

*Ana Rita Costa Silva Álvaro*

**Neuropeptídeo Y e os seus  
receptores na retina:  
da proliferação celular à neuroprotecção**



Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra

2008







**O Neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina: da  
proliferação celular à neuroprotecção**

**Ana Rita Costa Silva Álvaro**

**Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra  
2008**



# **O Neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina: da proliferação celular à neuroprotecção**

**Ana Rita Costa Silva Álvaro**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas de doutoramento em Ciências e Tecnologias da Saúde, na especialidade de Biologia Celular e Molecular.

Este trabalho foi realizado no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, ao abrigo de uma bolsa de doutoramento atribuída pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/12900/2003), sob orientação da Professora Doutora Cláudia Margarida Gonçalves Cavadas e do Doutor António Francisco Rosa Gomes Ambrósio.

**Faculdade de Farmácia  
Universidade de Coimbra  
2008**



## **Agradecimentos**

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra agradeço a oportunidade que me proporcionou na realização do meu trabalho prático.

À Professora Doutora Cláudia Cavadas, pela orientação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Tenho ainda que agradecer ao seu “instinto”, sem o qual a escolha poderia não ter recaído em mim, e por sempre ter acreditado que o NPY e a retina, afinal, fazem sentido! Agradeço também a oportunidade que me concedeu na participação de actividades de divulgação científica que, para além de me ter proporcionado momentos de boa disposição, permitiu-me enriquecer, viver experiências gratificantes e tomar contacto com a realidade, fora do laboratório. Obrigada, ainda, pelo apoio durante os períodos mais desmotivados e pela amizade e compreensão, nos momentos de luto. Obrigada!!

Ao Doutor Francisco Ambrósio, pela colaboração, organização e pragmatismo com que também orientou esta tese. Pelos seus momentos de bom humor e expressões únicas, que me fizeram sorrir, ajudando a ultrapassar as dificuldades, e pelo reforço positivo que me concedeu em todas as apresentações.

À Professora Doutora Emília Duarte, pela disponibilidade ao meu acolhimento no seu gabinete. Obrigada pelas palavras de conforto, quando os dias não sorriam, e pelo incentivo no prosseguimento deste trabalho.

À Joana, pelo apoio, sugestões e entreatajuda, na realização deste trabalho. A cumplicidade que tivemos permitiu-nos uma articulação perfeita entre a adrenalina e a retina! Pelos momentos que vivemos, nos nossos extraordinários ensaios! E, claro, por toda a amizade que nos uniu e nos ajudou a ultrapassar momentos menos bons. Afinal de contas, fazemos parte da melhor e maior bandeira nacional! Obrigada, “Joni”!

Aos meus colegas e amigos de laboratório, pelo excelente ambiente de trabalho, permitindo que o desânimo nunca fosse palavra de ordem e pela ajuda: Ana Carina, Ana Lúcia, Ana Maria, Ana Paula, Ana Tellechea, Armando, Áurea, Bruno, Catarina, Célia, Denisa, Dra. Caetana, Ermelindo, Filipa, Gabriel, Inês Morte, Isabel, Joana Gaspar, Paulo, Rita Almeida,

Susana, Tiago, “Tita”. Um agradecimento especial ao João e à Inês Araújo, por toda a colaboração, ajuda e empenho; à Ana e à Raquel, pelo apoio e boa disposição que partilhámos no mesmo gabinete. A todos vós devo, também, a realização deste trabalho!

À Fátima não posso deixar de realçar a sua disponibilidade para ajudar, sempre, a sua vontade de aprender e de nos ter facilitado, em tudo, o trabalho. O laboratório, sem a Fátima, não seria o mesmo.

A todos os meus amigos, extra laboratório, pela amizade e compreensão que manifestaram durante esta fase, em especial à Ana Luísa e à Cátia.

Ao Gonçalo, por me ter acompanhado e apoiado sempre, pacientemente, ao longo desta etapa. Obrigada, por me teres dado força e coragem, quando a mim me faltou!

Aos meus pais, por sempre terem acreditado, incondicionalmente, em mim e por me apoiarem nas minhas decisões. Sem eles, o meu percurso nunca teria sido possível. Muito obrigada!!

**Os resultados apresentados nesta dissertação estão publicados ou foram submetidos para publicação em revistas científicas internacionais com arbitragem:**

Álvaro, AR, Rosmaninho-Salgado, J, Santiago, AR, Martins, J, Avelaira, C, Santos, PF, Pereira, T, Gouveia, D, Carvalho, AL, Grouzmann, E, Ambrósio, AF, Cavadas, C (2007). NPY in rat retina is present in neurons, in endothelial cells and also in microglial and Müller cells. *Neurochemistry International* 50: 757-763

Álvaro, AR, Martins, J, Costa, AC, Fernandes, E, Carvalho, F, Ambrósio, AF, Cavadas, C (2007). Neuropeptide Y protects retinal neural cells against cell death induced by ecstasy. *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.027

Álvaro, AR, Martins, J, Araújo, IM, Rosmaninho-Salgado, J, Ambrósio, AF, Cavadas, C. Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation – involvement of nitric oxide. (submetido para publicação)

Álvaro, AR, Rosmaninho-Salgado, J, Silva, AP, Ambrósio, AF, Cavadas, C. Neuropeptide Y inhibits the  $[Ca^{2+}]_i$  changes through NPY  $Y_1$ , NPY  $Y_4$  and NPY  $Y_5$  receptors in rat retina neural cell cultures. (submetido para publicação)

*CAPA: Fotografia de um neurónio da retina de rato em cultura*

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	vii
<b>Resumo</b>	1
<b>Summary</b>	4

## Capítulo 1 Introdução geral

<b>1.1 A Retina</b>	11
1.1.1 Anatomia da retina	11
1.1.2 Vias de transmissão de sinal na retina	15
1.1.3 Principais neurotransmissores na retina	16
1.1.3.1 Glutamato	16
1.1.3.2 GABA	18
1.1.4 Rede vascular da retina	19
1.1.5 Neurogénese na retina	21
1.1.5.1 Células estaminais no olho	22
1.1.5.2 Células estaminais/progenitoras da retina	23
1.1.5.3 Epitélio ciliar adulto como fonte de células progenitoras neuronais	25
1.1.5.4 Células de Müller como células estaminais da retina	26
1.1.5.5 Regeneração e terapia celular em doenças oculares	27
<b>1.2 O Neuropeptídeo Y (NPY)</b>	29
1.2.1 O peptídeo: estrutura, síntese, localização e metabolização	29
1.2.2 Receptores do NPY	32
1.2.2.1 O receptor Y <sub>1</sub>	32
1.2.2.2 O receptor Y <sub>2</sub>	33
1.2.2.3 O receptor Y <sub>3</sub>	33
1.2.2.4 O receptor Y <sub>4</sub>	34
1.2.2.5 O receptor Y <sub>5</sub>	34
1.2.2.6 O receptor y <sub>6</sub>	34
1.2.2.7 Vias de transdução de sinal acopladas aos receptores do NPY	34
1.2.3 O NPY e os seus receptores na retina	35
1.2.4 Efeitos do NPY: da neuromodulação à neuroprotecção	36
1.2.4.1 Efeito neuromodulador do NPY	36
1.2.4.2 Efeito proliferativo do NPY	38
1.2.4.2.1 Proteínas cinases activadas por agentes mitogénicos (MAPK) e o efeito proliferativo do NPY	39
1.2.4.2.2 O monóxido de azoto (NO) e o efeito proliferativo do NPY	42
1.2.4.2.3 O NO na retina: localização das isoformas da NOS e regulação fisiológica	46
1.2.4.3 Efeito neuroprotector do NPY	48
<b>1.3 A Neurotoxicidade na retina</b>	49
1.3.1 Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose	49
1.3.1.1 Caspases	50
1.3.2 Cálcio: o mensageiro secundário intracelular na retina	51
<b>1.4 A MDMA</b>	52
1.4.1 A história da MDMA – MDMA: sinónimo de “ecstasy”?	52
1.4.2 A farmacologia da MDMA	53
1.4.2.1 MDMA – Agonista monoaminérgico indirecto	53
1.4.2.2 MDMA – Agonista dos receptores da serotonina tipo 2A	55
1.4.2.3 MDMA – Farmacocinética	55
1.4.2.4 Efeitos agudos da MDMA em modelos animais e no homem	57
1.4.3 Efeitos crónicos da MDMA – Neurotoxicidade	60
1.4.3.1 Neurotoxicidade induzida por MDMA – evidências em modelos animais	

e humanos	60
1.4.3.2 Neurotoxicidade induzida por MDMA – mecanismos de neurotoxicidade	60
1.4.3.2.1 Hipertermia	60
1.4.3.2.2 A importância do metabolismo da MDMA na sua toxicidade	62
1.4.4 A MDMA na retina	63
1.4.4.1 Evidências de toxicidade da MDMA na retina - casos clínicos	63
1.4.4.2 A Serotonina e os Receptores Serotoninérgicos na retina	64
<b>1.5 Objectivos do trabalho</b>	<b>65</b>

