

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE NUTRIÇÃO

Letícia Vicari de Siqueira

A PRIVAÇÃO DIETÉTICA DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 AFETA O
SISTEMA DE TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CONDIÇÕES BASAIS E
ISQUÊMICAS EM RETINA DE RATOS WISTAR

Porto Alegre, 2010.

LETÍCIA VICARI DE SIQUEIRA

A PRIVAÇÃO DIETÉTICA DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 AFETA O
SISTEMA DE TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CONDIÇÕES BASAIS E
ISQUÊMICAS EM RETINA DE RATOS WISTAR

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Nutrição do Curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Nutricionista.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ingrid Dalira Schweigert Perry

Co-orientadora: Prof^ª Ms. Júlia Dubois Moreira

Porto Alegre, 2010.

RESUMO

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, participa do desenvolvimento e fisiologia da retina e, por essa razão, está envolvido nos processos visuais. Porém, o glutamato pode ser neurotóxico quando em níveis aumentados na fenda sináptica, situação em que participa da fisiopatologia de doenças como o glaucoma. Os ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3 (ω 3), principalmente o ácido docosahexaenóico (DHA), são essenciais para o desenvolvimento e diferenciação das células da retina e para adequada acuidade visual, bem como conferem proteção contra danos às células retinianas. Neste estudo, investigou-se a influência dos ácidos graxos ω 3 presentes na alimentação em parâmetros relativos ao funcionamento do sistema glutamatérico (captação de [3 H]glutamato e conteúdo dos principais transportadores deste neurotransmissor) em retina de ratos Wistar em condições basais e de isquemia. Ratos Wistar machos (60 dias de vida) foram submetidos a duas dietas: dieta adequada em ω 3 (grupo ω 3) e dieta deficiente em ω 3 (grupo D). A isquemia na retina foi obtida por meio do bloqueio do fluxo sanguíneo através de aumento da pressão intraocular (140 - 180mmHg por 45 min) em um dos olhos de cada animal, mimetizando um dos mecanismos patológicos do glaucoma. Avaliou-se a captação de [3 H]glutamato e o imunocontéudo dos transportadores GLAST, GLT-1, EAAC1 e EAAT5 sete dias após a isquemia. Com relação aos níveis basais, o grupo D apresentou menor captação de [3 H]glutamato na retina quando comparado ao ω 3 basal e isquêmico, enquanto que o imunocontéudo de GLT-1 foi menor no grupo D quando comparado ao ω 3 tanto isquêmico quanto basal. Após a isquemia, o grupo D teve uma diminuição na captação de [3 H]glutamato, ao passo que o grupo com dieta adequada em ω 3 (grupo ω 3) manteve seus níveis estáveis. Verificou-se também, no grupo D, um imunocontéudo maior de GLT-1 após a isquemia, embora ainda com níveis menores deste transportador se comparado ao ω 3 isquêmico. Para o grupo ω 3, não se verificaram mudanças no imunocontéudo de GLT-1 após a isquemia. A expressão do transportador EAAC1 sofreu um aumento nos dois grupos após a isquemia em relação ao basal de ambos. O imunocontéudo de GLAST e EAAT5 não sofreu influência da dieta ou da isquemia. Os ácidos graxos ω 3 presentes na dieta foram capazes de modular os transportadores de glutamato em condições basais e isquêmicas, e este é um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos ω 3 exercem sua neuroproteção.

Palavras-chave: Isquemia. Retina. Transportadores de glutamato. Ácidos graxos ômega-3.

ABSTRACT

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the Central Nervous System (CNS), participates of the retinal development and physiology, being involved in the visual processes. Nevertheless, glutamate may be neurotoxic when it exceed the physiological levels in the synaptic cleft, participating of the physiopathology of retinal diseases such as glaucoma. The ω 3 polyunsaturated fatty acids, mainly the docosahexaenoic acid (DHA), are essential for the retinal cells development and differentiation as well as visual acuity, and presenting a protective action against retinal cell damage. In this study, the influence of dietary ω 3 polyunsaturated fatty acids on parameters related to glutamatergic system functionality ($[^3\text{H}]$ glutamate uptake and immunocontent of the major glutamate transporters) was evaluated, in basal and ischemic conditions. Wistar male adult rats (60 days old) were submitted to two different diets: adequate ω 3 diet (ω 3 group) and deficient ω 3 diet (D group). Retinal ischemia was obtained by blood blockade through intraocular pressure increase (140 - 180mmHg during 45 minutes) in one of the eyes of each animal, which mimics one of the pathologic mechanisms of glaucoma. It was evaluated $[^3\text{H}]$ glutamate uptake and the immunocontent of the glutamate transporters GLAST, GLT-1, EAAC1 and EAAT5 seven days after ischemia. In relation to basal levels, the D group showed a decrease in retinal $[^3\text{H}]$ glutamate uptake when compared to the basal and ischemic ω 3 group, while the GLT-1 content was reduced in D group when compared to basal and ischemic ω 3 groups. After the ischemia, the D group presented a decrease in the $[^3\text{H}]$ glutamate uptake, which was not observed in ω 3 group. D group showed an increased GLT-1 content after ischemia, but with a reduced content when compared to ischemic ω 3 group. However, ω 3 group presented no alterations in the GLT-1 content after ischemia. EAAC1 content was increased in both groups after ischemia in relation to the basal levels. GLAST and EAAT5 content presented no alterations by diets or ischemia. The dietary ω 3 fatty acids were capable of modulate the glutamate transporters either in basal and ischemic conditions, and these may be one of the mechanisms by which the ω 3 polyunsaturated fatty acids exert their neuroprotection.

Key-words: Ischemia. Retina. Glutamate transporters. Omega-3 fatty acids.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – ácido α -linolênico

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ARA – ácido araquidônico

DHA - ácido docosaexaenóico

DPA - ácido docosapentaenóico

EPA - ácido eicosapentaenóico

EPR - epitélio pigmentar da retina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GluRs – receptores glutamatérgicos

GTP – guanosina trifosfato

iGluRs – receptores glutamatérgicos ionotrópicos

LA – ácido linoléico

LC-PUFAs - *long chain polyunsaturated fatty acids* (ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa)

LTP – long-term potentiation (potenciação de longa duração)

mGluRs – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

NMDA - N-metil-D-aspartato

NPD1 - neuroprotectina D1

PUFAs - *polyunsaturated fatty acids* (ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa)

SNC - sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ESSENCIAIS	7
1.1.1 Ômega-3 PUFAs e o sistema nervoso central	10
1.1.2 DHA e retina	11
1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E RETINA.....	12
1.2.1 Sistema glutamatérgico e os ácidos graxos ômega-3	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 ARTIGO CIENTÍFICO	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 METODOLOGIA.....	22
3.2.1 Animais	22
3.2.2 Dietas	23
3.2.3 Isquemia na retina	24
3.2.4 Captação de [³H]Glutamato	24
3.2.5 Western Blot	25
3.2.6 Análise estatística	25
3.3 RESULTADOS	25

3.4 DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS	29
LEGENDAS DAS FIGURAS	33
TABELAS	35
FIGURAS	37
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A - Normas para publicação - Experimental Eye Research - Elsevier	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ESSENCIAIS

No fim da década de 20, dois pesquisadores, ao observar alterações em indivíduos que não consumiam gorduras na sua dieta, constataram que havia compostos essenciais para a saúde do organismo (BURR e BURR, 1929). Desde então, os ácidos graxos essenciais vêm sendo estudados, porém, somente na década de 70 houve maior evolução nos estudos com ácidos graxos essenciais $\omega 3$.

Ácidos graxos com duas ou mais ligações duplas em sua estrutura são chamados poli-insaturados. Sua nomenclatura leva em consideração o número de carbonos e de insaturações da molécula e a posição da primeira ligação dupla em relação à extremidade do grupamento metil, esta última simbolizada por ω . Os ácidos graxos com ligações duplas nos carbonos ômega-6 ($\omega 6$) e ômega-3 ($\omega 3$) são essenciais ao bom funcionamento do organismo de mamíferos, inclusive os seres humanos. Porém, não podem ser sintetizados endogenamente, razão pela qual devem estar presentes na alimentação para que sejam utilizados pelos tecidos corporais. São eles os ácidos linoléico (LA 18:2 $\omega 6$) e α -linolênico (ALA 18:3 $\omega 3$) (CALDER e YAGOOB, 2009). Pela ação de enzimas específicas no fígado, estes dão origem a ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs, do inglês *long chain polyunsaturated fatty acids*), compostos que têm um importante papel no processo inflamatório e de defesa do organismo (HAAG, 2003).

O ácido graxo linoléico é reconhecido como nutriente essencial há bastante tempo (BURR e BURR, 1929; HANSEN et al., 1962). Este ácido graxo é amplamente encontrado em óleos vegetais e pode ser convertido em ácido araquidônico (ARA 20:4 $\omega 6$). O ARA é abundante nos fosfolipídios das membranas celulares e é de extrema relevância imunológica, à medida em que dá origem a mediadores inflamatórios como os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos). Alguns dos sintomas da deficiência deste ácido graxo são retardo de crescimento, lesões de pele, insuficiência reprodutora, esteatose hepática e polidipsia (MARSZALEK e LODISH, 2005).

Já o ácido graxo α -linolênico somente foi reconhecido como nutriente essencial há poucas décadas (HEIRD e LAPILLONNE, 2005). Ele está presente em óleos vegetais como os de

linhaça, canola e soja. Deste ácido graxo derivam o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5 ω 3) e ácido docosaexaenóico (DHA 22:6 ω 3), PUFAs que também estão presentes em óleos de peixes como salmão, sardinha, atum e cavalinha. Estes apresentam-se compondo fosfolipídios de membrana, além de desempenharem diferentes papéis no organismo. O EPA, assim como o ARA, também pode dar origem a eicosanóides, porém com uma ação mais anti-inflamatória no organismo (MARSZALEK e LODISH, 2005). O DHA é o mais abundante ácido graxo nas membranas celulares do cérebro e da retina, tendo um importante papel funcional nestes sistemas. Entre os sintomas de deficiência destes ácidos graxos estão, além de crescimento e reprodução prejudicados, problemas de visão e redução de aprendizado (HOLMAN et al., 1982).

Os ácidos graxos ω 6 e ω 3 competem pelas mesmas enzimas que os alongam e dessaturam no fígado para dar origem aos seus respectivos PUFAs. Por essa razão, estes devem estar em equilíbrio na alimentação. Estudos mostram que uma relação ω 6: ω 3 de 5:1 é a mais adequada para que ambos tenham seu melhor aproveitamento pelo organismo (MARSZALEK e LODISH, 2005; HEIRD e LAPILLONNE, 2005). A figura 1 mostra as alongações e desaturações por que passam os ácidos graxos ω 6 e ω 3 e os produtos desta síntese.

