetilcolina e receptores de melatonina.
- sem alterar o padrão de distribuição da subunidade $\alpha 3$ ou da subunidade $\alpha 8$.
- sem interferir no número de sítios ou na constante de associação $K+1$ da ligação de [125 I] α -BTX (10nM) em células de retinas de embriões de pinto de oito dias cultivadas por cinco dias.

VII- BIBLIOGRAFIA

AGUI, T.; CHASE, T.N.; KEBABIAN, J.W. Identification of D₁ dopamine receptor in chicken embryo retina with [¹²⁵I] SCH 23982. *Brain Research*, v. 452, p. 49-56, 1988.

ADACHI, A.; SUZUKI, Y.; NOGI, T.; EBIHARA, S. The relationship between ocular melatonin and dopamine rhythms in the pigeon: effects of melatonin inhibition on dopamine release. *Brain Research*, v. 815, p. 435-440, 1999.

ARIEL, M.; DAW, N. Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells. *Journal of Physiology*, v. 324, p. 135-160, 1982.

ARIAS, H.R. Noncompetitive inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by endogenous molecules. *Journal of Neuroscience Research*, v. 52, p. 369-379, 1998.

AVENDANO, G.; BUTLER, B.J.; IUVONE, P.M. K⁺-evoked depolarization increases serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. Involvement of calcium influx through L-type calcium channels. *Neurochemistry International*, v. 17, p. 117-126, 1990.

AYRE, E.A.; YUAN, H.; PANG, S.F. The identification of ¹²⁵I-labelled iodomelatonin-binding sites in the testes and ovaries of the chicken (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology*, v. 133, p. 5-11, 1992.

BARAJAS-LÓPEZ, C.; PERES, A.L.; ESPINOSA-LUNA, R.; REYES-VÁZQUEZ, C.; PRIETO-GÓMEZ, B. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *European Journal Pharmacology*, v. 312, p. 319-325, 1996.

BERNARD, M.; IUVONE, P.M.; CASSONE, V.M.; ROSEBOOM, P.H.; COON, S.L.; KLEIN, D.C. Avian melatonin synthesis: Photoc and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *Journal of Neurochemistry*, v. 68, p. 213-224, 1997.

BETZ, H. Characterization of the α -bungarotoxin receptor in chick-embryo retina. *European Journal of Biochemistry*, v. 117, p. 131-139, 1981.

BETZ, H. Regulation of α -bungarotoxin receptor accumulation in chick retina cultures: Effects of membrane depolarization, cyclic nucleotide derivatives, and Ca²⁺. *Journal of Neuroscience*, v. 3, p. 1333-1341, 1983.

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: Informação e Documentação – Referências –
Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. 22p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, M.S.; HAYDON, D.A. The effects of short-chain phospholipids on the acetylcholine-activated ion channel. *Pflugers Archiv*, v. 418, p. 62-67, 1991

BRITTO, L.R.; HAMASSAKI-BRITTO, D.E.; FERRO, E.S.; KEYSER, K.T.; KARTEN, H.J.; LINDSTROM, J.M. Neurons of the chick brain and retina expressing both α -bungarotoxin-sensitive and α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors: an immunohistochemical analysis. *Brain Research*, v. 590, p. 193-200, 1992.

BRIONI, J.D.; DECKER, M.W.; SULLIVAN, J.P.; ARNERIC, S.P. The Pharmacology of (-)-nicotine and novel cholinergic channel modulators. *Advances in Pharmacology*, v. 37, p. 153-215, 1997.

CAHILL, G.M.; BESHARSE, J.C. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 86, p. 1098-1102, 1989.

CAHILL, G.M.; BESHARSE, J.C. Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: Limitation by serotonin availability. *Journal of Neurochemistry*, v. 54, p. 716-719, 1990.

CAHILL G.M.; BESHARSE J.C. Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina, *Visual Neuroscience*, v. 8, p. 487-90, 1992.

CAHILL, G.M.; BESHARSE, J.C. Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron*, v. 10, p. 573-577, 1993.

CARBONETTO, S.T.; FAMBROUGH, D.M.; MULLER, K.J. Nonequivalence of α -bungarotoxin receptors and acetylcholine receptors in chick sympatetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 75, p. 1016-1020, 1978.