## **Capítulo 2**

### **Materiais e Métodos**

<b>2.1 Materiais</b>	<b>71</b>
<b>2.2 Animais</b>	<b>72</b>
<b>2.3 Modelos celulares</b>	<b>72</b>
2.3.1 Cultura primária de células da retina de rato	72
2.3.2 Cultura primária de microglia da retina de rato	73
2.3.3 Cultura de células endoteliais da retina de rato (linha celular TR-iBRB2)	74
2.3.4 Cultura de células de Müller da retina de rato (linha celular TR-MUL)	75
<b>2.4 Experiências de libertação de NPY em culturas primárias de retina</b>	<b>75</b>
2.4.1 Doseamento do NPY	76
<b>2.5 Imunocitoquímica</b>	<b>76</b>
2.5.1 Avaliação da proliferação celular por incorporação de BrdU	78
<b>2.6 Extracção de ARN e Reacção de Polimerização em Cadeia com Transcrição Reversa “Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR)</b>	<b>79</b>
2.6.1 Extracção de ARN total de culturas celulares	79
2.6.2 Extracção de ARN total de amostras de tecido	80
2.6.3 Quantificação de ARN	81
2.6.4 RT-PC	81
2.6.4.1 Transcrição Reversa	81
2.6.4.2 Reacção de Polimerização em Cadeia	81
<b>2.7 Ensaios de Viabilidade celular</b>	<b>83</b>
2.7.1 Ensaio da redução do MTT	83
2.7.2 Ensaio de Iodeto de Propídio	83
<b>2.8 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) e “Western e Blot”</b>	<b>84</b>
2.8.1 Preparação de extratos celulares	84
2.8.2 SDS-PAGE e “Western Blot”	84
<b>2.9 Imagiologia de cálcio intracelular em células individuais com a sonda Fura-2/AM</b>	<b>85</b>
<b>2.10 Análise Estatística</b>	<b>89</b>

## **Capítulo 3**

### **O Neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina de rato**

<b>3.1 Introdução</b>	<b>95</b>
<b>3.2 Resultados</b>	<b>96</b>
3.2.1 Determinação do conteúdo de NPY na retina de rato e em culturas de células da retina	96
3.2.2 A expressão de NPY em diferentes tipos de células da retina	96
3.2.3 Presença do ARNm do NPY e dos receptores do NPY por RT-PCR nas células	96

da retina de rato	99
3.2.4 Liberação de NPY das células da retina em cultura	100
<b>3.3 Discussão</b>	<b>101</b>
<b>Capítulo 4</b>	
<b>O Neuropeptídeo Y inibe as alterações da <math>[Ca^{2+}]_i</math> induzida por KCl nos neurónios da retina de rato através da activação dos receptores do NPY <math>Y_1</math>, <math>Y_4</math> e <math>Y_5</math></b>	
<b>4.1 Introdução</b>	<b>109</b>
<b>4.2 Resultados</b>	<b>110</b>
4.2.1 O NPY inibe as alterações da $[Ca^{2+}]_i$ evocadas por KCl em neurónios da retina em cultura	110
4.2.2 Efeito dos agonistas e antagonistas dos receptores do NPY nas variações da $[Ca^{2+}]_i$ induzidas por KCl nos neurónios da retina	112
<b>4.3 Discussão</b>	<b>115</b>
<b>Capítulo 5</b>	
<b>O Neuropeptídeo Y estimula a proliferação das células da retina em cultura: envolvimento do monóxido de azoto</b>	
<b>5.1 Introdução</b>	<b>123</b>
<b>5.2 Resultados</b>	<b>124</b>
5.2.1 O NPY estimula a proliferação de células da retina de rato em cultura	124
5.2.2 O NPY promove a proliferação das células da retina através da activação dos receptores do NPY do subtipo $Y_1$ , $Y_2$ e $Y_5$	125
5.2.3 O NPY aumenta a proliferação de células precursoras da retina	126
5.2.4 O efeito proliferativo do NPY é mediado pela via do NO-GMPc	128
5.2.5 O efeito proliferativo do NPY é mediado pela activação da ERK 1/2.	129
<b>5.3 Discussão</b>	<b>131</b>
<b>Capítulo 6</b>	
<b>O efeito protector do NPY na toxicidade induzida pela MDMA nas células da retina em cultura</b>	
<b>6.1 Introdução</b>	<b>139</b>
<b>6.2 Resultados</b>	<b>141</b>
6.2.1 A MDMA induz morte celular nas células da retina em cultura: efeito dependente da concentração e da temperatura	141
6.2.2 Efeito protector do antagonista selectivo do receptor 5-HT <sub>2A</sub> na toxicidade causada pela MDMA	143
6.2.3 Efeito tóxico da MDMA nos diferentes tipos de células da retina: neurónios, células da macróglia e da microglia	144
6.2.4 Efeito protector do NPY na toxicidade induzida pela MDMA nas células da retina em cultura	146
<b>6.3 Discussão</b>	<b>149</b>
<b>Capítulo 7</b>	
<b>Discussão e conclusão geral</b>	<b>155</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>167</b>



## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
bp	pares de bases
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albumina sérica bovina
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração intracelular de cálcio livre
CLAP	Quimiosstatina, leupeptina, antiparina, pepstatina A
DA	Dopamina
DG	Giro dentado
DMEM	Meio essencial mínimo de eagle modificado
DTT	Ditiotreitol
ECF	Quimiofluorescência melhorada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Sintase do monóxido de azoto endotelial
ERK 1/2	Proteína cinase reguladora do sinal extracelular 1 e 2
FCS	Soro fetal bovino
FMN	Flavina adenina mononucleótido
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GFAP	Proteína ácida fibrilar da glia
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)peperazina-N'-2-etanossulfónico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
TPH	Hidroxilase do triptofano
iNOS	Sintase do monóxido de azoto indutível
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato de inositol
L-NAME	Éster metílico de L-nitroarginina
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAO	Oxidase das monoaminas
MAPK	Proteína cinase activada por agentes mitogénicos
MAP-2	Proteína-2 associada aos microtúbulos
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MDA	metilenedioxianfetamina
$\alpha$ -MeDA	$\alpha$ -metildopamina
MEM	Meio mínimo essencial
MTT	Brometo de 2,5-difeniltetrazólio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
m/v	Massa por volume
NA	Noradrenalina
N-Me- $\alpha$ -MeDA	N-metil- $\alpha$ -metildopamina
NO	Monóxido de azoto
NOS	Sintase do monóxido de azoto
nNOS	Sintase do monóxido de azoto neuronal
NPY	Neuropeptídeo Y
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona
PBS	Tampão salino de fosfato
PI	Iodeto de propídio

## **Abreviaturas**

---

PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase sensível ao GMPC
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PP	Polipeptídeo pancreático
PYY	Peptídeo YY
r.p.m	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
SERT	Transportador da serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TBS	Tampão salino de Tris
TBS-T	Tampão salino de Tris com Tween 20
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral- $\alpha$
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
VMAT	Transportador vesicular das monoaminas
v/v	Volume por volume

## Resumo

O neuropeptídeo Y (NPY) é o peptídeo mais abundante no sistema nervoso central e periférico, e está também presente na retina. Porém, a função do NPY na retina está ainda por esclarecer. Com esta tese, pretendeu-se aumentar o estado actual do conhecimento sobre as funções que o NPY pode desempenhar na retina.

Neste estudo começou-se por caracterizar a expressão do NPY nas células da retina, tendo-se utilizado diversos modelos experimentais (retina, cultura primária mista de células da retina, cultura primária de células de microglia da retina e linhas celulares de células de Müller e de células endoteliais de rato). Os resultados obtidos revelaram que o NPY está presente na retina de rato e, em particular, em diferentes tipos de células da retina: neurónios, macroglia (células de Müller), microglia e células endoteliais. Além disso, por RT-PCR, demonstrou-se que as culturas mistas de células da retina expressam o ARNm dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$  do NPY. As células endoteliais expressam o ARNm dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_4$ .