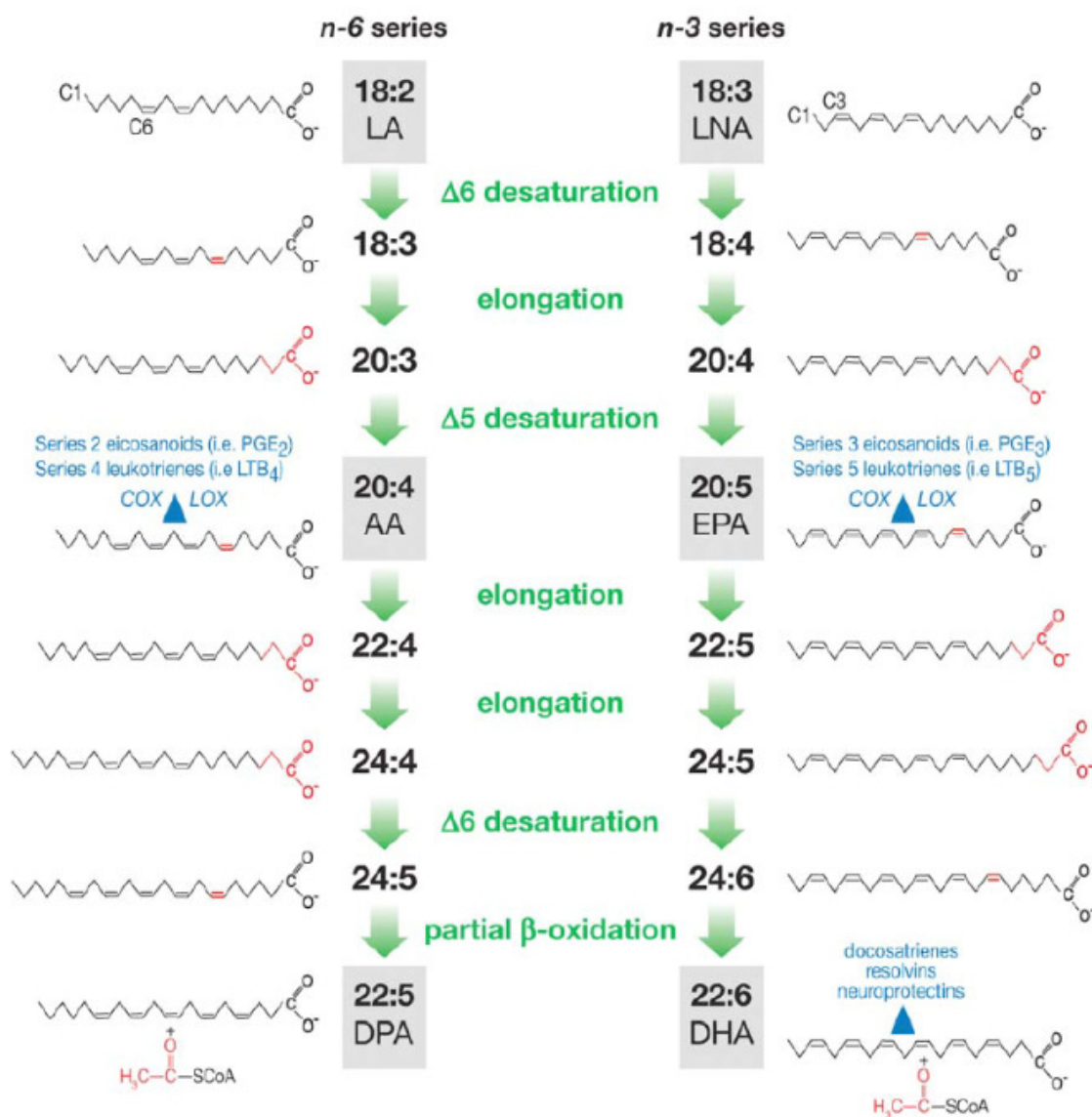


Figura 1. Biossíntese de $\omega 6$ e $\omega 3$ PUFAs a partir de seus precursores de 18 carbonos. Os carbonos adicionados ou removidos são marcados em vermelho. Moléculas de sinalização derivadas do AA, EPA e DHA são marcadas em azul. LNA, ácido linolênico; LA, ácido linoleico; AA, ácido araquidônico; EPA, ácido eicosapentanoico; DPA, ácido docosapentanoico; DHA, ácido docosahexaenoico; COX, ciclooxygenase; LOX, lipooxygenase; PG, prostaglandinas; LT, leucotrienes (Fonte: MARSZALEK e LODISH, 2005).

Em relação ao consumo de ômega-3 PUFAs, a American Heart Association recomenda a ingestão de duas porções de peixes oleosos por semana (LICHTENSTEIN et al., 2006), mesma recomendação feita pela *American Diabetes Association* para o manejo do Diabetes (BANTLE et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde recomenda, para a população em geral, de uma a duas porções de peixes por semana ou a ingestão de fontes vegetais de ALA (WHO/FAO, 2003).

Em estudo com gestantes, observou-se que o consumo de 200mg/dia de DHA, a partir da 24^a semana de gestação até o nascimento, foi capaz de melhorar a acuidade visual no quarto mês de vida (JUDGE et al., 2007). Atualmente, não existe recomendação pelas DRIs (*Dietary Reference Intakes*) para EPA e DHA, apenas para ácidos graxos ômega-3 em geral, enquanto outras recomendações de grupos profissionais e cientistas incluem a ingestão total de EPA + DHA/dia (em torno de 500mg de EPA + DHA), sem especificar as quantidades ideais de ingestão para cada tipo de ácido graxo ômega-3 (KRIS-ETHERON et al., 2009). Essa recomendação pode levar à falsa ideia de que todos os ácidos graxos desta série têm a mesma função biológica. Assim, uma recomendação para cada tipo de ácido graxo ômega-3 ainda precisa ser determinada por meio de estudos baseados em evidências.

1.1.1 Ômega-3 PUFAs e o sistema nervoso central

O ácido docosaexaenóico (DHA 22:6 ω 3) é o ácido graxo mais abundante no sistema nervoso central (SNC), tanto no cérebro como na retina (MARSZALEK e LODISH, 2005). Ligado à albumina, o DHA chega ao SNC pela corrente sanguínea e transpõe a barreira hematoencefálica pela ação de proteínas específicas de transporte. Além disso, os astrócitos, células que dão suporte aos neurônios, também possuem as enzimas necessárias para sintetizar DHA (WILLIARD et al., 2001).

O DHA é especialmente importante durante o desenvolvimento do SNC pré-natal, onde participa ativamente da sinaptogênese (MARTIN e BAZAN, 1992). Este ácido graxo passa da mãe para o feto pela barreira placentária e, após o nascimento, pelo leite materno. O crescimento cerebral humano, que ocorre do terceiro trimestre de gestação até o 18^o mês de vida, é correlacionado com o acréscimo de DHA nos fosfolipídios de membrana do cérebro (LAURITZEN et al., 2001). O DHA está presente nos fosfolipídios de membrana, principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, e nos plasmalogênios, compostos que estão relacionados à proteção celular contra o estresse oxidativo (ANDRÉ et al., 2005; FAROOQUI e HORROCKS, 2001). O conteúdo de DHA nos fosfolipídios chega a 50% do total de ácido graxos insaturados no cérebro e retina de ratos adultos (GARCIA et al., 1998). Um fornecimento insuficiente de ácidos graxos ω 3 durante o desenvolvimento pré e pós-natal diminui o conteúdo de DHA nos tecidos neurais com um aumento recíproco de ácido docosapentaenóico (DPA 22:5 ω 6; Schiefermeier & Yavin, 2002), levando a uma variedade de déficits visuais, olfativos, cognitivos

e comportamentais em modelos animais (LIM et al., 2005^a; LIM et al., 2005^b; NIU et al., 2004; MORIGUCHI et al., 2000). Já o suprimento de DHA, através do aleitamento materno, tem mostrado melhorar o desenvolvimento mental e visual em crianças (HIBBELN et al., 2007; BIRCH et al., 2000).

A influência do DHA nas propriedades de membrana, como fluidez, permeabilidade e capacidade de fusão, afeta a atividade de várias proteínas de membrana (canais iônicos, receptores, transportadores, enzimas) e modula, assim, vários sistemas de neurotransmissores. Muitos estudos mostram que os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico são afetados pela privação de ácidos graxos ω 3 (STILLWELL e WASSALL, 2003; ZIMMER et al., 2000; DELION et al., 1996). Porém, muito pouco se sabe a respeito da influência destes ácidos graxos sobre o funcionamento do sistema glutamatérgico.

1.1.2 DHA e retina

O DHA encontra-se altamente concentrado nos fotorreceptores (cones e bastonetes) e sinapses retinianas, e incorpora-se a estes durante a biogênese dos fotorreceptores e sinaptogênese (FLIESLER e ANDERSON, 1983; SCOTT e BAZAN, 1989). Sua deficiência, tanto metabólica quanto dietética, associa-se a alterações na estrutura e função do sistema visual (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

Do DHA também deriva a neuroprotectina D1 (NPD1), um docosatrieno formado principalmente pela atuação da fosfolipase A2, que libera o DHA das membranas celulares, tanto no cérebro quanto na retina (MUKHERJEE et al., 2004). A NPD1 apresenta, além de seus efeitos neuroprotetores após episódios de isquemia-reperfusão cerebrais, proteção contra o estresse oxidativo às células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e uma forte habilidade de inativar a sinalização pró-apoptótica (MARCHESELLI et al., 2003). O estresse oxidativo leva à fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose das células do EPR, ambos inibidos pela NPD1. Este efeito antiapoptótico deve-se à estimulação da família de proteínas Bcl-2 e atenuação da ativação da caspase-3 mediada por estresse oxidativo (MUKHERJEE et al., 2004, GERMAN et al., 2006).

Em indivíduos com degeneração macular relacionada à idade, há uma relação inversa entre o desenvolvimento da doença e dieta rica em DHA (BAZAN, 2005). Ao mesmo tempo, os níveis sanguíneos de DHA estão diminuídos em várias formas de retinite pigmentosa, síndrome de Usher e em modelos de animais com degeneração retínica hereditária (BAZAN, 1986 e HOFFMAN, 1995).

1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E RETINA

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e está envolvido em várias funções cerebrais, como plasticidade sináptica, aprendizado/memória, cognição, desenvolvimento e envelhecimento cerebrais (TZINGOUNIS e WADICHE, 2007; DANBOLT, 2001; SEGOVIA et al., 2001; OZAWA et al. 1998). O glutamato exerce seus efeitos por meio de receptores específicos (GluRs) que são divididos em ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs são canais iônicos cátion-específicos, subdivididos em α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA). Os mGluRs são acoplados a proteínas ligadoras de GTP (proteínas G) e modulam a produção de mensageiros intracelulares (KEW e KEMP 2005, ROTHSTEIN et al. 1996). No entanto, a superestimulação do sistema glutamatérgico (por estímulos endógenos e/ou exógenos), que ocorre quando os níveis de glutamato na fenda sináptica aumentam acima dos níveis fisiológicos (excitotoxicidade), está envolvida em várias doenças cerebrais, como doenças neurodegenerativas, convulsão e epilepsia, doença traumática cerebral e isquemia cerebral (TZINGOUNIS e WADICHE 2007, DANBOLT 2001).

Na retina, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório na neurotransmissão vertical (sentido fotorreceptores para células bipolares e destas para as células ganglionares), e permite que o impulso nervoso luminoso chegue até as áreas cerebrais responsáveis pela visão (MASSEY e MILLER, 1987; 1990; revisado por ARCHIBALD et al., 2009). Na camada plexiforme interna (onde ocorrem as sinapses entre as células bipolares e as ganglionares), o glutamato é liberado a partir de dois tipos básicos de células bipolares, as células bipolares ON, que liberam glutamato na presença de luz, e as células bipolares OFF, que liberam glutamato na ausência de luz. Na camada plexiforme externa, o glutamato é liberado continuamente dos fotorreceptores às células ganglionares (COPENHAGEN e JAHR, 1989). A figura 2 mostra os principais tipos celulares da retina.

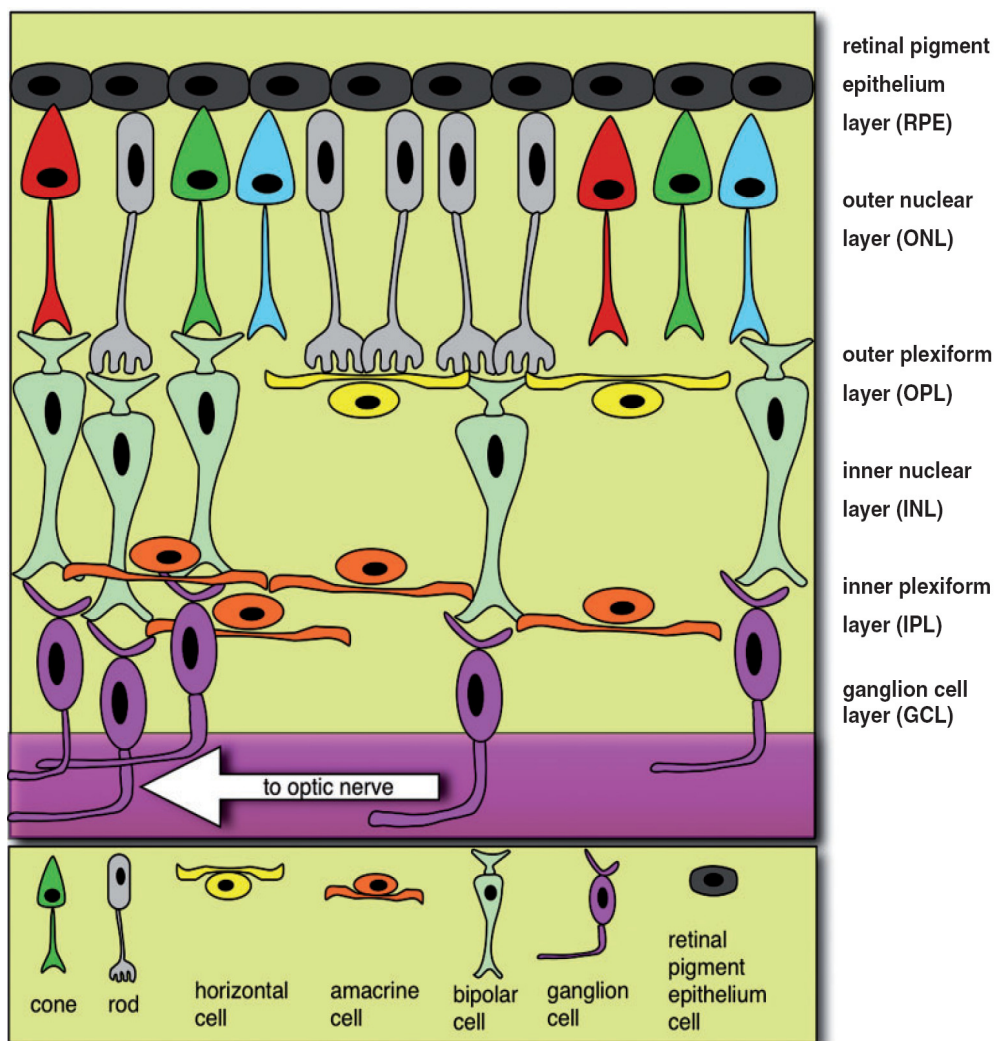


Figura 2 Principais tipos celulares da retina. (Fonte: ARCHIBALD et al., 2009).