CARNEIRO, R.C.G.; MARKUS, R.P. Presynaptic nicotinic receptors involved in release of noradrenaline and ATP from the prostatic portion of the rat vas deferens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 255, p. 95-100, 1990.

CARNEIRO, R.C.G.; MARKUS, R.P.; DUBOCOVICH, M.L. Presynaptic modulation by melatonin of the nicotine-induced calcium-dependent release of norepinephrine from rat vas deferens. *Biological Signals*, v. 2, p. 199-206, 1993.

CARNEIRO, R.C.G.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R.P. Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 259, p. 614-619, 1991.

CARNEIRO, R.C.G.; TOFFOLETO, O.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R.P. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *European Journal of Pharmacology*, v. 257, p. 73-77, 1994.

CLEMENTI, F.; FORNASARI, D.; GOTTI, C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 3-10, 2000.

COULOMBRE, A. J. Correlation of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *American Journal of Anatomy*, v. 96, p. 153-188, 1955.

DEROUICHE, A.; ASAN, E. The dopamine D₂ receptor subfamily in rat retina: ultrastructural immunogold and in situ hybridization studies. *European Journal of Neuroscience*, v. 11; p. 1391-1402, 1999.

DE MELLO, M.C.F.; VENTURA, A.L.M.; PAES DE CARVALHO, R.; DE MELLO, F.G. Regulation of dopamine -and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 79, p. 5708-5712, 1982.

DE POMERAI, D.I.; KOTECHEA, B.; FLOR-HENRY, M.; FULLICK, C.; YOUNG, A.; GALI, M.A.H. Expression of differentiation markers by chick embryo neuroretinal cells in vivo and in culture. *The Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v. 77, p. 201-220, 1983.

DO NASCIMENTO, J.L.M.; KUBRUSLY, R.C.C.; REIS, R.A.M.; DE MELLO, M.C.F.; DE MELLO, F.G. Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 343, p. 103-110, 1994.

DUBOCOVICH, M.L. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*, v. 306, p. 782-784, 1983.

DUBOCOVICH, M.L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 16, p. 50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M.L. Lunzidole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 246, p. 902-910, 1988.

DUARTE, C.B.; FERREIRA, I.L.; SANTOS, P.F.; CARVALHO, A.L.; AGOSTINHO, P.M.; CARVALHO, A.P. Glutamate in life and death of retinal amacrine cells. *General Pharmacology*, v. 30, p. 289-285, 1998.

EBISAWA, T.; KARNE, S.; LERNER, M.R.; REPPERT, S.M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 6133-6137, 1994.

EHINGER, B.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J.; DOWLING, J.E. Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Neurobiology*, v. 85, p. 8321-8325, 1988.

EILERS, H.; SCHAEFFER, E.; BICKLER, P.E.; FORSAYETH, J.R. Functional deactivation of the major neuronal nicotinic receptor caused by nicotine and protein kinase C- dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*, v. 52, p. 1105-1112, 1997.

FAILLACE, M.P.; SARMIENTO, M. I. K.; ROSENSTEIN, R.E. Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Research*, v. 711, p. 112-117, 1996 a.

FAILLACE, M.P.; SARMIENTO, M. I. K.; ROSENSTEIN, R.E. Melatonin effect on [³H] glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *Journal of Neurochemistry*, v. 67, p. 623-628, 1996 b.

FENSTER, C.P.; BECKMAN, M.L.; PARKER, J.C.; SHEFFIELD, E.B.; WHITWORTH, T.L.; QUICK, M.W.; LESTER, R.A.J. Regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C. *Molecular Pharmacology*, v. 55, p. 432-433, 1999.

FU, Y.; MATTA, S.G.; GAO, W.; SHARP, B.M. Local α -bungarotoxin-sensitive receptors in the nucleus accumbens modulate nicotine-stimulated dopamine secretion in vivo. *Neuroscience*, v. 101, p. 369-375, 2000.

FUJIEDA, H.; HAMADANIZADEH, S.A.; WANKIEWICZ, E.; PANG, S.F.; BROWN, G.M. Expression of mt_1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*, v. 93, p. 793-799, 1999.