Nesta tese, investigou-se, em neurónios da retina de rato em cultura, o papel do NPY nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  e quais os receptores do NPY envolvidos. O NPY (100 nM) inibiu os aumentos da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos por 30 mM de KCl em cerca de 50% dos neurónios analisados. Assim, de acordo com as razões  $\Delta 2/\Delta 1$ , e considerando que nos neurónios do controlo  $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ , os neurónios foram divididos em dois grupos: grupo A - neurónios que não respondem a NPY ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ); grupo B - neurónios que respondem a NPY ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ). Utilizando ferramentas farmacológicas, pretendeu-se identificar os receptores que medeiam o efeito inibitório do NPY nos neurónios da retina. Assim, os agonistas dos receptores  $Y_1/Y_5$  ([Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>34</sup>]NPY; 100 nM),  $Y_4$  (r-PP; 100 nM) e  $Y_5$  (NPY<sub>19-23</sub>(Gly<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Gln<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Ala<sup>31</sup>, Aib<sup>32</sup>, Gln<sup>34</sup>)PP; 100 nM), mas não o agonista do receptor  $Y_2$  (NPY<sub>13-36</sub>; 300 nM), inibiram o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl. Por outro lado, o efeito do NPY nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  foi inibido na presença dos antagonistas dos receptores  $Y_1$  (BIBP3226; 1  $\mu$ M) e  $Y_5$  (L-152,804; 1  $\mu$ M). Deste modo, pode concluir-se que, nos neurónios da retina, o NPY inibe o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por KCl, através da activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ , podendo este efeito ser visto como um possível mecanismo neuroprotector em doenças neurodegenerativas da retina, de que é exemplo o glaucoma.

Avaliou-se, ainda, o papel do NPY na proliferação de células da retina de rato. O NPY (10-1000 nM) estimulou a proliferação celular, através da activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ . O NPY também aumentou o número de células progenitoras em proliferação (células positivas para o 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) e para a nestina; células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>). Com base nestes resultados, investigaram-se os mecanismos intracelulares, associados à activação dos receptores do NPY, envolvidos no aumento da proliferação celular. O efeito estimulatório do NPY na proliferação celular foi reduzido pelo L-NAME (500  $\mu$ M), um inibidor da sintase do monóxido de azoto (NO), pelo ODQ (20  $\mu$ M), um inibidor da isoforma solúvel da guanilil ciclase (sGC), e pelo U0126 (1  $\mu$ M), um inibidor da cinase extracelular induzida por factores mitogénicos (MEK) 1/2. Em conclusão, o NPY estimula a proliferação de células da retina, incluindo células progenitoras, sendo este efeito mediado através das vias do NO-GMPc e da ERK 1/2.

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; "ecstasy") tem efeitos estimulatórios potentes no sistema nervoso central. Apesar de alguns estudos terem demonstrado a presença de quantidades apreciáveis de MDMA no humor vítreo e de poderem ocorrer consequências visuais graves devido do consumo da MDMA, o efeito tóxico da MDMA na retina ainda não está completamente esclarecido. Assim, investigou-se o efeito neurotóxico da MDMA nas células da retina e avaliou-se, também, o potencial efeito protector do NPY contra a toxicidade induzida pela MDMA. Nas culturas primárias mistas da retina, a MDMA induziu a morte em todos os tipos de células presentes na cultura: neurónios, macroglia e microglia. A MDMA induziu necrose (avaliada pela marcação com iodeto de propídio, PI) e apoptose (avaliada pelo aumento da imunoreactividade da caspase-3 activa), de forma dependente da concentração. A toxicidade induzida pela MDMA foi potenciada pelo aumento da temperatura (de 37°C para 40°C). O efeito tóxico da MDMA nas células da retina foi mediado, em parte, pela activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, uma vez que a presença do antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (quetanserina, 1  $\mu$ M) inibiu significativamente esse efeito. Além disso, o NPY também reduziu significativamente a morte celular das células da retina de rato causada pela exposição a MDMA. Assim, os resultados obtidos indicam que a MDMA causa um efeito tóxico não específico nas células da retina em cultura, que é potenciado pela elevação da temperatura, e que envolve a activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>. O NPY exerce um potente efeito protector contra a neurotoxicidade induzida pela MDMA, pelo que o NPY ou análogos do NPY poderão ser

utilizados como agentes protectores contra a degeneração retiniana induzida por drogas de abuso ou em doenças oculares.

Em resumo, o NPY e os seus receptores estão presentes na retina de rato. O NPY é expresso em neurónios, células da macroglia e microglia e também em células endoteliais da retina. Esta distribuição do NPY por diferentes tipos de células na retina sugere que o mesmo poderá desempenhar múltiplas funções fisiológicas. De facto, o NPY modula as alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  e promove a proliferação de células da retina, incluindo células progenitoras. Além disso, o NPY tem efeitos neuroprotectores potentes, que poderão ser aproveitados para desenvolver estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças degenerativas da retina, nomeadamente no tratamento do glaucoma.

## Summary

Neuropeptide Y (NPY) is the most abundant peptide in the central and peripheral nervous systems, and is also present in the retina. However, the function of NPY in the retina has remained unknown. Thus, the present study aimed to investigate the role of NPY in the retina.

Firstly, the characterization of the NPY expression in rat retinal cells was analyzed using several experimental models [(retina, primary culture of retinal neural cells, microglial cell cultures, and rat Müller cell line (TR-MUL) and retina endothelial cell line (TR-iBRB2)] was investigated. The results obtained showed that NPY is present in the rat retina, namely in different retinal cell types: neurons, macroglial (Müller cells), microglial and endothelial cells. Moreover, through RT-PCR, we detected the expression of NPY Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> and Y<sub>5</sub> receptors in the retinal cells in culture, as well as NPY Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> receptors in retinal endothelial cells.

Secondly, both the role of NPY on intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) changes in retinal neurons and the NPY receptors involved in the process were studied. NPY (100 nM) decreased the  $[Ca^{2+}]_i$  amplitudes evoked by 30 mM KCl in nearly 50% of neurons analyzed. Therefore, based on the  $\Delta 2/\Delta 1$  ratios, and taking into account that control neurons  $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0.80$ , neurons were divided into two groups: group A - NPY-non-responsive neurons ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0.80$ ); group B - NPY-responsive neurons ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0.80$ ). Using pharmacological tools, the NPY receptors involved in the inhibitory effect induced by NPY in rat retinal neurons were also identified. The NPY Y<sub>1</sub>/Y<sub>5</sub> ([Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>34</sup>]NPY; 100 nM), Y<sub>4</sub> (r-PP; 100 nM) and Y<sub>5</sub> (NPY<sub>19-23</sub>(Gly<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Gln<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Ala<sup>31</sup>, Aib<sup>32</sup>, Gln<sup>34</sup>)PP; 100 nM) receptor agonists, but not the Y<sub>2</sub> receptor agonist (NPY<sub>13-36</sub>; 300 nM), inhibited the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by elevated KCl. On the other hand, the inhibitory effect of NPY on the  $[Ca^{2+}]_i$  changes was reduced in the presence of the Y<sub>1</sub> (BIBP3226; 1  $\mu$ M) and Y<sub>5</sub> (L-152,804; 1  $\mu$ M) receptor antagonists. In conclusion, NPY inhibits KCl-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  in retinal neurons through the activation of NPY Y<sub>1</sub>, Y<sub>4</sub> and Y<sub>5</sub> receptors, and this effect may be viewed as a potential neuroprotective mechanism of NPY in retinal neurodegenerative diseases, such as glaucoma.

Thirdly, the role of NPY on the proliferation of rat retinal neural cells was evaluated. NPY (10 – 1000 nM) stimulated cell proliferation through the activation of NPY Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> and Y<sub>5</sub> receptors and also increased the proliferation of neuronal progenitor cells (BrdU<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup> cells).

Based on these results, the intracellular mechanisms coupled to NPY receptors activation that mediate the increase in cell proliferation, were also investigated. The stimulatory effect of NPY on cell proliferation was reduced by L-NAME (500  $\mu$ M), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, ODQ (20  $\mu$ M), a soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor or U0126 (1  $\mu$ M), a mitogen-activated protein kinase (MEK) 1/2 inhibitor. In conclusion, NPY stimulates retinal neural cell proliferation, including neuronal precursor cells, and this effect is mediated through NO-cGMP and ERK 1/2 pathways.

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) has potent central nervous system stimulant effects. Although some studies have demonstrated that considerable amounts of MDMA reach the vitreous humor and that serious visual consequences can result from MDMA consumption, the toxic effect of MDMA on the retina is not completely elucidated. Indeed, the neurotoxic effect of MDMA on rat retinal neural cells was evaluated, as well as the potential neuroprotective role of NPY on MDMA-induced toxicity. In primary cultures of rat retinal neural cells, MDMA-induced cell death was evident in all cell types present in the culture: neurons, macroglial and microglial cells. MDMA induced necrosis (propidium iodide assays) and apoptosis (increase of activated caspase-3 immunoreactivity) in retinal neural cells in a concentration-dependent manner. MDMA-induced toxicity was potentiated at higher temperatures (40°C, comparing to 37°C). In retinal cells, the toxic effect of MDMA was mediated, at least in part, by the activation of 5HT<sub>2A</sub> receptors, since the 5HT<sub>2A</sub>-receptor antagonist (ketanserin, 1  $\mu$ M) significantly inhibited that effect. Interestingly, necrotic and apoptotic cell death induced by MDMA was potently inhibited by NPY (100 nM). Therefore, these results suggest that MDMA induces a non-specific toxic effect in retinal neural cells, which is potentiated by elevated temperature and involves the activation of 5-HT<sub>2A</sub>-receptor. Moreover, NPY is a potent neuroprotector against the MDMA-induced toxicity, suggesting that NPY or NPY analogues might be useful agents against retinal degeneration induced by drugs or in eye diseases.