Entretanto, a liberação excessiva de glutamato na retina e/ou a diminuição da captação por seus transportadores tem sido associada ao desenvolvimento de glaucoma, doença caracterizada por morte de células neuronais e perda da função visual (DREYER et al., 1996; DREYER e GROSSKREUTZ, 1997; OSBORNE et al., 1999). O glutamato também está envolvido em outras patologias da retina, como isquemia e retinopatia diabética (BRINGMANN et al., 2006).

Manter os níveis de glutamato em concentrações fisiológicas é extremamente importante para o bom funcionamento do SNC. Os transportadores de glutamato são responsáveis por manter as concentrações extracelulares deste neurotransmissor abaixo de níveis neurotóxicos e também têm função primordial de regular o balanço entre a sinalização fisiológica e a

superestimulação patológica dos receptores de glutamato (SUCHER et al., 1997; HOLCOMBE et al., 2008). Em relação à retina, os cinco transportadores de glutamato foram identificados através de imuno-histoquímica em mamíferos e humanos: (1) GLAST (EAAT1), associado às células gliais de Müller; (2) GLT-1 (EAAT2), identificado em cones e células bipolares; (3) EAAC1 (EAAT3), presente em células horizontais, algumas células amácrimas e células ganglionares; (4) EAAT5, associado a fotorreceptores e células bipolares e (5) EAAT4, associado às células astrogliais (RAUEN et al., 1998; POW e BARNETT, 1999; RAUEN e KANNER, 1994; RAUEN et al., 1996; SCHULTZ e STELL, 1996; POW e BARNETT, 2000).

As células de Müller são a maior representação da glia na retina e interagem com a maioria dos neurônios deste tecido. Suas funções na retina vão desde a homeostase do espaço extracelular (água, íons, neurotransmissores e pH) até o controle da angiogênese e fluxo sanguíneo (BRINGMANN et al., 2006). Estas células gliais são associadas ao transportador GLAST, apontado como o principal transportador de glutamato na retina (HARADA et al. 1998; PEGHINI et al. 1997). Este transportador, por sua vez, mantém os níveis de glutatona nas células de Müller através do transporte de glutamato, um dos substratos para sua síntese. O glutamato transportado para o interior da célula de Müller é o fator limitante para a manutenção dos níveis intracelulares de glutatona (HARADA et al., 2007), mas a maior parte do glutamato intracelular é utilizado para síntese de glutamina pela enzima glutamina sintase (GS), presente na retina exclusivamente nas células de Müller (RIEPE e NORENBURG, 1977).

Em condições de isquemia, experimentos com retinas isoladas de ratos mostram que a captação de glutamato pelas células de Müller fica comprometida e a integridade celular pode ser afetada (NAPPER et al., 1999; BARNETT et al, 2001; OSBORNE et al., 2004).

1.2.1 Sistema glutamatérgico e os ácidos graxos ômega-3

Em estudo conduzido por Cao et al. (2009) em neurônios hipocâmpais suplementados com DHA, observou-se aumento da atividade sináptica glutamatérgica, resultante de um aumento nos níveis de proteínas pré e pós-sinápticas envolvidas na transmissão sináptica e potenciação de longa duração (do inglês *long-term potentiation* – LTP), evento relacionado às bases do processo de formação da memória.

Colaboram com esses achados os resultados encontrados por Grintal et al. (2009) em estudos *in vitro*, que mostram uma diminuição na captação de [³H]aspartato (análogo do glutamato) em culturas de astrócitos enriquecidas com DHA livre, sem afetar o conteúdo dos transportadores GLAST ou GLT-1, o que sugere que, nestas culturas, o DHA reduziu a atividade dos transportadores. Quando os mesmos experimentos foram feitos com astrócitos cujas membranas eram enriquecidas com DHA, não se verificou influência sobre a captação de [³H]aspartato. Em astrócitos com fenótipo reativo, não houve influência do DHA, o que sugere o DHA como um inibidor fisiológico da captação de glutamato, beneficiando a LTP e, em consequência, eventos como memória e aprendizado.

Além destes efeitos sobre o sistema glutamatérgico, o DHA é capaz de modular também os transportadores de glutamato GLT-1, GLAST e EAAC1 em células HEK *in vitro* e, quando suplementado na dieta, foi capaz de reverter o decréscimo de subunidades dos receptores NMDA e AMPA que normalmente ocorre em animais idosos (BERRY et al., 2005; DYALL et al., 2006). A privação dietética de ácidos graxos ω 3 no período pré-natal provocou atrasos no desenvolvimento de alguns parâmetros relacionados à transmissão sináptica em hipocampo de ratos, com possível implicação em alterações comportamentais observadas na idade adulta destes animais, tais como prejuízo à memória e ao comportamento exploratório e efeito ansiolítico, verificados através de testes comportamentais de esQUIVA inibitória, campo aberto e labirinto em cruz elevada. O atraso no desenvolvimento do sistema glutamatérgico foi verificado pela expressão tardia das subunidades NR2 A/B e Glur1 dos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, respectivamente (MOREIRA et al., 2010a). Também foi demonstrado, utilizando um modelo de isquemia *in vitro*, que a privação dietética de ácidos graxos ω 3 confere maior suscetibilidade à injúria celular e perda da capacidade de captação de glutamato em hipocampo de ratos (MOREIRA et al., 2010b)

Mesmo com estudos publicados sobre o tema, ainda é pouco o que se sabe a respeito da influência dos ácidos graxos ômega-3 sobre o sistema glutamatérgico na retina e que efeitos estes ácidos graxos podem ter sobre o transporte de glutamato na retina em condições basais e em modelos de injúria. O estudo desta temática pode trazer medidas preventivas e/ou de tratamento para patologias como o glaucoma. Neste estudo, avaliou-se o efeito da privação de ácidos graxos

do tipo ômega-3 sobre a captação de [³H]glutamato e o conteúdo dos principais transportadores deste neurotransmissor na retina em condições basais e de isquemia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da privação dietética de ácidos graxos do tipo ômega-3 sobre parâmetros relativos à funcionalidade do sistema glutamatérgico na retina de ratos Wistar adultos em condições basais e de isquemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da privação dietética de ácidos graxos do tipo ômega-3 sobre a captação de [³H]glutamato na retina em condições basais e isquêmicas;
- Analisar o imunconteúdo dos transportadores GLAST, GLT-1, EAAC1 e EAAT5 em homogenato de retinas isquêmicas e controles de ratos adultos submetidos à privação dietética de ácidos graxos ômega-3.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo escrito segundo as normas da revista Experimental Eye Research/Elsevier

Experimental Eye Research

Fator de Impacto: 2,538 (Journal Citations Report® - Thomson Reuters 2010)

Números por ano: 12

A privação dietética de ácidos graxos ômega-3 afeta o sistema de transporte de glutamato em condições basais e isquêmicas em retina de ratos Wistar.

Júlia D. Moreira^{a,b}, Letícia Vicari de Siqueira^{a,b}, Luisa Knorr^a, Luciano Bellini^a, Eduardo P. Rico^a, Mário César Bulla^a, Vanessa Marques Lague^a, Suzana Wofchuk^a, Marcos L. S. Perry^a, Lúcia Vinadé^{a,c}, Diogo O. Souza^a.

^aDepartamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bCurso de Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^cDepartamento Didático, CCRSG, Universidade Federal do Pampa, Rua Antonio Mercado 1357, CEP 97300-000, São Gabriel, RS, Brasil.

*Contato do autor: Tel: +55 51 33085559; fax: +55 51 33085540.

Correio eletrônico: juliamoreira@gmail.com.br (J. D. Moreira)

RESUMO

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, participa do desenvolvimento e fisiologia da retina e, por esse motivo, está envolvido nos processos visuais. No entanto, o glutamato pode ser neurotóxico quando em níveis aumentados na fenda sináptica, situação em que participa da fisiopatologia de doenças como o glaucoma. Os ácidos graxos poli-insaturados da série Ômega-3 ($\omega 3$), principalmente o ácido docosahexaenóico (DHA), são essenciais para o desenvolvimento e diferenciação dos fotorreceptores e para a proteção contra danos às células retinianas. Neste estudo, investigou-se a influência dos ácidos graxos $\omega 3$ na captação de [³H]glutamato e no conteúdo dos principais transportadores deste neurotransmissor na retina em condições basais e de isquemia. Para os experimentos, ratos Wistar foram submetidos a duas dietas: dieta $\omega 3$ (grupo $\omega 3$) e dieta deficiente em $\omega 3$ (grupo D). A isquemia na retina foi obtida por meio do bloqueio do fluxo sanguíneo através de aumento da pressão intraocular (140 - 180mmHg por 45 min) em um dos olhos de cada animal, mimetizando um dos mecanismos patológicos do glaucoma. Avaliou-se a captação de [³H]glutamato e o

imunoconteúdo dos transportadores GLAST, GLT-1, EAAC1 e EAAT5 sete dias após a isquemia. Com relação ao basal, o grupo D apresentou menor captação de [³H]glutamato na retina quando comparado ao ω 3 basal e isquêmico, enquanto que o imunoconteúdo de GLT-1 foi menor no grupo D quando comparado ao ω 3 tanto isquêmico quanto basal. Após a isquemia, o grupo D teve uma diminuição na captação de [³H]glutamato, ao passo que o grupo com dieta adequada em ω 3 (grupo ω 3) manteve seus níveis estáveis. Verificou-se também, no grupo D, um imunoconteúdo maior de GLT-1 após a isquemia, embora ainda com níveis menores deste transportador se comparado ao ω 3 isquêmico. Para o grupo ω 3, não se verificaram mudanças no imunoconteúdo de GLT-1 após a isquemia. A expressão do transportador EAAC1 sofreu um aumento nos dois grupos após a isquemia em relação ao basal de ambos. O imunoconteúdo de GLAST e EAAT5 não sofreu influência da dieta ou da isquemia. Neste estudo, os ácidos graxos ω 3 presentes na dieta foram capazes de modular os transportadores de glutamato em condições basais e isquêmicas, e este é um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos ω 3 exercem sua neuroproteção.

PALAVRAS-CHAVE: isquemia, retina, transporte de glutamato, ácidos graxos ômega-3.

3.1 INTRODUÇÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em várias funções cerebrais como plasticidade sináptica - aprendizado/memória, desenvolvimento e envelhecimento cerebrais (Tzingounis e Wadiche 2007, Danbolt 2001, Segovia et al. 2001, Ozawa et al. 1998). No entanto, a superestimulação do sistema glutamatérgico (por estímulos endógenos e/ou exógenos) que ocorre quando os níveis de glutamato na fenda sináptica aumentam acima dos níveis fisiológicos (excitotoxicidade), está envolvida em várias doenças cerebrais, como doenças neurodegenerativas, convulsão e epilepsia, doença traumática cerebral e isquemia cerebral (Tzingounis e Wadiche 2007, Danbolt 2001).

Na retina, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório na neurotransmissão vertical (fotorreceptores → células bipolares → células ganglionares), e permite que o impulso nervoso luminoso chegue às áreas cerebrais responsáveis pela visão (Massey e Miller, 1987; 1990; revisado por Archibald et al., 2009). Na camada plexiforme interna (onde ocorrem as sinapses

entre as células bipolares e as ganglionares), o glutamato é liberado a partir de dois tipos básicos de células bipolares, as células bipolares ON, que liberam glutamato na presença de luz, e as células bipolares OFF, que liberam glutamato na ausência de luz. Na camada plexiforme externa, o glutamato é liberado continuamente dos fotorreceptores às células ganglionares (Copenhagen e Jahr, 1989).

Porém, a liberação excessiva de glutamato na retina e/ou a diminuição da captação por seus transportadores tem sido associada ao desenvolvimento de glaucoma, doença caracterizada por morte de células neuronais (Dreyer et al., 1996; Dreyer e Grosskreutz, 1997; Osborne et al., 1999). O glutamato também está envolvido em outras patologias da retina, como isquemia e retinopatia diabética (Bringmann et al., 2006).