GARDINO, P.F.; CALAZA, K.C.; HAMASSAKI-BRITTO, D.E.; LINDSTRON, J.M.; BRITTO, L.R.G.; HOKOÇ, J.N. Neurogenesis of cholinceptive neurons in the chick retina. *Developmental Brain Research*, v. 95, p. 205-212, 1996.

GOTTI, C.; MORETTI, M.; MAGGI, R.; LONGHI, R.; BRICINI, L.; BALESTRA, B.; CLEMENTI, F. Expression of α -bungarotoxin receptor subtypes in chick central nervous system during development. *Journal of Receptor Research*, v. 14, p. 335-346, 1994.

GOTTI, C.; MORETTI, M.; MAGGI, R.; LONGHI, R.; HANKE, W.; KLINKE, N.; CLEMENTI, F. $\alpha 7$ and $\alpha 8$ Nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *European Journal of Neuroscience*, v. 9, p. 1201-1211, 1997.

GOTTI, C.; CARBONNELLE, E.; MORETTI, M.; ZWART, R.; CLEMENTI, F. Drugs selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream? *Behavioural Brain Research*, v. 113, p. 183-192, 2000.

GRACE, M.S.; CAHILL, G.M.; BESHARSE, J.C. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Research*, v. 559, p. 56-63, 1991.

GRACE, M.S.; BESHARSE, J.C. Solubilization and biochemical characterization of the melatonin deacetylase from *Xenopus laevis* retina. *Journal of Neurochemistry*, v. 60, p. 990-999, 1993.

GREEN, C.B.; CAHILL, G.M.; BESHARSE, J.C. Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retinal circadian oscillator in vitro. *Brain Research*, v. 677, p. 283-90, 1995.

GRÈVE, P.; ALONSO-GÓMEZ, A.; BERNARD, M.; MA, M.; HAQUE, R.; KLEIN, D.C.; IUVONE, P.M. Serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in photoreceptor-enriched chicken retinal cell cultures: elevation by cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry*, v. 73, p. 1894-1900, 1999.

HAMASSAKI-BRITTO, D.E.; GARDINO, P.F.; HOKOÇ, J.N.; KEYSER, K.T.; KARTEN, H.J.; LINDSTROM, J.M.; BRITTO, L.R.G. Differential development of α -bungarotoxin-sensitive and α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors in the chick retina. *Journal of Comparative Neurology*, v. 347, p. 161-170, 1994.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v. 88, p. 49-92, 1951.

HASEGAWA M.; CAHILL G. M. Cyclic AMP resets the circadian clock in cultured *Xenopus* retinal photoreceptor layers. *Journal of Neurochemistry*, v. 70, p. 1523-1531, 1998.

IUVONE, P.M. Development of melatonin synthesis in chicken retina: Regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillators and cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry*, v. 54, p. 1562-1568, 1990.

IUVONE, P.M.; GAN, J.; AVENDANO, G. K^+ -evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched retinal cell cultures: role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, v. 57, p. 615-621, 1991.

IUVONE, P.M.; GAN, J. Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *Journal of Neurochemistry*, v. 63, p. 118-124, 1994.

IUVONE, P.M.; GAN, J. Functional interaction of melatonin receptors and D1 dopamine receptors in cultured chick retinal neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 15, p. 2179-2185, 1995.

KE, L.; EISENHOUR, C.M.; BENCHERIF, M.; LUKAS, R.J. Effects of nicotine treatment on expression of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. I. Dose- and time- dependent effects of nicotine treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 286, p. 825-840, 1998.

KEMPSTIL, F.E.J.; COVERNTON, P.J.O.; WHITING, P.J.; CONNOLLY, J.G. Agonist activation and α -bungarotoxin inhibition of wild type and mutant $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of Pharmacology*, v. 383, p. 347-359, 1999.

KEYSER, K.T.; BRITTO, L.R.; SCHOEPPER, R.; WHITING, P.; COOPER, J.; CONROY, W.; BROZOZOWSKA-PRECHTL, A.; KARTEN, H.J.; LINDSTROM, J. Three subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 442-454, 1993.

KLEIN, D.C.; SUGDEN, D.; WELLER, J.L. Postsynaptic β -adrenergic receptors potentiates the α -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 80, p. 599-603, 1983.