In summary, NPY and NPY receptors are present in rat retina. NPY is expressed in neurons, macroglial and microglial cells, and also in retinal endothelial cells. The NPY distribution by different retinal cell types suggests that this peptide could participate in multiple physiological functions in the retina. In fact, NPY modulates the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes and stimulates the proliferation of retinal cells, including progenitor cells. Furthermore, NPY demonstrates potent neuroprotective effects that might be useful to develop new therapeutic strategies to treat retinal degenerative diseases, such as in glaucoma.







# **Capítulo 1**

## **Introdução geral**



## **1.1 A Retina**

A retina dos vertebrados, tal como outras regiões do sistema nervoso central (SNC), é derivada embriologicamente do tubo neural<sup>(Yang, 2004)</sup>. A retina apresenta uma complexidade típica e a sua estrutura apresenta uma ordenação e estratificação celular únicas.

### **1.1.1 Anatomia da retina**

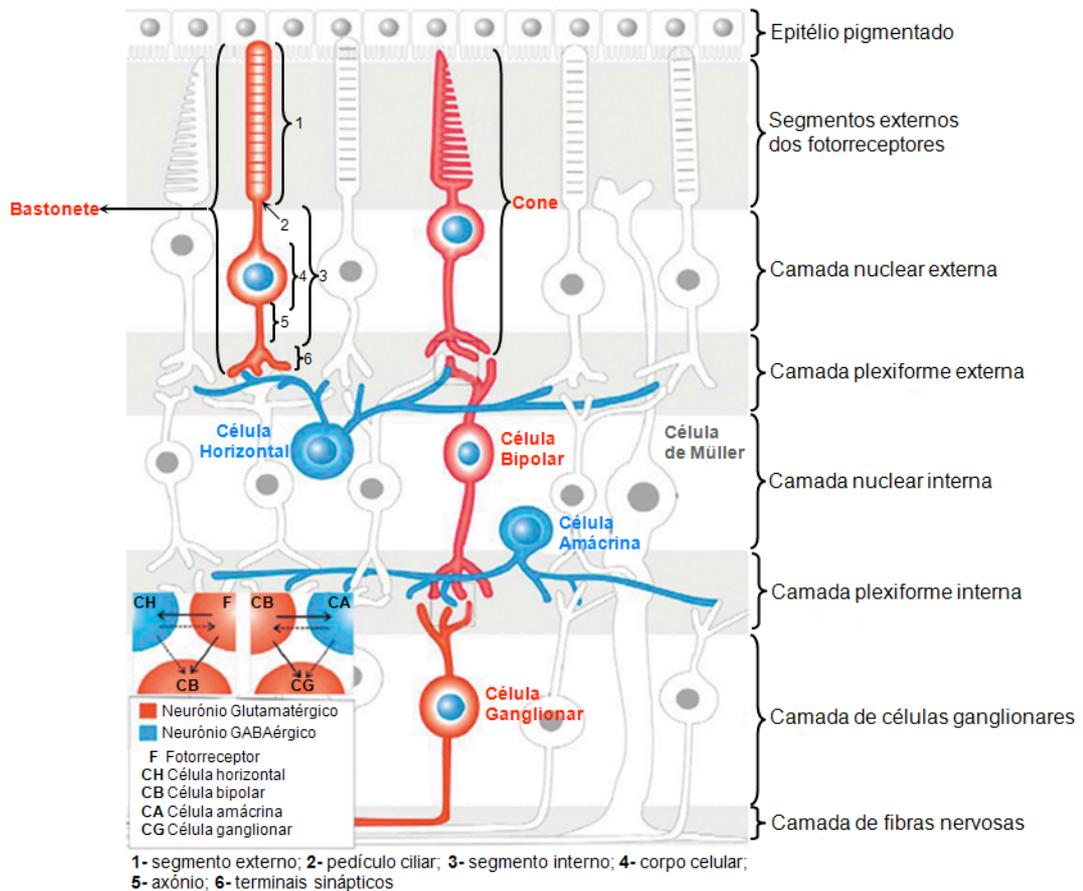
A retina é um tecido sensorial que, no homem, tem uma espessura aproximada de 0,5 mm<sup>(Gray, 1999)</sup>, e que se localiza na parte posterior do olho, sendo constituída por diferentes tipos de células que se organizam em várias camadas. As células que constituem a retina dos vertebrados podem ser agrupadas em três grupos principais: células epiteliais, neurónios e células da glia. As células constituintes da retina estão indicadas na tabela 1.1.

**Tabela 1.1** – Células constituintes da retina dos vertebrados

<b>Células da retina</b>	
Células epiteliais	Epitélio pigmentado
Neurónios	Fotorreceptores
	Células bipolares
	Células horizontais
	Células amácrinas
	Células ganglionares
Células da Glia	Células de Müller
	Astrócitos
	Células da microglia

A camada mais externa da retina é constituída pelo epitélio pigmentado, adjacente à coróide. As células do epitélio pigmentado variam em tamanho e forma, consoante a sua localização. Na zona central da retina, adoptam uma forma cúbica e, na zona periférica da retina, apresentam uma forma mais alongada. Estas células têm como principais funções manter a adesão da retina neurosensorial, fagocitar os segmentos externos dos fotorreceptores, de modo a haver regeneração dos pigmentos visuais, absorver a luz que não é absorvida pelos fotorreceptores, para impedir que haja reflexão da luz, tendo também funções de transporte e armazenamento de metabolitos e vitaminas, em especial da vitamina A. O epitélio constitui, ainda, uma importante barreira entre a retina e o sistema

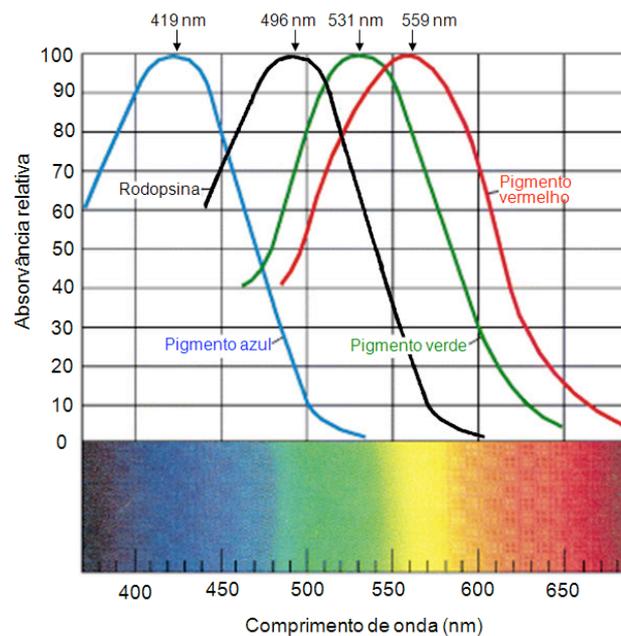
vascular da coróide, devido à existência de junções oclusivas entre as células epiteliais. Esta barreira designa-se barreira hemato-retiniana externa.



**Figura 1.1 - Desenho esquemático representativo da organização da retina de vertebrados.**

Os sinais gerados nos fotorreceptores (bastonetes e cones) são transmitidos através das células bipolares até às células ganglionares que, por sua vez, enviam os sinais fóticos da retina para os centros visuais, através do nervo óptico, sendo este constituído pelos axónios das células ganglionares. A via de transmissão de informação directa ou vertical é modulada pelas células horizontais na camada plexiforme externa e pelas células amácrinas na camada plexiforme interna. O glutamato e o GABA são os mais importantes neurotransmissores excitatório e inibitório na retina, respectivamente. Os neurónios glutamatérgicos (fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares) estão identificados a vermelho, enquanto que os neurónios GABAérgicos (células horizontais e células amácrinas) estão identificados a azul. Na camada plexiforme externa, as células horizontais recebem sinal dos fotorreceptores podendo, de seguida, fornecer um sinal negativo aos fotorreceptores. As células bipolares recebem sinal de ambos os fotorreceptores e das células horizontais. Na camada plexiforme interna, as células bipolares e amácrinas comunicam entre si, através de sinapses recíprocas, e ambas as células enviam sinais para as células ganglionares. As células de Müller são as principais células da glia e atravessam todas as camadas da retina. As células da microglia não estão representadas (adaptado de Yang et al., 2004<sup>(Yang, 2004)</sup>).