Manter os níveis de glutamato em concentrações fisiológicas é extremamente importante para o bom funcionamento do SNC. Os transportadores de glutamato são responsáveis por manter as concentrações extracelulares deste neurotransmissor abaixo de níveis neurotóxicos e também têm função primordial de regular o balanço entre a sinalização fisiológica e a superestimulação patológica dos receptores de glutamato (Sucher et al., 1997; Holcombe et al., 2008). Em relação à retina, os cinco transportadores de glutamato foram identificados por meio de imuno-histoquímica em mamíferos e humanos: (1) GLAST (EAAT1), associado às células gliais de Müller; (2) GLT-1 (EAAT2), identificado em cones e células bipolares; (3) EAAC1 (EAAT3), presente em células horizontais, algumas células amácrimas e células ganglionares; (4) EAAT5, associado a fotorreceptores e células bipolares e (5) EAAT4, associado às células astrogliais (Pow e Barnett, 1999; Rauen et al., 1998; Rauen e Kanner, 1994; Rauen et al., 1996; Schultz e Stell, 1996; Pow e Barnett, 2000).

O ácido docosaexaenóico (DHA 22:6 ω 3) é o ácido graxo mais abundante no sistema nervoso central (SNC), tanto no cérebro como na retina (Marszalek e Lodish, 2005). Na retina, encontra-se altamente concentrado nos fotorreceptores (cones e bastonetes) e sinapses; é incorporado a estes durante a biogênese dos fotorreceptores e sinaptogênese (Fliesler e Anderson, 1983; Scott e Bazan, 1989).

Em estudo conduzido por Cao et al. (2009) em neurônios hipocâmpais suplementados com DHA, observou-se aumento da atividade sináptica glutamatérgica, resultante de um aumento nos

níveis de proteínas pré e pós-sinápticas envolvidas na transmissão sináptica e potenciação de longa duração (LTP). Colaboram com esses achados os resultados encontrados por Grintal et al. (2009) em estudos *in vitro*, que mostram uma diminuição na captação de [³H]aspartato (análogo do glutamato) em culturas de astrócitos enriquecidas com DHA livre, sem afetar o conteúdo dos transportadores GLAST ou GLT-1, o que sugere que, nestas culturas, o DHA reduziu a atividade dos transportadores. Quando os mesmos experimentos foram feitos com astrócitos cujas membranas eram enriquecidas com DHA, não foi verificada influência sobre a captação de [³H]aspartato. Em astrócitos com fenótipo reativo, não houve influência do DHA, o que sugere o DHA como um inibidor fisiológico da captação de glutamato, beneficiando a LTP e, em consequência, eventos como memória e aprendizado.

Além destes efeitos sobre o sistema glutamatérgico, o DHA é capaz de modular também os transportadores de glutamato GLT-1, GLAST e EAAC1 e, quando suplementado na dieta, foi capaz de reverter o decréscimo de subunidades de receptores NMDA e AMPA que normalmente ocorre em animais idosos (Berry et al., 2005; Dyllal et al., 2006).

Embora haja estudos publicados sobre o tema, é pouco o que se sabe a respeito da influência dos ácidos graxos ômega-3 sobre o sistema glutamatérgico na retina e que efeitos estes ácidos graxos podem ter sobre o transporte de glutamato na retina em condições basais e em modelos de injúria. Desta forma, este estudo avaliou o efeito da privação de ácidos graxos do tipo ômega-3 sobre a captação de [³H]glutamato e o conteúdo dos principais transportadores deste neurotransmissor na retina em condições basais e de isquemia.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Animais

Ratas Wistar com idades entre 60 e 90 dias fornecidas pelo biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram mantidas em sala com temperatura controlada (21 – 22°C), com um ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida oferecidos *ad libitum*. Para garantir o aporte de ácidos graxos ω 3 ou sua deficiência no leite materno, duas semanas antes do acasalamento, as fêmeas foram divididas em dois grupos: dieta adequada em ômega-3 (dieta controle, ω 3) e dieta deficiente em ω 3 (dieta D).

Após esse período, ratos machos fornecidos pelo mesmo biotério e com aproximadamente 90 dias foram colocados junto às fêmeas (duas fêmeas e um macho por caixa) para o acasalamento. Quando prenha, a fêmea era posta em uma caixa isolada e diariamente verificava-se o nascimento dos filhotes. Nos primeiros dias de vida da nova ninhada, realizava-se a padronização dos filhotes, que consistiu na retirada dos filhotes que excediam a sete, a fim de que se tivesse o mesmo número de filhotes por ninhada. Este procedimento evita que se obtenha um desenvolvimento diferenciado de algumas ninhadas e/ou filhotes em relação a outros(as), bem como quantidades muito discrepantes na ingestão diária de leite materno e ω -3.

Após 21 dias do nascimento, realizava-se o desmame, quando era retirada a mãe e filhotes fêmeas da ninhada. Permaneciam apenas os filhotes machos, que prosseguiram até a idade adulta (idade superior a 60 dias) com a mesma dieta materna. Os animais foram sacrificados por decapitação, e o material biológico não utilizado no experimento foi armazenado em freezer específico para este fim para posterior descarte por empresa tercerizada especializada (Aborgama), no Biotério do Departamento de Bioquímica.

Todos os experimentos foram conduzidos com vistas a minimizar o sofrimento animal e estavam de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas Experimentais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2.2 Dietas

Os animais foram divididos em dois grupos com dietas isocalóricas que continham 8% de gordura e que diferiam apenas na composição lipídica. A composição nutricional (proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais) foi feita de acordo com Moreira et al. (2010^a), apresentada na Tabela 1. Manteve-se a composição lipídica conforme o recomendado para ingestão diária de ácidos graxos ω 3 e ω 6 de 5:1 por Simopoulos et al. (2000). Para alcançar esta recomendação, a dieta ω 3 continha, em sua composição, uma mistura de óleo de peixe e óleo de milho. Para a dieta deficiente em ômega-3, utilizou-se o óleo de amendoim, cujo conteúdo de ácidos graxos não inclui ômega-3, somente os do tipo ômega-6. A composição lipídica das dietas é apresentada na Tabela 2.

3.2.3 Isquemia na retina

Para produzir um insulto isquêmico na retina através do aumento da pressão intraocular (o que mimetiza um dos mecanismos do glaucoma), os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). A câmara anterior de um dos olhos de cada animal foi canulada com uso de uma agulha de insulina conectada a um reservatório de solução salina estéril e uma bomba de perfusão. Como apenas um dos olhos de cada animal sofreu o insulto isquêmico, cada animal teve ao mesmo tempo as condições basais e isquêmicas para as análises posteriores. A pressão intraocular foi monitorada (entre 140 e 180mmHg) para controlar a obstrução do fluxo sanguíneo. Após 45 minutos de isquemia, os animais retornaram às condições normais (ciclo claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*) por 7 dias, durante os quais os olhos dos animais foram tratados com colírio (Tobracort – Genom) e, ao fim deste período, eram realizados os experimentos a seguir.

3.2.4 Captação de [³H]glutamato

Neste experimento, foram utilizados 8 animais por grupo. Os ratos submetidos à isquemia na retina foram decapitados e seus olhos (tanto basais quanto isquêmicos) imediatamente removidos e umidificados com Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl; 0,63 Na₂HPO₄; 4,17 NaHCO₃; 5,36 KCl; 0,44 KH₂PO₄; 1,26 CaCl₂; 0,41 MgSO₄; 0,49 MgCl₂ e 1,11 glicose, pH 7,2. As retinas foram dissecadas sobre placas de Petri e transferidas para placas de cultura de 24 poços: uma placa foi mantida a 37°C (captação total) e outra a 4°C (captação independente de sódio e temperatura). A captação foi feita de acordo com Thomazi et al. (2004), com a utilização do protocolo para fatias de córtex cerebral. As retinas foram pré-incubadas a 37 °C por 15 minutos e, na sequência, foram adicionados 100µM de [³H]glutamato. A incubação foi interrompida depois de 7 minutos com duas lavagens de 1mL de HBSS gelado. Tão logo feitas as lavagens, adicionou-se 1mL de NaOH em cada poço, onde o material foi mantido até o dia seguinte para a dissolução total do tecido retiniano. A captação independente de sódio e temperatura foi realizada pelo mesmo protocolo, com diferença apenas na temperatura (feita sobre o gelo, a 4°C) e composição do meio (*N*-metil-D-glucamina em lugar de cloreto de sódio). Para captação dependente de sódio, considerou-se a diferença entre a captação total e a independente de sódio. A radioatividade incorporada foi medida por um contador de cintilação líquida (Wallac 1409).

3.2.5 Western Blot

Para o Western Blot dos transportadores de glutamato foram utilizados 6 animais para o grupo ω -3 e 5 para o grupo D. Fizeram-se as análises do imunoconteúdo dos transportadores de glutamato em condições basais e isquêmicas homogeneizando-se as retinas em solução Hepes 25mM (pH 7,4) que continha 0,1% SDS e coquetel de inibidores de protease (Sigma). As amostras foram padronizadas a 2 μ g de proteína/ μ l com o uso de um tampão de amostra (4% de dodecilsulfato de sódio, 2,1 mM de EDTA, 50 mM de Tris e 5 % de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol). As amostras (20 μ g de proteína por poço) foram submetidas à eletroforese e transferidas para membranas de nitrocelulose. Processaram-se as membranas da seguinte forma: (1) bloqueio com albumina sérica bovina a 5% (Sigma) por duas horas; (2) incubação com anticorpo primário (Alpha Diagnostic) *overnight*: 1:1000 anti-GLT1; 1:1000 anti-GLAST; 1:1000 anti-EAAC1; 1:1000 anti-EAAT5; (3) incubação com anticorpo secundário para coelho 1:1000 (Amersham) por 2 horas; (4) a quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) foi detectada com o uso de filmes de raio-X (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). Os filmes foram escaneados e a intensidade das bandas analisadas pelo programa ImageJ (desenvolvido no US National Institutes of Health e disponível na internet em <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Como proteína-controle utilizou-se anti- β -actina (1:3000, Sigma).

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão. Anova de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico. Foram considerados significativos os resultados cujo valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para análise do imunoconteúdo dos transportadores, utilizou-se a razão transportador/actina.

3.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que o grupo com dieta deficiente em ω 3 (grupo D) apresentou menor captação de [3 H]glutamato na retina em níveis basais quando comparado ao ω 3 tanto basal quanto isquêmico. Após a isquemia, o grupo D teve ainda uma diminuição na

captação, enquanto que o grupo com dieta adequada em $\omega 3$ (grupo $\omega 3$) manteve seus níveis estáveis (Figura 1).

Como é possível observar na figura 2, o imunocontéudo de GLT-1 foi menor no grupo D tanto em condições basais quanto isquêmicas quando comparado ao $\omega 3$ isquêmico e basal. No grupo D, verificou-se um aumento deste transportador após a isquemia, mas mesmo com este aumento, seu imunocontéudo continuou menor que o do grupo $\omega 3$. Para o grupo $\omega 3$, não se verificaram mudanças no imunocontéudo de GLT-1 após a isquemia.

A expressão de EAAC1 se mostrou aumentada em ambos os grupos após a isquemia em relação ao basal tanto do grupo $\omega 3$ quanto do grupo D (figura 3). Para este transportador, não houve diferença estatística entre os basais dos dois grupos.

O imunocontéudo de GLAST (figura 4) e EAAT5 (figura 5) não sofreu influência da dieta ou da isquemia.

3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que a deficiência de ácidos graxos ômega-3 na dieta de ratos Wistar durante o desenvolvimento afetou a funcionalidade do sistema glutamatérgico em condições basais e isquêmicas, aqui visto pelos parâmetros de captação de glutamato e conteúdo dos transportadores GLT-1 e EAAC1.

O papel dos transportadores de glutamato na retina não está bem definido. Sabe-se que o transportador responsável por manter os níveis de glutamato adequados e por evitar, assim, danos às células neurais da retina, é o GLAST, que pode ter sua atividade reduzida perante um insulto isquêmico (Harada et al. 1998; Peghini et al. 1997; Rauen et al., 1996 e 1998). Neste trabalho, observou-se uma queda na captação de glutamato após a isquemia na retina, sugerindo que a atividade do GLAST foi afetada pela isquemia; porém esta queda não pôde ser associada a uma redução no conteúdo do transportador, pois não houve mudanças neste após a isquemia. Estudos que verificam a expressão de GLAST em resposta ao aumento da pressão intraocular mostram resultados controversos; alguns sem variação ou aumento muito modesto em seu imunocontéudo enquanto outros apontam para sua diminuição (Sullivan et al., 2006; Park et al., 2009; Martin et al., 2002; Schuettauf et al., 2007).