KLEIN, D.C.; MOORE, R.Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyl-transferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, v. 174, p. 245-262, 1979.

KOLB, H. The architecture of function neural circuits in the vertebrate retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 35, p. 2385-2404, 1994.

KURYATOV, A.; OXALE, F.A.; CHOI, C.; LINDSTROM, J. Acetylcholine receptor extracellular domain determines sensitivity to nicotine-induced inactivation. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 11-21, 2000.

LAITINEN, J.T.; SAAVEDRA, J.S. The chick retinal melatonin revisited: Localization and modulation of agonists binding with guanine nucleotides. *Brain Research*, v. 528, p. 349-352, 1990.

LEE, P.N.; PANG, S.F. Identification and characterization of melatonin binding sites in the gastrointestinal tract of ducks. *Life Sciences*, v. 50, p. 117-125, 1991.

LIPPIELLO, P.M.; SEARS, S.B.; FERNANDES, K.G. Kinetics and mechanism of L-[³H]nicotine binding to putative high affinity receptor sites in the rat brain. *Molecular Pharmacology*, v. 31, p. 392-400, 1987.

LIPTON, S.A.; FROSCH, M.P.; PHILLIPS, M.D.; TAUCK, D.L.; AIZENMAN, E. Nicotinic antagonists enhance process outgrowth by rat retinal ganglion cells in culture. *Science*, v. 239, p. 1293-1296, 1988 a.

LIPTON, S.A. Spontaneous release of acetylcholine affects the physiological nicotinic responses of rat retinal ganglion cells in culture. *Journal of Neuroscience*, v. 8, p. 3857-3868, 1988 b.

LUKAS, R.J.; CHANGEUX, J-P.; LE NOVÈRE, N.; ALBUQUERQUE, E.X.; BALFOUR, D.J.K.; BERGUE, D.K.; BERTRAND, D.; CHIAPPINELI, V.A.; CLARKE, P.B.S.; COLLINS, A.C.; DANI, J.A.; GRADI, S. R.; KELLAR, K.J.; LINDSTRON, J.M.; MARKS, M.J.; QUIK, M.; TAYLOR, P.W.; WONNACOTT, S. International union of pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews*, v. 51, p. 397-401, 1999.

MARKS, M.J.; KINBERLY, W.; COLLINS, A.C. Differential agonist inhibition identifies multiple epibatidine binding sites in mouse brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 285, p. 377-386, 1998.

MATTER, J.-M.; MATTER-SADZINSKI, L.; BALLIVET, M. Activity of the $\beta 3$ nicotinic receptor promoter is a marker of neuron fate determination during retina development. *Journal of Neuroscience*, v. 15, p. 5919-5928, 1995.

MEISSL, H. Photic regulation of pineal function. Analogies between retinal and pineal photoreception. *Biology of the Cell*, v. 89, p. 549-554, 1997.

MELLER, K. Morphological studies on the development of the retina. *Progress in Retinal Research*, v. 3, p. 1-19, 1984.

MITCHELL, C.K.; REDBURN, D.A. Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. *Visual Neuroscience*, v. 7, p. 479-486, 1991.

MORLEY, B.J. ARIA is heavily expressed in rat peripheral auditory and vestibular ganglia. *Molecular Brain Research*, v. 54, p. 170-174, 1998.

MOSIOR, M.; EPAND, R.M. Protein kinase C: an example of a calcium-regulated protein binding to membranes. *Molecular Membrane Biology*, v. 14, p. 65-70, 1997.

NAKAHARA, K.; MURAKAMI, N.; NASU, T.; KURODA, H.; MURAKAMI, T. Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin-synthesizing capacities in vitro. *Brain Research*, v. 774, p. 242-245, 1997.

NGUYEN-LEGROS, J.; HICKS, D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *International Review of Cytology*, v. 196, p. 245-313, 2000.

NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGÉ, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J.M.; LEFOULON, F.; FAUCHÈRE, J.L.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J.A. Identification of the melatonin binding site *MT3* as the quinone reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 31311-31317, 2000.

NOSJEAN, O.; NICOLAS, J.-P.; KLUPSCH, F.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J.A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 e *MT3*/QR2. *Biochemical Pharmacology*, v. 61, p. 1369-1379, 2001.