Os fotorreceptores apresentam seis porções subcelulares: o segmento externo, o pedículo ciliar, o segmento interno, que engloba o corpo celular e o axônio, e os terminais sinápticos. O segmento externo é constituído por camadas de discos derivados da membrana celular, impregnados de fotopigmentos responsáveis pela fototransdução. O pedículo ciliar consiste num estrangulamento da membrana que separa o segmento externo do segmento interno. Nos mamíferos, existem dois tipos de fotorreceptores, os bastonetes e os cones, que se distinguem pela forma do segmento externo e dos terminais sinápticos. Para além das diferenças anatómicas, os bastonetes e os cones diferem ainda nos fotopigmentos. Os bastonetes contêm rodopsina e os cones contêm diferentes opsinas. Os cones podem ainda subdividir-se em três tipos, consoante o comprimento de onda dos fótons absorvidos maximamente pelo pigmento. Os cones sensíveis a frequências mais elevadas, também designados por cones azuis, absorvem maximamente a 419 nm, os cones sensíveis a frequências médias, ou cones verdes, absorvem maximamente a 531 nm, e os cones sensíveis a frequências menos elevadas, ou cones vermelhos, absorvem maximamente a 559 nm (Figura 1.2).



**Figura 1.2 - Espectro de absorção dos quatro fotopigmentos na retina humana.**

A absorvância relativa é definida como o logaritmo da razão entre a intensidade de luz incidente e a intensidade de luz transmitida. Cada cone expressa apenas uma das três opsinas presentes nos cones. O espectro foi obtido por medição da luz absorvida por cada cone num microespectrofotómetro (adaptado de Nathans, J., 1989<sup>(Nathans, 1989)</sup>).

Os bastonetes são mais sensíveis à luz e também são sensíveis a uma gama maior de comprimentos de onda de luz visível. Por este motivo, são as principais células responsáveis pela visão nocturna. No entanto, como não distinguem luz de diferentes comprimentos de onda, não permitem a detecção de cor. Esta detecção de cor é feita pelos cones, uma vez que os diferentes tipos de cones são sensíveis a gamas mais estreitas de comprimento de onda<sup>(Purves et al., 2004)</sup>.

A camada nuclear interna contém os corpos celulares das células bipolares, das células horizontais e das células amácrinas e a camada de células ganglionares contém os corpos celulares das células ganglionares e de células amácrinas deslocadas (Figura 1.1).

As células bipolares são neurónios orientados radialmente, em que uma ou mais dendrites fazem sinapse com fotorreceptores ou células horizontais, e os terminais nervosos fazem sinapse com células ganglionares ou células amácrinas.

As células horizontais são, na sua maioria, neurónios inibitórios, cujas dendrites e axónios se distribuem na camada plexiforme externa, estabelecendo ligações com fotorreceptores e células bipolares<sup>(Purves et al., 2004)</sup>.

As células amácrinas são interneurónios que estabelecem ligações com as células bipolares ou com as células ganglionares. Existe uma grande diversidade de células amácrinas, podendo ser classificadas de acordo com o tamanho da árvore dendrítica, a localização na camada plexiforme interna e o neurotransmissor que segregam. A nível funcional, estas células são importantes na detecção de movimento e de diferenças de luminosidade<sup>(Purves et al., 2004)</sup>.

A dividir as camadas de corpos celulares, encontram-se duas camadas intermediárias onde ocorrem as sinapses: as camadas plexiformes externa e interna (Figura 1.1). Na camada plexiforme externa, ocorrem as sinapses entre os fotorreceptores e as células horizontais e bipolares, enquanto que, na camada plexiforme interna, as células amácrinas e bipolares transmitem a informação às células ganglionares (Figura 1.1). Por último, os axónios das células ganglionares reúnem-se para formar a camada de fibras nervosas, culminando na formação do nervo óptico que conduz a informação dos neurónios da retina até ao córtex visual no cérebro (Figura 1.1).

As células ganglionares dividem-se em dois grupos, células P e células M, que se projectam nas camadas parvocelulares e magnocelulares do corpo geniculado lateral, respectivamente<sup>(Gray, 1999)</sup>.

As células de Müller (Figura 1.1) dispõem-se ao longo de praticamente toda a espessura da retina, formando as membranas limitantes externa e interna. Estas células

são as principais células da glia presentes na retina e têm várias funções importantes, nomeadamente controlar a homeostase da retina, fornecendo metabolitos aos neurónios (principalmente provenientes da degradação de glicogénio), removendo metabolitos celulares, tais como dióxido de carbono e amónia, e controlando concentrações iónicas do meio extracelular<sup>(Gray, 1999)</sup>. As células de Müller também protegem os neurónios da exposição a concentrações elevadas de neurotransmissores, em especial do glutamato<sup>(Garcia and Vecino, 2003)</sup>. Adicionalmente, as células de Müller podem fagocitar detritos celulares e segregar neurotransmissores e factores tróficos, tais como GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), taurina, dopamina, BDNF (“**Brain-Derived Neurotrophic Factor**” – Factor neurotrófico derivado do cérebro) e GDNF (“**Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor**” – Factor neurotrófico derivado da linha celular de glia)<sup>(Reis et al., 2007)</sup>.

As células da microglia estão distribuídas ubiquamente, podendo ser encontradas em todas as camadas da retina. Quando ocorre um trauma ou processos inflamatórios na retina, as células da microglia podem ser estimuladas adquirindo capacidade de fagocitar neurónios em degeneração<sup>(Forrester et al., 2002)</sup>.

### **1.1.2 Vias de transmissão de sinal na retina**

Os fotorreceptores dos vertebrados podem responder à luz, devido à presença de pigmentos visuais existentes nos discos membranares lipofílicos que compõem os segmentos externos. O pigmento visual consiste no conjunto de uma proteína designada opsina e de um cromóforo derivado da vitamina A, designado retinol<sup>(Oyster, 1999)</sup>.

A absorção de luz pelos fotorreceptores inicia a cascata de fototransdução. A via vertical, ou directa, de transmissão de sinal engloba fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares e resulta da formação de sinapses entre fotorreceptores e células bipolares (neurónios de segunda ordem) e entre estas e células ganglionares (neurónios de terceira ordem) (Figura 1.1). Apesar de também se estabelecerem extensas ligações eléctricas entre os neurónios da retina através de junções em hiato, a transmissão química mediada por neurotransmissores predomina no circuito neuronal da retina<sup>(Miyachi et al., 1999)</sup>. O principal neurotransmissor utilizado na via directa ou vertical é o glutamato. A libertação de glutamato pelos fotorreceptores e pelas células bipolares promove e/ou altera a actividade dos neurónios pós-sinápticos (células horizontais e bipolares para os fotorreceptores na retina externa; células amácrinas e ganglionares para as células bipolares na retina interna), por alteração directa da permeabilidade membranares aos iões ou por activação de

sistemas intracelulares, através dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato<sup>(Yang, 2004)</sup>.

Existem também vias laterais, ou indirectas, em dois níveis da retina. Uma destas vias laterais é mediada pelas células horizontais, que estabelecem sinapses entre fotorreceptores vizinhos, e também com as células bipolares. Desta forma, o sinal recebido pelas células bipolares na via vertical resulta não só da transmissão directa dos fotorreceptores, mas também da informação transmitida pelos fotorreceptores vizinhos, através das células horizontais. Outra via lateral é mediada pelas células amácrinas. Estas células recebem informação de células bipolares, de outras células amácrinas e de células ganglionares, e podem transmitir informação a células bipolares, amácrinas e ganglionares. Nesta via, o GABA é utilizado por diversas células horizontais e amácrinas, modulando a transmissão sináptica em ambas as camadas plexiformes<sup>(Yang, 2004)</sup>.

A retina contém uma grande variedade de neurotransmissores (acetilcolina, dopamina, glicina, serotonina e purinas (ATP e adenosina, embora com predominância do glutamato e do GABA).

### 1.1.3 Principais neurotransmissores na retina

#### 1.1.3.1 Glutamato

O glutamato, tal como referido anteriormente, é o principal neurotransmissor na via vertical da retina. Estudos de imunohistoquímica demonstraram que o glutamato é detectável na retina de rato durante o desenvolvimento e o nascimento<sup>(Martins and Pearson, 2007)</sup>. O conteúdo total de glutamato na retina aumenta durante o período pós-natal, em sincronização com a maturação das células glutamatérgicas<sup>(Vecino et al., 2004)</sup>.

Os receptores do glutamato agrupam-se em duas classes: os receptores ionotrópicos, incluindo-se neste grupo os receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-isoxazol-4-propionato), KA (cainato) e N-metil-D-aspartato (NMDA), e os receptores metabotrópicos (mGluRs), que se subdividem em 3 grupos distintos: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4 e mGluR6-8)<sup>(Conn and Pin, 1997; Ozawa et al., 1998; Yang, 2004)</sup>. Os receptores AMPA e KA caracterizam-se pela permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  e ao  $\text{K}^+$ , mas não ao  $\text{Ca}^{2+}$ , na maioria das situações. A activação destes receptores permite a entrada de  $\text{Na}^+$  nas células, provocando a despolarização da membrana. Os receptores NMDA, apesar de serem também permeáveis ao  $\text{Na}^+$ , caracterizam-se pela sua

permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A distribuição dos receptores do glutamato está resumida na tabela 1.2.