Outros trabalhos mostram que, durante o insulto isquêmico, ocorre um aumento da liberação de glutamato pelos neurônios, e sua captação fica reduzida, o que caracteriza o evento de excitotoxicidade glutamatérgica (Kobayashi et al., 1999; Napper et al., 1999). Entretanto, dentro de 1 hora de isquemia-reperfusão, o aumento de fosforilação da ERK reativa o transporte de glutamato pelas células de Müller (Akiyama et al., 2002). Apesar da reativação das células de Müller, a interferência na homeostase do glutamato durante o insulto isquêmico é suficiente para iniciar a degeneração excitotóxica e apoptótica (Barnett e Grozdanic, 2004). Sabe-se também que o DHA impede a desorganização celular em retinas isquêmicas - o que resultaria em alteração estrutural - e também previne a apoptose dos fotorreceptores através da ativação da rota MAPK/ERK em cultura de células (Murayama et al., 2002; German et al., 2006). Estes estudos apontam para um possível alvo de ação neuroprotetor dos ácidos graxos ômega-3 na retina, onde estes poderiam estar modulando a atividade da ERK após o insulto isquêmico. Moreira e colaboradores (2010b) observaram que, em um modelo de isquemia *in vitro* utilizando fatias de hipocampo de ratos, o grupo que recebeu dieta adequada em $\omega 3$ apresentou menor dano celular após a isquemia, bem como menor queda na capacidade de captação de glutamato, tendo também uma maior ativação da ERK após a isquemia. Contudo, mais estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados.

Quanto aos transportadores GLT-1 e EAAC1, alguns estudos com ratos *knockout* para estes transportadores não demonstraram anormalidades na retina, enquanto outros apontam o GLT-1 como principal transportador neuronal de glutamato nesta estrutura (Harada et al. 1998; Peghini et al. 1997). Em diferentes modelos de glaucoma, foi verificada “down-regulação” de GLT-1 tanto em ratos como em camundongos, utilizando-se, no primeiro estudo, um laser para elevação da pressão intraocular e, no segundo, a cauterização de veias da episclera (Martin et al., 2002; Schuettauf et al., 2007). Além disso, este transportador é apontado como pré-requisito para manutenção da homeostase do glutamato no glaucoma, e teve um aumento significativo após episódio de isquemia induzida por cauterização, mesmo uma semana depois da injúria (Park et al., 2009). Foi demonstrado que a expressão de de GLT-1 pode ser ativada pelas células ganglionares após um insulto (Sullivan et al., 2006). Este dado poderia explicar o aumento de GLT-1 observado no presente estudo após a isquemia no grupo D. Considerando-se que neste trabalho não houve variação da expressão de GLT-1 no grupo $\omega 3$ e que o conteúdo deste transportador foi maior neste grupo quando comparado ao grupo D, sugere-se que o GLT-1 pode

ser o responsável pela ausência de queda na captação de glutamato na retina após a isquemia no grupo $\omega 3$.

Em relação ao EAAC1, localiza-se tanto extrasinapticamente, como sinapticamente, o que sugere seu envolvimento na captação de glutamato também de outra forma que não a inibição da sinapse – na formação de GABA, por exemplo (Coco et al. 1997; Wiessner et al., 2002). A diminuição deste transportador, juntamente com a diminuição de GLAST, leva à degeneração retínica e ao glaucoma mesmo sem o aumento da pressão intraocular (Harada et al., 2007; Namekata et al., 2009). Nossos dados mostram um aumento do conteúdo do EAAC1 em ambos os grupos após a isquemia, sugerindo que este pode ser um mecanismo neuroprotetor interno da retina para compensar a atividade de transporte do GLAST, que pode estar diminuída. No entanto, não observamos diferença no conteúdo basal deste transportador entre os grupos.

O transportador EAAT5 é expresso primariamente na retina, onde está associado à resposta ao estímulo da luz pré e pós-sinapticamente (Grant et al., 1995; Picaud et al., 1995). Arriza et al. (1997) sugerem que este transportador também pode exercer um outro papel fisiológico na retina que não o *clearance* de glutamato, sendo possível que atue como um autorreceptor inibitório. Neste estudo, não foi observada alteração no conteúdo deste transportador.

Assim, verificou-se neste estudo que os ácidos graxos $\omega 3$ presentes na dieta foram capazes de modular os transportadores de glutamato em condições basais e isquêmicas, e este pode ser um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos $\omega 3$ exercem sua neuroproteção na retina. Porém, mais estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da isquemia na retina, a fim de buscar alvos potencialmente terapêuticos para os ácidos graxos ômega-3 dietéticos.

REFERÊNCIAS

- Adkins, Y., Kelley, D.S., 2010. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*. *In press*.
- Akiyama, H., Nakazawa, T., Shimura, M., Tomita, H., Tamai, M., 2002. Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Müller cells and its neuroprotective effects in ischemia-reperfusion injury. *Neuroreport*. 13, 2103-2107.
- Archibald, N.K., Clarke, M.P., Mosimann, U.P., Burn, D.J., 2009. The Retina in Parkinson's Disease. *Brain*. 132, 1128-1145.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 4155-4160.
- Barnett, N.L. e Grozdanic, S.D., 2004. Glutamate transporter localization does not correspond to the temporary functional recovery and late degeneration after acute ocular ischemia in rats. *Exp. Eye Res*. 79, 513-524.
- Berry, C.B., Hayes, D., Murphy, A., Weibner, M., Rauen, T., Mc Bean, G.J., 2005. Differential modulation of glutamate transporters GLT-1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. *Brain Res*. 1037, 123-133.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., Reichenbach, A., 2006. Müller cells in the health and diseased retina. *ProgRetin Eye Res*. 25, 397-424.
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H., Jun, S.B., Lovinger, D., Kim, H., 2009. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem*. 111, 510-521.
- Coco, S., Verderio, C., Trotti, D., Rothstein, J.D., Volterra, A., Matteoli, M., 1997. Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci*. 9, 1902-1910.
- Copenhagen, D. R., Jahr C. E., 1989. Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature*. 341, 536-539.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol*. 65, 1-105.
- Delion, S., Chalon, S., Guilloteau, D., Besnard, J.C., Durand, G., 1996. α -Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rat frontal cortex. *J. Neurochem*. 66, 1582-1591.
- Dyall, S.C., Michael, G.J., Whelpton, R., Scott, A.G., Michael-Tittus, A.T., 2006. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age related decrease in GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol. Aging*, 28, 424-439.

- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M., Lipton, S. A., 1996. Elevated glutamate levels in the vitreous body of human and monkeys with glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 114, 299-305.
- Dreyer, E. B., Grosskreutz, C. L., 1997. Excitatory mechanism in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin. Neurosci.* 4, 270-273.
- Fliesler, S.J., Anderson, R.E., 1983. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid. Res.* 22, 79 –131.
- German, O.L., Insua, M.F., Gentili, C., Rotstein, N.P., Politi, L.E., 2006. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J. Neurochem.* 98, 1507-1520.
- Grant, G. B., Dowling, J. E., 1995. A glutamate-activated chloride current in cone-driven ON bipolar cells of the white perch retina. *J. Neurosci.* 15, 3852–3862.
- Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Lavialle, M., Vancassel, S., Breton, S., Denis, I., 2009. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. *J. Neurochem.* 54, 535-543.
- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., Tanaka, K., 1998. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4663–4666.
- Harada, T.; Harada, C.; Nakamura, K.; Quah, H.M.A.; Okumura, A.; Namekata, K.; Saeki, T.; Aihara, M.; Yoshida, H., Mitani, A.; Tanaka, K., 2007. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Invest.*, 117, 1763-1770.
- Holcombe, D. J., Legenfeld, N., Gole, G. A., Barnett, N. L., 2008. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport. *Acta Ophthalmol. Scand.* 86, 408-414.
- Kobayashi, N., Ishiguro, S., Tomita, H., Nishikawa, S., Tamai, M., 1999. Changes of GABA metabolic enzymes in acute retinal ischemia. *Exp. Eye Res.* 69, 91-96.
- Marszalek, J.R., Lodish, H.F., 2005. Docosahexaenoic Acid, Fatty Acid-Interacting Proteins, and Neuronal Function: Breastmilk and Fish are Good for You. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, p. 663-657.
- Massey, S. C., Miller, R. F., 1987. Excitatory amino acid receptors of rod and cone-driven horizontal cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol.* 57, 645-659.
- Massey, S. C., Miller, R. F., 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol.* 63, 16-30.
- Martin, K.R., Levkovitch-Verbin, H., Valenta, D., Baumrind, L., Pease, M.E., Quigley, H.A., 2002. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2236–2243.

- Moreira J.D, Knorr L., Ganzella M., Thomazi A.P., de Souza C.G., de Souza D.G, Pitta C.F., Mello e Souza, T., Wofchok S., Elisabetsky E., Vinadé L., Perry M.L.S., Souza D.O. 2010a. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavioral alterations. *Neurochem. Int.*, 56 (6-7), 753-759.
- Moreira, J.D., Knorr, L., Thomazi, A.P., Simão, F., Battú, C., Osés, J.P., Gottfried, C., Wofchuk, S., Salbego, C., Souza, D.O., Perry, M.L.S., Vinadé, L., 2010b. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 351–356.
- Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Harada, T., 2009. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 465, 160-164.
- Murayama, K., Yoneya, S., Miyauchi, O., Adachi-Usami, E., Nishikawa, M., 2002. Fish oil (polyunsaturated fatty acid) prevents ischemic-induced injury in the mammalian retina. *Exp. Eye Res.* 74, 671-676.
- Napper, G. A., Pianta, M. J., Kalloniatis, M., 1999. Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis. Neurosci.* 16, 149-158.
- O'Brien, R., 2004. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Application*. 2. ed., In: CRC Press (Ed.), USA
- Osborne, N. N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J. H., Wood, J. P., Nash, M. S., 1999. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43, S102-S128.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54, 581-618.
- Park, C.K., Cha, J., Park, S.C., Lee, P.Y., Kim, J.H., Kim, H.S., Kim, S.A., Kim, I., Chun, M., 2009. Divergent expression of two glutamate transporters, GLAST and GLT-1, in an experimental rat model of glaucoma. *Exp. Brain Res.* 197, 101–109.
- Peghini, P., Janzen, J., Stoffel, W., 1997. Glutamate transporter EAAC1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioural abnormalities but no degeneration. *Embo J.* 16, 3822–3832.
- Picaud, S., Larsson, H. P., Wellis, D. P., Lecar, H., Werblin, F., 1995. Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92(20), 9417–9421.
- Pow, D. V. e Barnett, N. L., 1999. Changing Patterns of spatial buffering of glutamate in development rat retina are mediated by the Muller cells glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res.* 297, 57-66.

- Pow, D. V. e Barnett, N. L., 2000. Development expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci.Lett.* 280, 21-24.
- Rauen, T. e Kanner, B. I., 1994. Localization of glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retina. *Neurosci.Lett.* 169, 137-140.
- Rauen, T., Rothstein, J. D., Wassle, H., 1996. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in rat retina. *Cell Tissue Res.* 286, 325-336.
- Rauen, T., Taylor, W. R., Kuhlbrodt, K., Wiessner, M., 1998. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res.* 291, 19-31.
- Schuettauf, F., Thaler, S., Bolz, S., Fries, J., Kalbacher, H., Mankowska, A., Zurakowski, D., Zrenner, E., Rejdak, R., 2007. Alterations of amino acids and glutamate transport in the DBA/2J mouse retina; possible clues to degeneration. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 157-1168.
- Schultz, K. e Stell, W. K., 1996. Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci.Lett.* 211, 191-194.
- Scott, B.L., Bazan, N.G., 1989. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 2906-2907.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing. Dev.* 122, 1-29.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A., Salem, N. Jr., 2000. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 63 (3), 119-121.
- Sucher, N. J., Lipton, S. A., Dreyer, E. B., 1997. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* 37, 3483-3493.
- Sullivan, R.K.P., Mussie, E.W., Macnab, L., Ruiz, G., Pow, D.V., 2006. Evoked Expression of the Glutamate Transporter GLT-1c in Retinal Ganglion Cells in Human Glaucoma and in a Rat Model. *IOVS.* 47, 3853-3859.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125, 475-81.
- Tzingounis, A.V. e Wadiche, J.I., 2007. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience.* 8, 935-947.
- Wiessner, M., Fletcher, E.L., Fischer, F., Rauen, T., 2002. Localization and possible function of the glutamate transporter EAAC1 in the rat retina. *Cell. Tissue Res.* 310, 31-40.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Captação de glutamato na retina de ratos tratados com dieta contendo $\omega 3$ (grupo $\omega 3$, n= 8) e com dieta deficiente em $\omega 3$ (grupo D, n= 8) submetidos à isquemia em uma das retinas. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão – DP (* $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ basal; # $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ isquêmico; \$ $p < 0,05$ em relação ao D basal). Basal, barras pretas; isquêmico, barras brancas. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico.

Figura 2: Efeito da deficiência dietética de ácidos graxos $\omega 3$ no conteúdo do transportador de glutamato GLT1 na retina de ratos submetidos à isquemia em uma de suas retinas (grupo $\omega 3$, n= 6, grupo D, n= 5). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão – DP (* $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ basal; # $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ isquêmico; \$ $p < 0,05$ em relação ao D basal). Basal, barras pretas; isquêmico, barras brancas. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico. Imagens representativas do *Western blot* são mostradas acima das respectivas barras.