OWICKI, J.C.; BOUSSE, L.J.; HAFEMAN, D.G.; KIRK, G.L.; OLSON, J.D.; GARRETWADA, H.; PARCE, J.W. The light-addressable potentiometric sensor: principles and biological applications. *Annual Reviews of the Biophysical and Biomolecular Structure*, v. 23, p. 87-113, 1994.

OXALE, F.; GERZANICH, V.; KURYATOV, A.; WANG, F.; LINDSTRON, J. Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 283, p. 675-683, 1997.

PARKER, M.J.; BECK, A.; LUETJE, C.W. Neuronal nicotinic receptor $\beta 2$ and $\beta 4$ subunits confer large differences in agonist binding affinity. *Molecular Pharmacology*, v. 54, p. 1132-1139, 1998.

PENG, X.; GERZANICH, V.; ANAND, R.; WANG, F.; LINDSTROM, J. Chronic nicotine treatment up-regulates $\alpha 3$ and $\alpha 7$ acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Molecular Pharmacology*, v. 51, p. 776-784, 1997.

PERSENGIEV, S.P. 2- [125 I] iodomelatonin binding sites in rats adrenals: pharmacological characteristics and subcellular distribution. *Life Sciences*, v. 51, p. 647-651, 1992.

POON, A.M.S.; PANG, S.F. 2- [125 I] iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sciences*, v. 50; p. 1719-1726, 1992.

POPOVA, J.S.; DUBOCOVICH, M.L. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *Journal of Neurochemistry*, v. 64, p. 130-138, 1995.

PUGH, P.C.; BERG, D.K.; Neuronal acetylcholine receptors that bind α -bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, v.14, p. 889-896, 1994.

RANKIN, S.E.; ADDONA, G.H.; KLOCZEWIAK, M.A.; BUGGE, B.; MILLER, K.W. The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophysical Journal*, v. 73, p. 2446-2455, 1997.

REMÉ, C.E.; WIRZ-JUSTICE, A.; TERMAN, M. The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *Journal of Biological Rhythms*, v. 6, p. 5-29, 1991.

REPPERT, M.S.; WEAVER, D.R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, v. 13, p. 1177-1185, 1994.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; CASSONE, V.M.; GODSON, C.; KOLAKOWSKI JR, L.F. Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, v. 15, p. 1003-1015, 1995.

REPPERT, S.M. Melatonin receptors: Molecular biology of a New Family of G-protein coupled receptor. *Journal of Biological Rhythms*, v. 12, p. 528-531, 1997.

ROKA, F.; BRYDON, L.; WALDHOER, M.; STROSBERG, A.D.; FREISSMUTH, M.; JOCKERS, R.; NANOFF, C. Tight association of the human Mel_{1a} – melatonin receptor and G_i : precoupling and constitutive activity. *Molecular Pharmacology*, v. 56, p. 1014-1024, 1999.

SAMPAIO, L.F.S.; PAES DE CARVALHO, R. Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. *Neurochemistry International*, v. 33, p. 367-374, 1988.

SCHMIDT, J. Biochemistry of nicotinic acetylcholine receptors in the vertebrate retina. *International Review of Neurobiology*, v. 30, p. 1-38, 1988.

SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in Pharmacological Science*, v. 21, p. 341-346, 2000.

SIMASKO, S.M.; SOARES, J.R.; WEILAND, G.A. Two components of carbamylcholine-induced loss of nicotinic acetylcholine receptor function in the neuronal cell line PC12. *Molecular Pharmacology*, v. 30, p. 6-12, 1986.

SKAPER, S.D.; ANCONA, B.; FACCI, L.; FRANCESCHINI; GIUSTI, P. Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB Journal*. v. 12, p. 725-731, 1998.

SUGDEN, D.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C.; KIRK, K.L.; CREVELING, C.R. Alpha-adrenergic potentiation of beta-adrenergic stimulation of rat pineal N-

acetyltransferase: studies using cirazoline and fluorine analogs of norepinephrine. *Biochemistry Pharmacology*, v. 33, p. 3947-3950, 1984.

TOSINI, G.; MENAKER, M. Circadian Rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, v. 272, p. 419-421, 1996.