**Tabela 1.2** - Localização de receptores do glutamato nos neurónios da retina

Tipos de células	Receptores do glutamato					
	Ionotrópicos			Metabotrópicos		
	AMPA	KA	NMDA	GI	GII	GIII
Fotorreceptores	?	?	?	n.d	+	+
Células horizontais	+	-	-	+	n.d.	?
Células bipolares	+	+/?	-/?	+	?	+
Células amácrinas	+	+	+	+	+	+
Células ganglionares	+	?	+	+	n.d.	?

Nota: (+) Forte expressão; (-) Ausência de expressão; (?) Resultados inconclusivos (n.d.) Resultados não determinados; (GI) grupo I; (GII) grupo II; (GIII) grupo III (adaptado de Yang et al., 2004<sup>(Yang, 2004)</sup>)

Os receptores do glutamato estão envolvidos na transmissão sináptica, mas a activação excessiva de receptores ionotrópicos do glutamato induz neurotoxicidade, processo que se designa por excitotoxicidade, que poderá estar envolvida na génese de diversas doenças do SNC<sup>(Choi, 1988; Choi and Rothman, 1990; Meldrum and Garthwaite, 1990)</sup>.

Existem algumas evidências que sugerem que a excitotoxicidade também constitui um factor importante na morte celular em determinadas doenças da retina, como, por exemplo, na isquémia retiniana e no glaucoma<sup>(Ullian et al., 2004)</sup>. A excitotoxicidade causada pelo NMDA tem sido proposta como mediadora da morte celular das células ganglionares da retina<sup>(Ullian et al., 2004; Inomata et al., 2006; Xin et al., 2006)</sup>. No entanto, existem outros estudos que contrariam estas evidências, sugerindo que as células ganglionares são insensíveis à excitotoxicidade induzida pelo glutamato e NMDA, mas apenas as células amácrinas são sensíveis à excitotoxicidade<sup>(Luo et al., 2004; Ullian et al., 2004)</sup>. A morte de células amácrinas causada pelo glutamato foi demonstrada na retina de murganho<sup>(Olney, 1969)</sup>, de coelho<sup>(Osborne and Herrera, 1994; Osborne et al., 1994; Osborne et al., 1995; Osborne et al., 1996)</sup> e de rato<sup>(Lombardi et al., 1994)</sup>.

### **1.1.3.2 GABA**

O GABA é sintetizado a partir do glutamato pela acção da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Na retina adulta, o GABA é produzido e libertado pelas células horizontais e amácrinas que expressam a GAD. A presença deste neurotransmissor na retina tem sido detectada durante a fase embrionária da retina de pinto, nas camadas nuclear interna e de células ganglionares (ver revisão(Xu and Tian, 2004; Martins and Pearson, 2007)). Um estudo alternativo de síntese de GABA demonstra que o GABA está presente durante a fase inicial do desenvolvimento, mesmo antes da expressão de GAD nas células horizontais e amácrinas(Yamasaki et al., 1999)ver revisão(Xu and Tian, 2004; Martins and Pearson, 2007). Os neurónios GABAérgicos incluem as células bipolares e amácrinas. Os receptores de GABA são divididos em dois tipos distintos: os receptores ionotrópicos, incluindo-se neste grupo os receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>, e os receptores metabotrópicos, onde se incluem os receptores GABA<sub>B</sub>. A activação dos receptores GABA<sub>A</sub> conduz à hiperpolarização da membrana, em consequência do influxo do ião cloreto (Cl<sup>-</sup>) através dos receptores, enquanto que a activação dos receptores GABA<sub>B</sub> leva a uma inibição da síntese de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A activação deste receptor inibe a actividade de canais de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>. Os receptores GABA<sub>C</sub> distinguem-se farmacologica e estruturalmente dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, embora sejam também canais iónicos, sendo, portanto, receptores tipicamente ionotrópicos, tendo sido detectados predominantemente na retina de vertebrados(Yang, 2004).

Esta vasta distribuição dos receptores GABA confirma a extrema importância do GABA na retina, uma vez que este é o principal neurotransmissor inibitório. A tabela 1.3 resume, sem distinguir diferenças significativas entre espécies, a localização dos diferentes tipos de receptores de GABA, nos neurónios e nas células de Müller da retina(Zhang and Yang, 1999; Biedermann et al., 2004; Yang, 2004).

**Tabela 1.3** – Localização de receptores de GABA nas células da retina

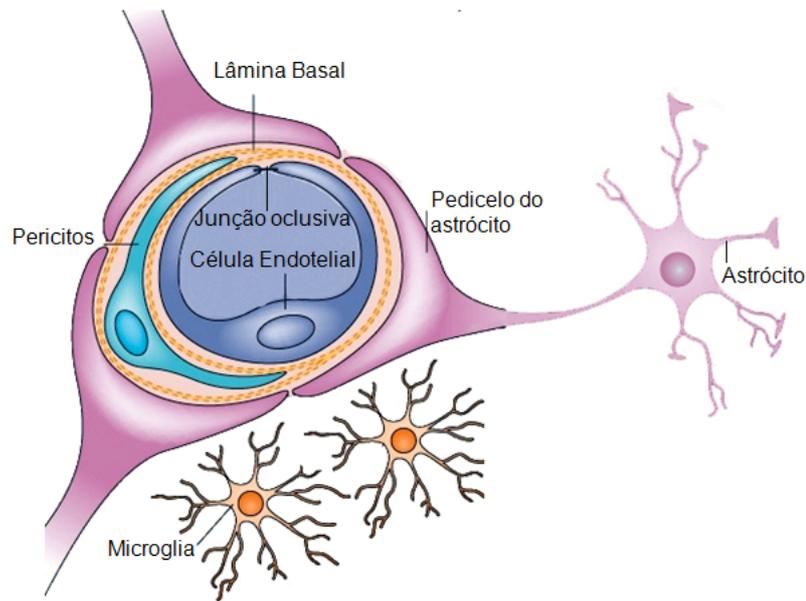
Tipo de células	Receptores de GABA		
	Ionotrópicos		Metabotrópicos
	GABA <sub>A</sub>	GABA <sub>C</sub>	GABA <sub>B</sub>
Fotorreceptores	+	+	+
Células horizontais	+	+	-
Células bipolares	+	+	?
Células amácrinas	+	?	+
Células ganglionares	+	?	+
Células de Müller	+	?	+

Nota: (+) Forte expressão; (-) Ausência de expressão; (?) Resultados inconclusivos (adaptado de Yang et al., 2004<sup>(Yang, 2004)</sup>)

#### 1.1.4 Rede vascular da retina

A retina é o tecido com maior consumo de oxigénio por unidade de peso, no organismo. Para suportar esta exigência metabólica, o oxigénio é fornecido através do sistema vascular da retina e, também, pela circulação da coróide. Os fotorreceptores são irrigados pela circulação da coróide, que é exterior à retina, e as camadas mais internas da retina são irrigadas pela circulação retiniana. Estes dois sistemas vasculares têm características fisiológicas bastante diferentes. A circulação da coróide tem um fluxo sanguíneo elevado e taxa de circulação variável, enquanto que a circulação retiniana tem um fluxo sanguíneo baixo e taxa de circulação aproximadamente constante<sup>(Forrester et al., 2002)</sup>.

Os vasos retinianos formam a barreira hemato-retiniana interna. Os capilares da retina são formados por uma camada de células endoteliais, que estão envolvidas pela lâmina basal, na qual estão inseridos os pericitos (Figura 1.3.).



**Figura 1.3 – Estrutura de um capilar retiniano e suas interações com diferentes tipos de células.**

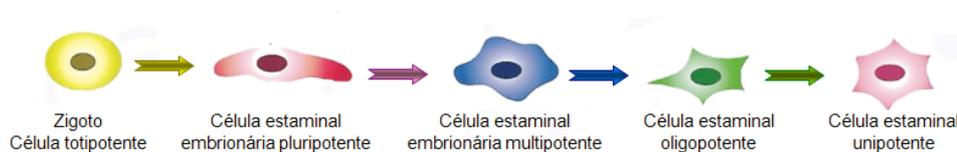
Esquema representativo de uma secção transversal de um capilar retiniano. As células endoteliais são revestidas pela lâmina basal, onde estão inseridos os pericitos, e pelos pedicelos (terminais perivascular) dos astrócitos. No esquema é ainda possível observar a presença das células da microglia (adaptado de Abbott et al., 2006)<sup>(Abbott et al., 2006)</sup>.