Figura 3: Efeito da deficiência dietética de ácidos graxos $\omega 3$ no conteúdo do transportador de glutamato EAAC1 na retina de ratos submetidos à isquemia em uma de suas retinas (grupo $\omega 3$, n= 6, grupo D, n= 5). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão – DP (* $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ basal; # $p < 0,05$ em relação ao $\omega 3$ isquêmico; & $p < 0,05$ em relação ao D basal). Basal, barras pretas; isquêmico, barras brancas. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico. Imagens representativas do *Western blot* são mostradas acima das respectivas barras.

Figura 4: Efeito da deficiência dietética de ácidos graxos $\omega 3$ no conteúdo do transportador de glutamato GLAST na retina de ratos submetidos à isquemia em uma de suas retinas (grupo $\omega 3$, n= 6, grupo D, n= 5). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão – DP. Basal, barras pretas; isquêmico, barras brancas. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico. Imagens representativas do *Western blot* são mostradas acima das respectivas barras.

Figura 5: Efeito da deficiência dietética de ácidos graxos $\omega 3$ no conteúdo do transportador de glutamato EAAT5 na retina de ratos submetidos à isquemia em uma de suas retinas (grupo $\omega 3$, n= 6, grupo D, n= 5). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão – DP. Basal, barras pretas; isquêmico, barras brancas. ANOVA de uma via seguida de teste Tukey foi utilizada para teste estatístico. Imagens representativas do *Western blot* são mostradas acima das respectivas barras.

TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas

	Dieta ω 3 (%)	Dieta D (%)
Caseína ^a	22	22
Amido de milho ^b	42	42
D-L-Metionina ^b	0,16	0,16
Sacarose	21	21
Fibras	2	2
Sais Minerais ^c	4	4
Vitaminas ^d	1	1
Óleo de amendoim	0	8
Óleo de milho	7	0
Óleo de peixe	1	0

A composição de sais e vitaminas foi feita de acordo com Horwitz, 1980.

^a Caseína: 87% de pureza (Herzog, Porto Alegre, Brasil)

^b D-L-Metionina (Merk, Rio de Janeiro, Brasil)

^c Sais minerais: mg/100g de dieta (Roche, São Paulo, Brasil): NaCl, 557; KI, 3,2; KH₂PO₄, 1556; MgSO₄, 229; CaCO₃, 1526; FeSO₄-7H₂O, 108; MnSO₄-H₂O, 16; ZnSO₄-7H₂O, 2,2; CuSO₄-5H₂O, 1,9; COCl-6H₂O, 0,09.

^d Vitaminas: mg/100g de dieta (Roche, São Paulo, Brasil): vitamina A (acetato de retinil), 4; vitamina D (colecalférol), 0,5; vitamina E (acetato de DL- α -tocoferol), 10; menadiona, 0,5; piridoxina (hidroclorato de piridoxina) 0,5; ácido fólico, 0,2; biotina, 0,04; vitamina B₁₂, 0,003.

Fonte: Moreira et al., 2010^a.

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos dos lipídios das dietas^a

	Dieta ω3 %	Dieta D %
Saturados		
C 16:0	10,9	11,1
C 18:0	2,0	2,4
C 20:0	0,5	1,3
C 22:0	0,1	2,9
C 24:0	0,0	1,5
Monoinsaturados		
C 16:1	0,2	0,2
C 18:1	25,4	46,7
C 20:1	0,0	1,6
Poliinsaturados		
C 18:2 ω6	56,6	32,0
C 18:3 ω3	1,2	0,0
C 20:5 ω3 ^b	2,2	0,0
C 22:6 ω3 ^b	3,5	0,0

^a de acordo com O'Brien, 2004.

^b de acordo com o fabricante (Naturalis, Brasil).

FIGURAS

Figura 1 – Captação de glutamato

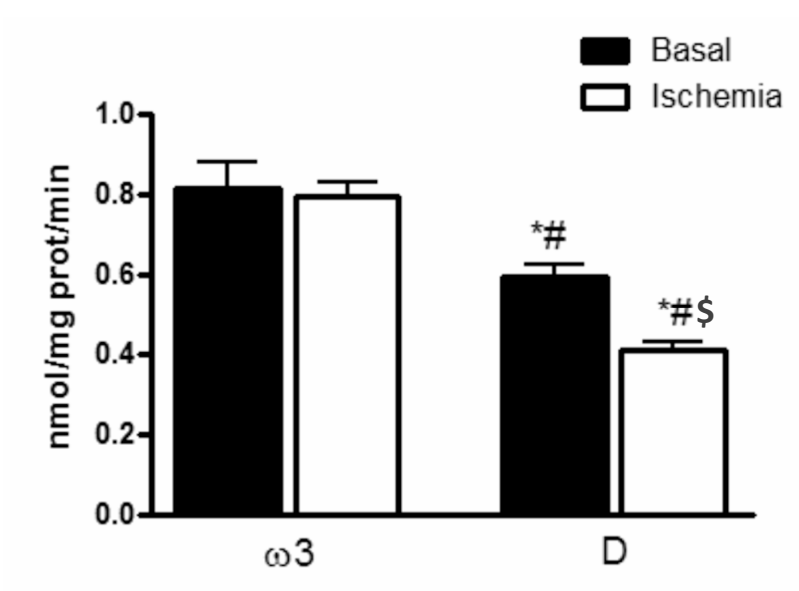


Figura 2 - Western blot GLT-1

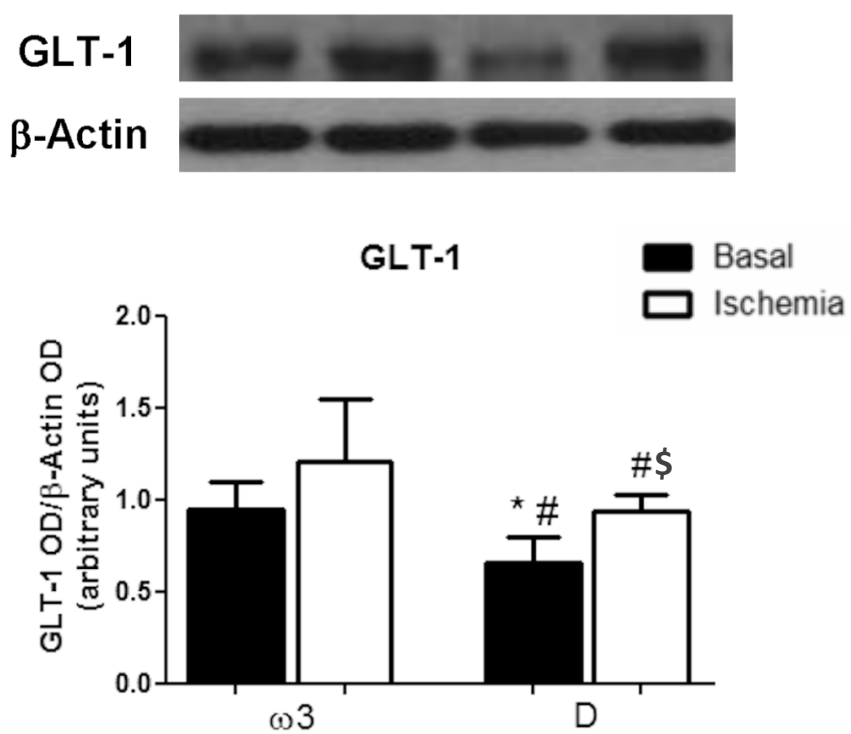


Figura 3 - Western blot EAAC1

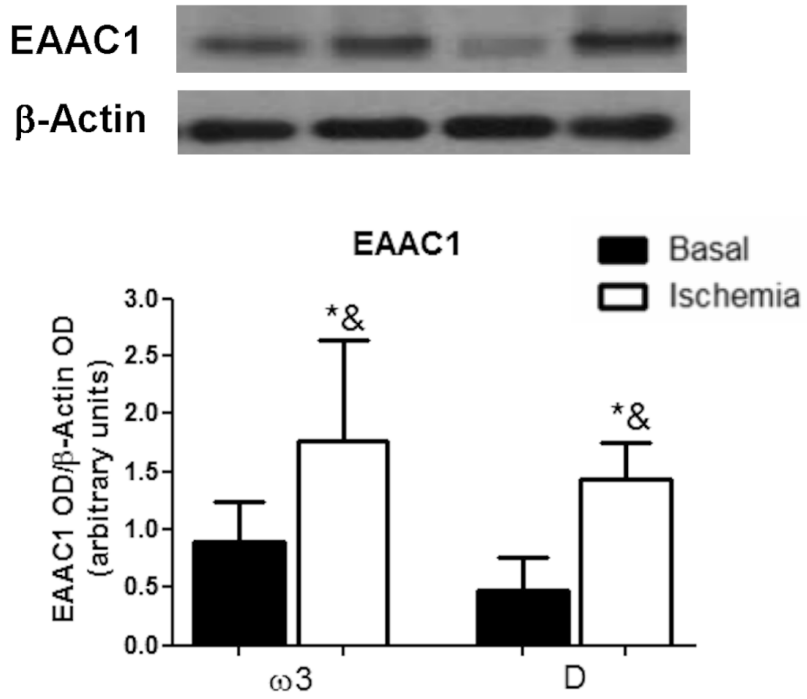


Figura 4 - Western blot GLAST

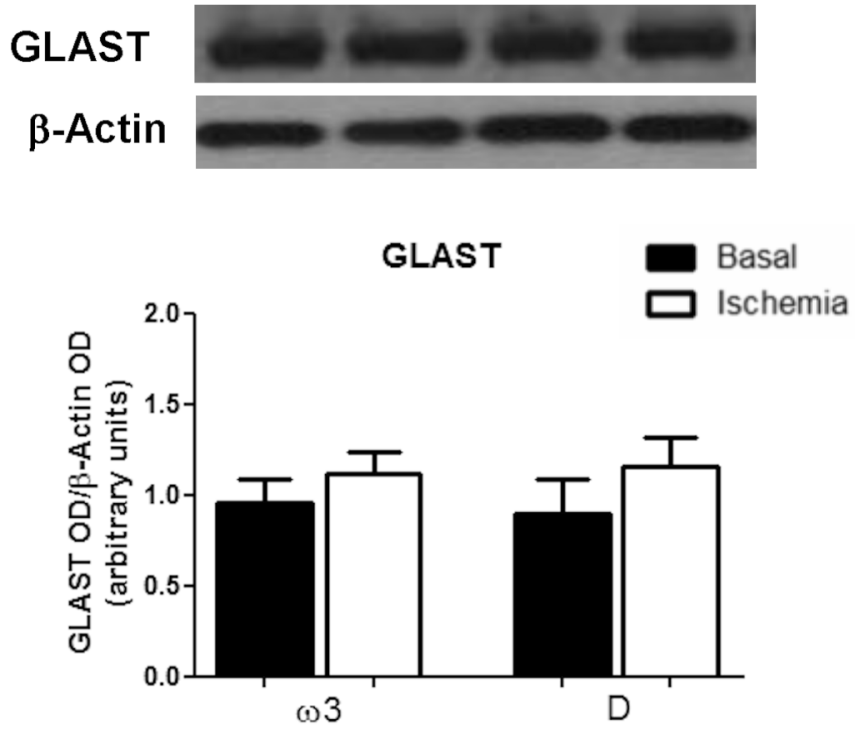
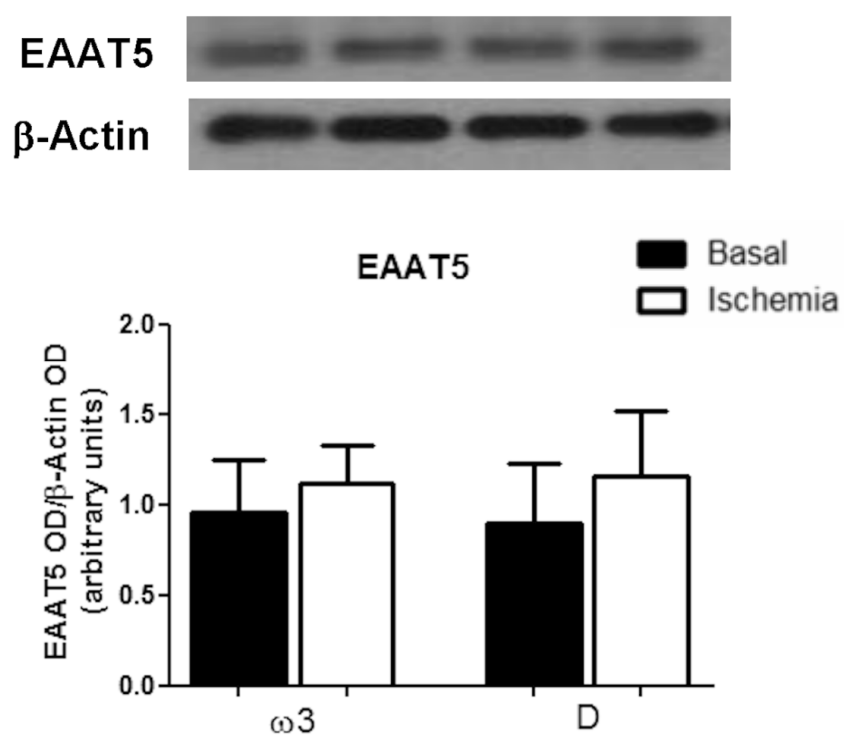


Figura 5 – Western Blot EAAT5



4 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se que a deficiência de ácidos graxos ômega-3 na dieta de ratos Wistar durante o desenvolvimento afetou a funcionalidade do sistema glutamatérgico em condições basais e isquêmicas, aqui visto pelos parâmetros de captação de glutamato e conteúdo dos transportadores GLT-1 e EAAC1.