TOSINI, G.; MENAKER, M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Research*, v. 789, p. 221-228, 1998.

VAILATI, S.; MORETTI, M.; BALESTRA, B.; MCINTOSH, M.; CLEMENTI, F. E.; GOTTI, C. $\beta 3$ subunit is present in different nicotinic receptor subtypes in chick retina. *European journal of Pharmacology*, v. 393, p. 23-30, 2000.

VAILATI, S.; HANKE, W.; BEJAN, A.; BARABINO, B.; LONGHI, R.; BALESTRA, B.; MORETTI, M.; CLEMENTI, F. E.; GOTTI, C. Functional $\alpha 6$ -containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Molecular Pharmacology*, v. 56, p. 11-19, 1999.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*, v. 78, p. 687-721, 1998.

VISWANATHAN, M.; LAITINEN, J.T.; SAAVEDRA, J.M. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 87, p. 6200-6203, 1990.

VOGEL, Z.; NIRENBERG, M. Localization of acetylcholine receptors during synaptogenesis in retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 73, p. 1806-1810, 1976.

WASSLE, H.; BOYCOTT, B.B. Functional Architecture of Mamalian Retina. *Physiological Reviews*, v. 71, p. 447-480, 1991.

WHITEAKER, P.; SHARPLES, C.G.V.; WONNACOTT, S. Agonist-induced up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Molecular Pharmacology*, v. 53, p. 950-962, 1998.

WHITEAKER, P.; MARKS, M.J.; GRADY, S.R.; LU, Y.; PICCIOTTO, M.R.; CHANGEUX, J.-P.; COLLINS, A.C. Pharmacological and null mutant approaches reveal nicotinic receptor diversity. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 123-135, 2000.

WHITING, P.J.; SCHOEPFER, R.; CONROY, W.G.; GORE, M.J.; KEYSER, K.T.; SHIMASAKI, S.; ESCH, F.; LINDSTRON, J.M. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in brain and retina. *Molecular Brain Research*, v. 10, p. 61-70, 1991.

WONNACOT, S. α -Bungarotoxin binds to low-affinity nicotine binding sites in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 47, p. 1706-1712, 1986.

WU, S.M. Synaptic Transmission in the outer retina. *Annual Reviews of Physiology*, v. 56, p. 141-168, 1994.

UNDERWOOD, H.; BARRETT, R.K.; SIOPE, T. The quail's eye: a biological clock. *Journal of Biological Rhythms*, v. 5, p. 257-265, 1990.

XIAO, Y.; MEYER, E.L.; THOMPSON, J.M.; SURIN A.; WROBLEWISKI, J.; KELLAR, K.J. Rat $\alpha 3/\beta 4$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor stably expressed in a transfected cell line: Pharmacology of ligand binding and function. *Molecular Pharmacology*, v. 54, p. 322-333, 1998.

ZAWILSKA, J.B.; IUOVONE, P.M. Catecholamine receptors regulating serotonin N-acetyltransferase activity and pineal gland: D₂- Dopamine receptors in retina and α -2 adrenergic receptors in pineal gland. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 250, p. 86-92, 1989.

ZAWILSKA, J.B. Melatonin in vertebrate retina: biosynthesis receptors and functions. *Polish journal of Pharmacology and Pharmacy*, v. 44, p. 627-654, 1992.

ZAWILSKA, J.B.; DERBISZEWSKA, T.; SEK, B.; NOWAK, J.Z. Dopamine-dependent cyclic AMP-generating system in chick retina and its relation to melatonin biosynthesis. *Neurochemistry International*, v. 27, p. 535-543, 1995.

ZAWILSKA, J.B.; DERBISZEWSKA, T.; NOWAK, J.Z. Pharmacological modifications in dopaminergic neurotransmission affect the quinpirole-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in chick retina: an impact on dopamine D₄ -like receptors. *Journal of Neural Transmission*, v. 103, p. 1405-1414, 1996.

ZAWILSKA, J.B.; DERBISZEWSKA, T.; NOWAK, J.Z. Prolonged exposure of chicks to light or darkness differentially affects the quinpirole-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in chick retina: An impact on dopamine D₄ -like receptor. *Journal of the Pineal Research*, v. 22, p. 59-64, 1997.