As células endoteliais dos capilares retinianos formam junções oclusivas entre si, que funcionam como barreira à livre passagem de substâncias, permitindo apenas a passagem selectiva de algumas substâncias por transporte paracelular. Os pericitos são células alongadas que rodeiam, parcialmente, as células endoteliais (Figura 1.3). Os pericitos são células contrácteis que regulam o calibre dos capilares e, dessa forma, o fluxo sanguíneo na retina. Os pericitos têm também um papel importante na manutenção da homeostase microvascular. De facto, a morte ou disfunção de pericitos tem sido considerado um importante factor na patogénese de doenças como a retinopatia diabética, aterosclerose e angiogénese tumoral<sup>(Yamagishi and Imaizumi, 2005)</sup>. A membrana basal é uma estrutura fibrilar constituída por fibras de colagénio e tem como principal função o suporte estrutural do endotélio (Figura 1.3). Os capilares estão ainda envolvidos pelos pedicelos dos astrócitos e pelas células de Müller. O sistema vascular da coróide é constituído por capilares com muitas fenestrações, apresentando-se como uma rede vascular perfurada, tornando-os, assim, muito permeáveis<sup>(Forrester et al., 2002)</sup>.

### 1.1.5 Neurogênese na retina

A neurogênese consiste na formação de novos neurónios, a partir de células estaminais. Em termos gerais, as células estaminais podem definir-se como células indiferenciadas de um tecido específico, que apresentam a potencialidade de originar todo o tipo de células diferenciadas associadas a um determinado tecido, e que são capazes de se auto-renovar, ou seja, estas células têm a propriedade de gerar um vasto número de células idênticas ao progenitor multipotente, através de clonagem amplificadora<sup>(Ahmad, 2001)</sup>. Existem, ainda, outras propriedades atribuídas às células estaminais, tais como divisão assimétrica, proliferação mitótica quiescente e capacidade de regeneração, características estas que são partilhadas por muitas, mas não por todas as células estaminais. Deste modo, as células progenitoras neuronais com capacidade de auto-renovação e com potencialidade de originar os vários tipos de células do tecido nervoso, os neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, poderão ser consideradas como células estaminais<sup>(Wagers and Weissman, 2004)</sup>.

As células estaminais classificam-se de acordo com a potência que uma célula progenitora pode apresentar, relativamente ao tipo de células que é capaz de originar. As células mais primitivas são consideradas *totipotentes* – capazes de formar um organismo ou um tecido inteiro; as células dos embriões na fase de oito células (mórula) são totipotentes. As células estaminais poderão ainda ser *pluripotentes* ou *multipotentes* (capazes de originar muitos tipos de células, mas não todos), *oligopotentes* (originam poucos tipos de células), ou *unipotentes* (originam um de tipo celular) (Figura 1.4)<sup>(Temple, 2005)</sup>.



**Figura 1.4 – Tipos de células estaminais.**

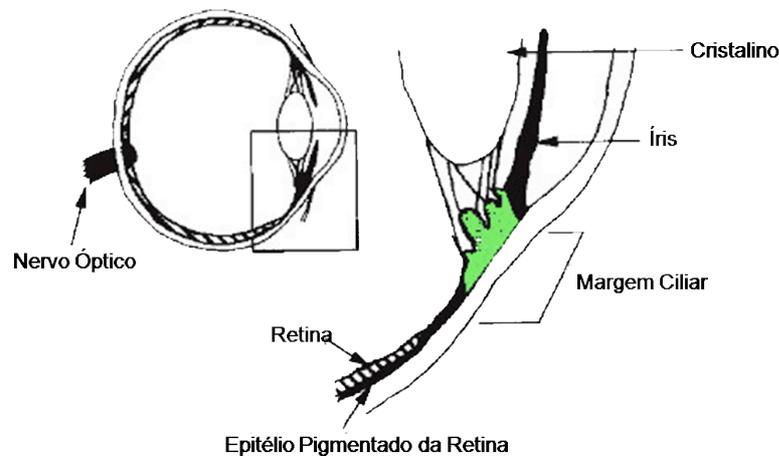
As células estaminais são classificadas segundo o seu potencial em termos de diferenciação como totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. As células totipotentes definem-se como sendo células capazes de originar todo o tipo de células encontradas num determinado organismo; as células estaminais pluripotentes caracterizam-se pela capacidade de se diferenciarem em mais do que um tipo de células, mas não em todos; as células estaminais multipotentes, tal como as células pluripotentes, apresentam a propriedade de originar todo o tipo de células de um embrião, mas não as membranas extra-embriónicas; as células estaminais oligopotentes têm a capacidade para originar um grupo de células mais especializado; as células unipotentes apenas apresentam capacidade para originar um único tipo de células diferenciadas (adaptado de Wagers et al., 2004<sup>(Wagers and Weissman, 2004)</sup>).

Deste modo, as células estaminais apresentam capacidade de originar tecidos, como o tecido nervoso, mas ainda é necessário definir as condições que possibilitem a reparação do sistema nervoso. De facto, a aquisição de características de diferenciação de tecidos lesados e o aumento da plasticidade das células estaminais poderão contribuir para o benefício terapêutico no combate a doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, a esclerose múltipla ou o glaucoma<sup>(Ahmad, 2001; Temple, 2001)</sup>.

### **1.1.5.1 Células estaminais no olho**

O desenvolvimento do olho dos vertebrados está intrinsecamente relacionado com a formação do SNC<sup>(Chow and Lang, 2001)</sup>. O neuroepitélio que delimita as paredes das vesículas ópticas é regionalizado em áreas discretas, sob a influência de determinados genes, originando o epitélio pigmentado da retina, a retina, o epitélio ciliar e o epitélio da íris (Figura 1.5). Estes genes codificam as famílias de factores de transcrição Otx, Pax, Six, Rx e Emx, fornecendo características específicas às células estaminais no desenvolvimento da vesícula óptica e dos seus derivados<sup>(Ashery-Padan and Gruss, 2001; Chuang and Raymond, 2002)</sup>.

Estudos realizados em peixes, anfíbios, aves e em roedores demonstraram que a neurogénese da retina não cessa após o estágio embrionário mas, pelo contrário, continua a ocorrer ao longo da vida dos animais. Na verdade, a retina continua a crescer, sendo as novas células continuamente adicionadas à margem ciliar (CMZ – "*ciliary marginal zone*") do olho de forma concêntrica (Figura 1.5)<sup>(Straznicky and Gaze, 1971; Johns, 1977; Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000; Reh and Fischer, 2001)</sup>.



**Figura 1.5 – Representação de uma secção sagital da região da margem ciliar do olho de murganho adulto.**

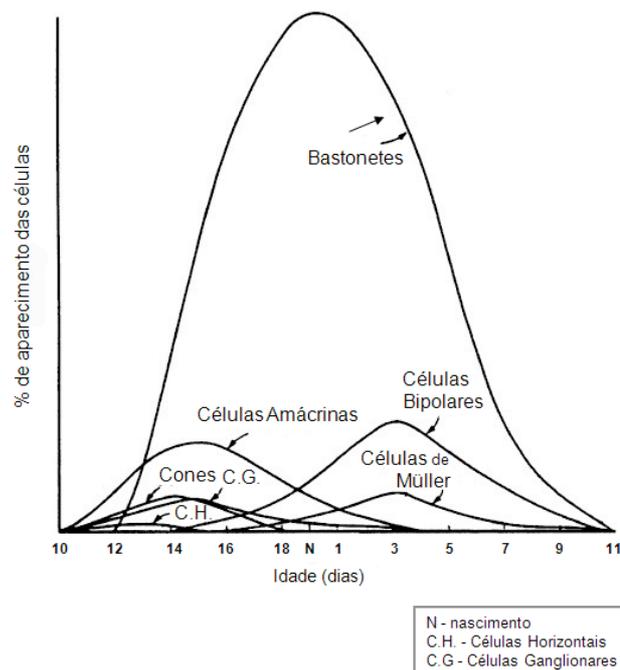
A área delimitada pela caixa do lado esquerdo foi ampliada no esquema à direita. A zona da margem ciliar é constituída por células pigmentadas que se situam sobre o músculo ciliar liso (verde), que está adjacente ao cristalino. Apenas as células pigmentadas provenientes da margem ciliar, e não as células do epitélio pigmentado, proliferam de forma a originar colónias esféricas de células estaminais (adaptado de Tropepe et al., 2000<sup>(Tropepe et al., 2000)</sup>).