O papel dos transportadores de glutamato na retina não está bem definido. Sabe-se que o transportador responsável por manter os níveis de glutamato adequados e por evitar, assim, danos às células neurais da retina, é o GLAST, que pode ter sua atividade reduzida perante um insulto isquêmico (HARADA et al. 1998; PEGHINI et al. 1997; RAUEN et al., 1996 e 1998). Neste trabalho, observou-se uma queda na captação de glutamato após a isquemia na retina, sugerindo que a atividade do GLAST foi afetada pela isquemia; porém esta queda não pôde ser associada a uma redução no conteúdo do transportador, pois não houve mudanças neste após a isquemia. Estudos que verificam a expressão de GLAST em resposta ao aumento da pressão intraocular mostram resultados controversos; alguns sem variação ou aumento muito modesto em seu imunoc conteúdo enquanto outros apontam para sua diminuição (SULLIVAN et al., 2006; PARK et al., 2009; MARTIN et al., 2002; SCHUETTAUF et al., 2007).

Outros trabalhos mostram que, durante o insulto isquêmico, ocorre um aumento da liberação de glutamato pelos neurônios, e sua captação fica reduzida, o que caracteriza o evento de excitotoxicidade glutamatérgica (KOBAYASHI et al., 1999; NAPPER et al., 1999). Entretanto, dentro de 1 hora de isquemia-reperfusão, o aumento de fosforilação da ERK reativa o transporte de glutamato pelas células de Müller (AKIYAMA et al., 2002). Apesar da reativação das células de Müller, a interferência na homeostase do glutamato durante o insulto isquêmico é suficiente para iniciar a degeneração excitotóxica e apoptótica (BARNETT E GROZDANIC, 2004). Sabe-se também que o DHA impede a desorganização celular em retinas isquêmicas - o que resultaria em alteração estrutural - e também previne a apoptose dos fotorreceptores através da ativação da rota MAPK/ERK (MURAYAMA et al., 2002; GERMAN et al., 2006). Estes estudos apontam para um possível alvo de ação neuroprotetora dos ácidos graxos ômega-3 na retina, onde estes poderiam estar modulando a atividade da ERK após o insulto isquêmico. Contudo, mais estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados.

Quanto aos transportadores GLT-1 e EAAC1, alguns estudos com ratos *knockout* para estes transportadores não demonstraram anormalidades na retina, enquanto outros apontam o GLT-1 como principal transportador neuronal de glutamato na retina (HARADA et al. 1998; PEGHINI et al. 1997). Em diferentes modelos de glaucoma, foi verificada downregulação de GLT-1 tanto em ratos como em camundongos, utilizando-se, no primeiro estudo, de laser para elevação da pressão intraocular e, no segundo, cauterização de veias da episclera (MARTIN et al., 2002; SCHUETTAUF et al. 2007). Além disso, este transportador é apontado como pré-requisito para manutenção da homeostase do glutamato no glaucoma, e teve um aumento significativo após episódio de isquemia induzida por cauterização, mesmo uma semana depois da injúria. (PARK et al., 2009). Foi demonstrado que a expressão de GLT-1 pode ser ativada pelas células ganglionares após um insulto (SULLIVAN et al., 2006). Este dado poderia explicar o aumento de GLT-1 observado no presente estudo após a isquemia no grupo D. Considerando-se que neste trabalho não houve variação da expressão de GLT-1 no grupo $\omega 3$ e que o conteúdo deste transportador foi maior neste grupo quando comparado ao grupo D, sugere-se que o GLT-1 pode ser o responsável pela ausência de queda na captação de glutamato na retina após a isquemia no grupo $\omega 3$.

Em relação ao EAAC1, localiza-se tanto extrasinapticamente, como sinapticamente, o que sugere seu envolvimento na captação de glutamato também de outra forma que não a inibição da sinapse – na formação de GABA, por exemplo (COCO et al. 1997; WIESSNER et al., 2002). A diminuição deste transportador, juntamente com a diminuição de GLAST, leva à degeneração retínica e ao glaucoma mesmo sem o aumento da pressão intraocular (HARADA et al., 2007; NAMEKATA et al., 2009). Nossos dados mostram um aumento do conteúdo do EAAC1 em ambos os grupos após a isquemia, sugerindo que este pode ser um mecanismo neuroprotetor interno da retina para compensar a baixa atividade de transporte do GLAST. No entanto, não observamos diferença no conteúdo basal deste transportador entre os grupos.

O transportador EAAT5 é expresso primariamente na retina, onde está associado à resposta ao estímulo da luz pré e pós-sinapticamente (GRANT et al., 1995; PICAUD et al., 1995). Arriza et al. (1997) sugerem que este transportador também pode exercer um outro papel fisiológico na retina que não o *clearance* de glutamato, sendo possível que atue como um autorreceptor inibitório.

Assim, verificou-se neste estudo que os ácidos graxos $\omega 3$ presentes na dieta foram capazes de modular os transportadores de glutamato em condições basais e isquêmicas, e este pode ser um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos $\omega 3$ exercem sua neuroproteção na retina. Porém, mais estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da isquemia na retina, a fim de buscar alvos potencialmente terapêuticos para os ácidos graxos ômega-3 dietéticos.

5 CONCLUSÃO

A pesquisa e os experimentos feitos neste trabalho, somados à revisão da literatura, levam, ao final desta etapa de pesquisa, à conclusão de que os ácidos graxos $\omega 3$ presentes na dieta foram capazes de modular os transportadores de glutamato de diferentes formas em condições basais e isquêmicas, e este é um dos possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos $\omega 3$ exercem sua neuroproteção na retina. Entretanto, a continuidade deste trabalho, bem como mais estudos com esta temática são necessários para que se chegue a um consenso sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, H. et al. Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Müller cells and its neuroprotective effects in ischemia-reperfusion injury. **Neuroreport**, Oxford, v. 13, n. 16, p. 2103-2107, nov. 2002.
- ANDRÉ, A. et al. Plasmalogen metabolism-enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. **Biochimie**, Paris. v. 88, p. 103-111. 2005.
- ARCHIBALD, N.K. et al. The Retina in Parkinson's Disease. **Brain**, Oxford, v. 132, n.5, p. 1128-1145, mar. 2009.
- ARRIZA, J.L. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 94, p. 4155-4160, abr. 1997.
- BANTLE, J.P. et al. Nutrition recommendations and Interventions for Diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, Alexandria VA, v. 31, p. 561-578, jan. 2008.
- BARNETT, N. L.; POW, D. V.; BULL, N. D. Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischemia. **Neurochem. Int.**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 291-299, out. 2001.
- BARNETT, N.L. e GROZDANIC, S.D. Glutamate transporter localization does not correspond to the temporary functional recovery and late degeneration after acute ocular ischemia in rats. **Exp. Eye Res.**, London, v. 79, n. 4, p. 513-524, out. 2004.
- BAZAN, N.G. Decreased content of docosahexaenoate and arachidonate in plasma phospholipids in Usher's syndrome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando FL, v. 141, n.2, p. 600-604, dez. 1986.
- BAZAN, N.G., Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. **Brain Pathol.**, Zurich, v. 15, n.2, p. 159-166. abr. 2005.
- BERRY, C.B. et al. Differential modulation of glutamate transporters GLT-1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid. **Brain Res.** v. 1037, p. 123-133. 2005.
- BIRCH, E.E. et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. **Dev. Med. Child Neurol.** v. 42, n. 3, p. 174-181, mar. 2000.
- BRINGMANN, A. et al. Müller cells in the health and diseased retina. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 25, n. 4, p. 397-424, jul. 2006.
- BURR, G.O. e BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J. Biol. Chem.** Baltimore MD. v. 82, p. 345-367. 1929.

CALDER, P.C.; YAGOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **Biofactors**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 266-272, maio/jun. 2009.

CAO, D. et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. **J. Neurochem.**, New York NY, v. 111, n. 2, p. 510-521, out. 2009.

COCO, S. et al. Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 1902–1910, set. 1997.

COPENHAGEN, D. R. e JAHR, C. E. Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. **Nature**, London, v. 341, n. 12, p. 536-539, out. 1989.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** Oxford, v. 65, n.1, p. 1-105, set. 2001.

DELION, S. et al. α -Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rat frontal cortex. **J. Neurochem.** New York NY, v. 66, p. 1582-1591, 1996.

DREYER, E. B. et al. Elevated glutamate levels in the vitreous body of human and monkeys with glaucoma. **Arch. Ophthalmol.**, Chicago IL, v. 114, n.3, p. 299-305, mar. 1996.

DREYER, E. B.; GROSSKREUTZ, C. L. Excitatory mechanism in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). **Clin. Neurosci.**, New York NY, v. 4, n. 5, p. 270-273, 1997.

DYALL, S.C. et al. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age related decrease in GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. **Neurobiol. Aging**, New York NY. v. 28, n. 3, p. 424-439. 2006.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A. Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. **J. Mol. Neurosci.**, Totowa NJ. v. 16, p. 263-272. 2001.

FLIESLER, S.J.; ANDERSON, R.E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. **Prog. Lipid. Res.**, v. 22, n. 9, p. 79–131, 1983.

GARCIA, M.C. et al. Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylethanolserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. **J. Neurochem.**, New York, NY. v. 70, p. 24-30. 1998.

GERMAN, O.L. et al. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. **J. Neurochem.**, New York NY, v. 98, n.5, p. 1507-1520, set. 2006.

GRANT, G. B. e DOWLING, J. E. **A glutamate-activated chloride current in cone-driven ON bipolar cells of the white perch retina.** **J. Neurosci.**, Washington DC, v. 15, p. 3852–3862, maio 1995.

GRINTAL, B. et al. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. **J. Neurochem.**, New York NY, v. 54, n. 8, p. 535-543. Jul. 2009.

HAAG, M. Essential fatty acids and the brain. **Cann. J. Psychiatry**, Ottawa. v. 48, n. 3, p. 195-203. 2003.

HANSEN, A.E. et al. The relation of linoleic acid to infant feeding. **Acta of paediatric.** v. 51, n. 137, p. 1-41. 1962.

HARADA, T. et al. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT1 in the retina. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington DC, v. 95, n. 8, p. 4663-4666, abr. 1998.

HARADA, T. et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. **J. Clin. Invest.** v. 117, n.7, p. 1763-1770, jun. 2007.

HEIRD, W.C.; LAPILLONNE, A. The role of essential fatty acids in development. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto CA. v. 25, p. 549-571. 2005.

HIBBELN, J.R. et al. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. **Lancet.** v. 369, n. 9561, p. 578-585, fev. 2007.

HOFFMAN, D.R. e BIRCH, D.G. Docosahexaenoic acid in red blood cells of patients with X-linked retinitis pigmentosa. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Brookline MA, v. 36, n. 5, p. 1009-1018, maio 1995.

HOLCOMBE, D. J. et al. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport. **Acta Ophthalmol. Scand.**, Copenhagen, v. 86, n. 4, p. 408-14, jun. 2008.

HOLMAN, R.T; JOHNSON, S.B.; HATCH, T.F. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda MD. v. 35, n. 3, p. 617-623. 1982.

JUDGE, M.P.; HAREL, O.; LAMMI-KEEFE, C.J. A docosahexaenoic acid functional food during pregnancy benefits infant visual acuity at four but not six months of age. **Lipids.** v. 42, n. 2, p. 117-122. Mar. 2007.

KEW, J. N. e KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)** Berlin, v. 179, p. 4-29. 2005.

KOBAYASHI, N.; ISHIGURO, S.; TOMITA, H.; NISHIKAWA, S.; TAMAI, M. Changes of GABA metabolic enzymes in acute retinal ischemia. **Exp. Eye Res.**, London, v. 69, n.1, p. 91-96, jul. 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; GRIEGER, J.A.; ETHERTON, T.D. Dietary reference intakes for DHA and EPA. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids** Edinburgh, v. 81, n. 2-3, p. 99-104, ago./set. 2009.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H.S.; MICHAELSEN, K.S. The essentiality of long chain omega-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog. Lipid. Res.** v.40, p. 1-94. 2001.

LICHTENSTEIN, A.H. et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, Dallas TX, v. 114, n. 1, p. 82-96, jul. 2006.

LIM, S.Y.; HOSHIBA, J.; SALEM, N. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. **J. Neurochem.**, New York NY. v. 95, n. 3, p. 848-857. 2005^a.

LIM, S.Y. et al. Lead exposure and (n-3) fatty acid deficiency during rat neonatal development affect subsequent spatial task performance and olfactory discrimination. **J. Nutr.** Bethesda MD. v. 135, n. 5, p. 1019-1026. 2005^b.

MARCHESELLI, V. L. et al. Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. **J. Biol. Chem.**, Baltimore MD, v. 278, n. 44, p. 43807–43817, out. 2003.

MARSZALEK, J.R. e LODISH, H.F. Docosahexaenoic Acid, Fatty Acid-Interacting Proteins, and Neuronal Function: Breastmilk and Fish are Good for You. **Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.**, Palo Alto CA, v. 21, p. 663-657, 2005.

MARTIN, R.E., BAZAN, N.G. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. **J. Neurochem.**, New York NY. v. 59, p. 318-325. 1992.

MARTIN, K.R. et al. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Brookline MA, v. 43, n. 7, p. 2236–2243, jul. 2002.

MASSEY, S. C. e MILLER, R. F. Excitatory amino acid receptors of rod and cone-driven horizontal cells in the rabbit retina. **J Neurophysiol.**, Bethesda MD, v. 57, p. 645-659. 1987

MASSEY, S. C. e MILLER, R. F. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. **J Neurophysiol.**, Bethesda MD, v. 57, n. 3, p. 645-659, mar. 1990.

MOREIRA, J.D. et al. Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: Relevance for behavior alterations. **Neurochem. Int.**, Oxford. v. 56, n. 6-7, p.753-759, mai/jun. 2010a.

MOREIRA, J.D., et al. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. **J. Nutr. Biochem.** v. 21, p. 351–356, 2010b.

MORIGUCHI, T; GREINER, R.S.; SALEM, N. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. **J. Neurochem.**, New York NY. v. 75, n. 6, p. 2563-2573. 2000.

MUKHERJEE, P.K. et al. Neuroprotectin D1: A docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Neuroscience**, Washington DC, v. 101, n. 22, p. 8491–8496, jun. 2004.

MURAYAMA, K. et al. Fish oil (polyunsaturated fatty acid) prevents ischemic-induced injury in the mammalian retina. **Exp. Eye Res.**, London, v. 74, n. 6, p. 671-676, jun. 2002.

NAMEKATA, K. et al. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice. **Neurosci. Lett.**, Nimerick. v.465, n. 2, p. 160-164, nov. 2009.

NAPPER, G. A.; PIANTA, M. J.; KALLONIATIS, M. Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. **Vis. Neurosci.**, Cambridge Eng, v. 16, n. 1, p. 149-158, jan./fev. 1999.

NIU, S.L. et al. Reduced G-protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. **J. Biol. Chem.**, Baltimore MD. v. 279, n. 30, p. 31098-31104, 2004.

OSBORNE, N. N. et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. **Surv. Ophthalmol.**, Amsterdam, v. 43, p. S102-S128, jun. 1999.

OSBORNE, N. N. et al. Retinal Ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. **Prog. Retin. Eye Res.** v. 23, n. 1, p. 91-147, jan. 2004.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 581-618, abr. 1998.

PARK, C.K. et al. Differential expression of two glutamate transporters, GLAST and GLT-1, in an experimental rat model of glaucoma. **Exp. Brain Res.**, Berlin, v. 197, n. 2, p. 101–109, ago. 2009.

PEGHINI, P.; JANZEN, J., STOFFEL, W. Glutamate transporter EAAC1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioural abnormalities but no degeneration. **Embo J.**, Oxford. v. 16, n. 13, p. 3822–3832, jul. 1997.

PICAUD, S. et al. Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Washington DC, v. 92, n. 20, p. 9417–9421, set. 1995.

POW, D. V. E BARNETT, N. L. Changing Patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retina are mediated by the Muller cells glutamate transporter GLAST. **Cell. Tissue Res.**, v. 297, n.1, p. 57-66, jul. 1999.

POW, D. V. E BARNETT, N. L. Development expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 280, n. 1, p. 21-24, fev. 2000.

RAUEN, T. e KANNER, B. I. Localization of glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retina. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 169, n. 1-2, p. 137-140, mar. 1994.

RAUEN, T.; ROTHSTEIN, J. D.; WASSLE, H.. Diferential expression of three glutamate transporter subtypes in rat retina. **Cell Tissue Res.**, v. 286, n. 3, p. 325-336, dez. 1996.

RAUEN, T. et al. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. **Cell Tissue Res.** v. 291, n. 1, p. 19-31, jan. 1998.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, Cambridge MA. v. 16, p.675-686. 1996.

RIEPE, R.E.; NORENBURG, M.D. Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. **Nature**, London, v. 268, p. 654-655, 1977.

SANGIOVANI, J.P. e CHEW, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 24, n. 1, p. 87-138, jan. 2005.

SCHUETTAUF, F. et al. Alterations of amino acids and glutamate transport in the DBA/2J mouse retina: possible clues to degeneration. **Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, Berlin, v. 245, n. 8, p. 157-1168, ago. 2007.

SCHULTZ, K. e STELL, W. K. Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. **Neurosci. Lett.**, Limerick, v. 211, n. 3, p. 191-194, jun.1996.

SCOTT, B.L. e BAZAN, N.G. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Washington DC, v. 86, n. 8, p. 2906-2907, abr. 1989.

SEGOVIA, G. et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech. Ageing. Dev.**, Limerick. v. 122, n. 1, p. 1-29, jan. 2001.

SIMOPOULOS, A. P.; LEAF, A.; SALEM, N. JR. Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, Edinburgh, v. 63, n. 3, p. 119-121, set. 2000.

STILLWELL, W., WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chem. Phys. Lipids.** v. 126, n. 1, p. 1-27, nov. 2003.

SUCHER, N. J.; LIPTON, S. A.; DREYER, E. B. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. **Vision Res.** Exeter, v. 37, n. 24, p. 3483-3493, dez. 1997.

SULLIVAN, R.K.P. et al. Evoked Expression of the Glutamate Transporter GLT-1c in Retinal Ganglion Cells in Human Glaucoma and in a Rat Model. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, Brookline MA. v. 47, n. 9, p. 3853-3859, setembro 2006.

TZINGOUNIS, A.V.; WADICHE, J.I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 8, p. 935-947, dez. 2007.

WHO/FAO Expert Consultation, 2003. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. WHO Technical Reports Series. 916.

WIESSNER, M. et al. Localization and possible function of the glutamate transporter EAAC1 in the rat retina. **Cell. Tissue Res**. v. 310, n. 1, p. 31–40, out. 2002.

WILLIARD, D.E. et al. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. **J. Lipid. Res.**, Bethesda MD. v. 42, n. 9, p. 1368-1376. 2001.

ZIMMER, L. et al. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. **J.Lipid. Res.**, Bethesda MD. v. 41, n. 1, p. 32-40, jan. 2000.

ANEXO A – Normas para publicação - Experimental Eye Research - Elsevier

Guide for Authors

The official journal of the International Society for Eye Research

Online submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding Author:
- E-mail address of corresponding Author
- Full postal address of corresponding Author
- Telephone and fax numbers (with country code) of corresponding Author

- All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure legends
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked"

- Abstract is in the correct format specified by this journal

- References are in the correct format specified by this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in colour on the Web only (free of charge) with black-and-white version in print

If only colour on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com.

Submission of articles

General

It is essential to provide the fax number and e-mail address of the designated corresponding Author when submitting a manuscript. Manuscripts must be written in grammatically correct English.

Submission of an article implies that: the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis); that the manuscript is not presently or imminently under consideration for publication elsewhere; that the version submitted for publication has been approved by all designated authors (and tacitly or explicitly approved by the responsible authorities where the work was carried out); and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same or similar form, in any language, without the written consent of the Publisher. **In general, persons designated as Authors must qualify for authorship, as specified in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals [see <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>].**

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://www.elsevier.com/authorsrights>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/authors>).

Should Authors be requested by the Editor to revise the text, the revised version should be submitted within eight weeks. After this period, the article will be regarded as a new submission.

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this

general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

On-line submission to the journal prior to acceptance

Submission to this journal proceeds totally on-line. Use the following guidelines to prepare your article. Via the following web page (☞ <http://www.elsevier.com/locate/inca/yejer>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files, text, tables and illustrations. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be by e-mail.

Electronic format requirements for accepted articles

General points

Although the journal accepts most wordprocessing formats, MS Word or WordPerfect are preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

Wordprocessor documents

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessing program used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word-processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word-processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also [☞http://www.elsevier.com/artworkinstructions](http://www.elsevier.com/artworkinstructions)). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your word-processor.

Preparation of text

Presentation of manuscript

General

Please write your text in grammatically correct English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Polishing.

For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Present tables and figure captions on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively.

Provide the following data on the title page (in the order given).

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please clarify the name, accordingly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 500 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with

abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

N.B. Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Arrangement of the article

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results. Results should be clear and concise.

Discussion. This should explore the significance of the results of the work and not repeat them.

Acknowledgements. Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References. See separate section, below.

Figure legends, tables, figures, schemes. Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see [Preparation of illustrations](#)).

Footnotes. Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word-processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Table footnotes. Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, Authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. (**AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the **printed article**, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of supplementary data. Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

This journal offers electronic submission services and supplementary data files can be uploaded via <http://ees.elsevier.com/yexer>. *Policy and ethics.* The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>, EC Directive 86/609/EEC for animal experiments; <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>, and The Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors.

Citations in the text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Citing and listing of Web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (Author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single Author:* the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two Authors:* both Authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more Authors:* first Author's name followed by "et al." and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Commissioned Articles

Letter to the Editor Short (not more than four printed pages, approximately 4,000 words) communications on current research or remarks on recently published papers may be submitted as Letter to the Editor. Letters will be reviewed and published promptly.

Focus on Molecules

These feature articles provide a brief overview of a specific molecule involved in ocular tissues of the visual system. In final printed form, this contribution should be no longer than two pages (front and back of one published page in *Experimental Eye Research*) and contain sufficient information to give a succinct review of the molecule, its structure, its role in the cell/tissue where it is expressed, the disease caused by its absence or mutation (if applicable), and potential areas of interest for future studies.

Each article should contain the following headings (the first four being numbered):

- Structure (including the accession number if a protein; EC number if an enzyme)
- Function
- Disease Involvement
- Future Studies
- References

Article Specification:

- The article should not exceed 1300 words in length including equivalent space for one figure (the latter occupying the equivalent space of up to 175 words). A colour diagram of predicted or determined structure is desirable and will be published without charge
- References to be limited to no more than four key citations.
- Please provide a word count on the first page of your manuscript.
- Please submit the final article on-line at <http://ees.elsevier.com/yexer/>. Please ensure you select the correct article type (*Focus on Molecules*) when uploading your article.

If you would like to submit an unsolicited *Focus on Molecules* article for consideration, or if you have any editorial queries, please contact the *Focus on Molecules* editor, Dr S. Fliesler, at: Fliesler@buffalo.edu.

Reviews

Review articles should be succinct and pithy, hence the suggested length is 4000 words including space for tables, figures and references. If colour is necessary colour figures will be published without charge. For more information please consult the general guidelines for authors.

Please submit the final review on-line at <http://ees.elsevier.com/yexer/>. Please ensure you select the correct article type (Review) when uploading your article.

Preparation of illustrations

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Always upload high-quality e-files of your artwork.
- Make sure you use uniform lettering and sizing in your artwork.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately, especially if multi media files are uploaded.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

This journal offers electronic submission services and graphic files can be uploaded via <http://ees.elsevier.com/yexer>

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your word-processor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-electronic illustrations

Upload all illustrations as high-quality e-files, suitable for reproduction (which may include

reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly label all illustrations with the figure number.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

Colour reproduction

On the Web: If you submit usable colour figures with your accepted article, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether they are reproduced in colour or black-and-white in the printed version of the article.

In the print journal: Effective for papers submitted after 1st March 2008, all color artwork in the printed issue will be billed at Euro 200 (approx. US\$ 300) per figure, unless the corresponding author of the paper is a member of ISER in good standing. To be exempt from being charged for reproducing figures in colour in print, the corresponding author must state that he or she is a member of ISER, providing the relevant membership number for verification, when prompted during the online submission process in EES.

Important: Please indicate clearly which of the submitted colour figures are to be reproduced in colour or in black-and-white in the print journal. Should you not opt for colour in print, please submit in addition usable black-and-white prints corresponding to the colour illustrations in question; this is necessary because of technical complications that can arise when converting colour figures to 'grey scale'.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see

☞ <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Legends

Ensure that each illustration has a legend. Supply legends in a separate file, not attached to the figure. A legend should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

Please provide high-quality e-files. The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Please upload original source files. Remove non-essential areas of a photograph. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Submit high-quality source files of figures close to the size expected in publication. Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other platforms). For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Proofs

When your manuscript is received by Production it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

A form with queries from the Typesetter may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within 48 hours of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.