#### 1.1.5.2 Células estaminais/progenitoras da retina

Alguns estudos *in vivo* têm demonstrado que as células progenitoras da retina são multipotentes e possuem a capacidade de originar todos os tipos celulares neuronais da retina, incluindo as células de Müller<sup>(Cepko et al., 1996)</sup>. As evidências de que as células progenitoras da retina respondem a mitogénicos, tal como o EGF (“*Epidermic Growth Factor*” - Factor de Crescimento Epidérmico) e o FGF2 (“*Fibroblast Growth Factor 2*” - Factor de Crescimento dos Fibroblastos 2), permitiram isolar e caracterizar as células progenitoras da retina, na forma de neuroesferas. As neuroesferas, geradas a partir de células da retina embrionária na presença de EGF/FGF2, são constituídas predominantemente por células em proliferação que expressam o marcador de células progenitoras, a nestina. Quando os mitogénicos são removidos e o meio é suplementado com 1% de albumina bovina sérica, as células da neuroesfera diminuem a sua expressão de nestina e diferenciam-se em neurónios e células da glia<sup>(Bhattacharya et al., 2003)</sup>. Porém, apesar da evidente multipotência característica das células progenitoras da retina, ainda é controverso se estas células poderão ser definidas como células estaminais, devido ao

insucesso na tentativa de clonagem em série, ou seja, não apresentam a capacidade de auto-renovação. Contudo, existem estudos *in vitro* que sugerem que estas células podem ser efectivamente células estaminais, mas ainda não foram identificadas as condições que promovem a sua auto-renovação *in vitro* (Ahmad et al., 2004).

As células da retina são geradas em sequência, ou seja, os diferentes tipos de neurónios surgem numa ordem temporal precisa que é característica de cada espécie (Temple, 2001). A ordem pela qual surgem os diferentes tipos de células é definida pelo dia em que estas entram na fase S (fase de síntese). O dia em que células sofrem a sua última fase S permite uma previsão acerca do tipo de célula que se irá formar. A razão pela qual este evento acontece ainda não está determinada; porém, é uma característica comum no desenvolvimento do SNC (Cepko et al., 1996). Na retina, esta informação temporal está bem definida e sabe-se a ordem exacta do aparecimento de cada tipo celular da retina. Assim, como se pode observar na Figura 1.6, as células ganglionares são as primeiras a aparecer, durante o processo de desenvolvimento da retina, embora os cones e as células horizontais e amácrinas também possam surgir na mesma altura (Cepko et al., 1996). Assim, de acordo com o aparecimento das células retinianas, a histogénese inicial da retina caracteriza-se pelo aparecimento das células ganglionares, cones e células horizontais e amácrinas, enquanto que a fase tardia da histogénese se define pelo surgimento dos bastonetes, células bipolares e células de Müller e ainda de algumas células amácrinas (Figura 1.6). Deste modo, tal como no SNC, nas fases mais precoces, as células progenitoras geram preferencialmente neurónios e, nas fases tardias da histogénese, as células progenitoras originam preferencialmente células da glia, ou seja, a capacidade neurogénica diminui com as fases mais tardias do desenvolvimento. Estas alterações na determinação dos diferentes tipos celulares reflecte a utilização diferencial da sinalização de diferentes genes pelas células progenitoras iniciais e tardias, como é o caso da sinalização do Notch (Ahmad et al., 2004). Durante a fase inicial do desenvolvimento, a sinalização do Notch funciona no sentido de manter a população de células progenitoras, enquanto que, na fase mais tardia do desenvolvimento, quando a neurogénese é menor, o sinal intracelular do Notch é recrutado para promover a gliogénese (Furukawa et al., 2000; Vetter and Moore, 2001).



**Figura 1.6 – Origem sequencial das células da retina de murganho.**

O aparecimento sequencial das células foi determinado através da incorporação de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ timidina) durante o desenvolvimento da retina de murganho. As células que estavam em fase S durante a adição de  $[^3\text{H}]$ timidina incorporaram o composto. As células que continuaram a dividir-se apresentam uma marcação pouco intensa, enquanto que as células que se encontram na última fase S retêm um nível de marcação mais intenso. O dia de aparecimento (N) de cada tipo celular é determinado através da análise das células da retina cuja marcação para  $[^3\text{H}]$ timidina é mais intensa o que indica que se encontram na sua última fase S. A percentagem de células que surge num determinado dia para cada tipo de célula é representado nas ordenadas (adaptado de Cepko et al., 1996)<sup>(Cepko et al., 1996)</sup>.

### 1.1.5.3 Epitélio ciliar adulto como fonte de células progenitoras neuronais

Vários estudos têm demonstrado que a retina de mamíferos adultos tem capacidade de autoregeneração<sup>(Wallace, 2007)</sup>. De facto, foi demonstrada a existência de células progenitoras neuronais na zona marginal da córnea, na conjuntiva e no epitélio ciliar do olho de mamíferos adultos<sup>(Kenyon and Tseng, 1989; Pellegrini et al., 1999; Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000; Dogru and Tsubota, 2005; Klassen et al., 2007)</sup>. A hipótese de que as células progenitoras neuronais estão presentes no epitélio ciliar adulto de mamíferos foi baseada no facto de existirem células progenitoras neuronais numa região análoga à zona da margem ciliar (CMZ; Figura 1.5) em peixes, rãs adultas, pinto e no homem<sup>(Straznicky and Gaze, 1971; Johns, 1977; Fischer and Reh, 2000; Perron and Harris, 2000; Mayer et al., 2003; Mayer et al., 2005)</sup>. Estudos *in vitro*, através da análise de incorporação de BrdU,

também revelaram a existência de células progenitoras neuronais no epitélio ciliar de ratos adultos<sup>(Ahmad et al., 2000)</sup>. Assim, quando estas células são cultivadas na presença de EGF e/ou FGF2 proliferam, dando origem a neuroesferas que contêm células positivas para a nestina, tal como sucede nas células progenitoras embrionárias. As células presentes no epitélio ciliar adulto são multipotentes e podem diferenciar-se em ambas as linhagens, neuronais ou glias. Ao contrário das células progenitoras da retina embrionária, as células do epitélio ciliar adulto têm a capacidade de auto-renovação, formando neuroesferas. Assim, fica preenchido o requisito básico para a definição de células estaminais. As células do epitélio ciliar adulto expressam os marcadores das células progenitoras da retina, Chx10, Rx e Pax6, podendo mesmo diferenciar-se em neurónios da retina quando expostas a ambientes adequados<sup>(Ahmad et al., 2000; Engelhardt et al., 2004)</sup>. A capacidade de auto-renovação destas células, a sua plasticidade e o seu potencial para poderem expressar fenótipos da retina sugerem a possibilidade de elas poderem representar uma população residual de células estaminais da retina.

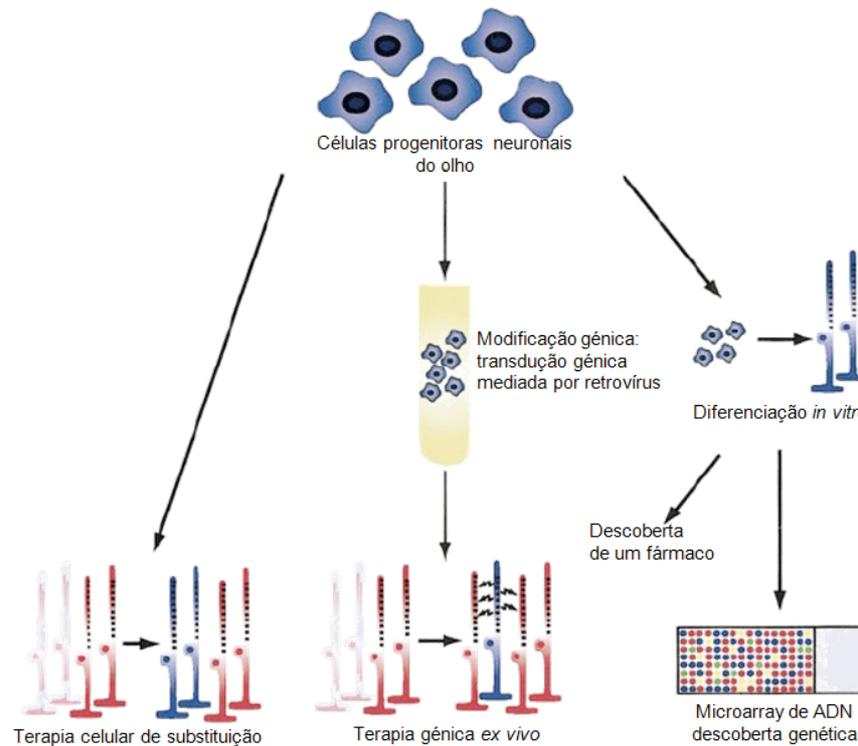
#### **1.1.5.4 Células de Müller como células estaminais da retina**

Diversos estudos têm sugerido que as células da glia, ou células que expressam características glias, possuem potencial de diferenciação em neurónios<sup>(Goldman, 2003)</sup>. Outros estudos demonstraram que astrócitos localizados na zona subventricular do cérebro humano e de roedores apresentam potencial neurogénico<sup>(Doetsch et al., 1999; Sanai et al., 2004)</sup>. Além disso, verificou-se que a maioria dos neurónios do SNC são gerados a partir de progenitores que expressam GFAP (“*Glial fibrillary acidic protein*” - proteína acídica fibrilar da glia)<sup>(Zhuo et al., 2001)</sup>. Neste contexto, na retina, as células de Müller poderão também ser consideradas precursores neuronais na retina. Este facto foi demonstrado num estudo de regeneração dos fotorreceptores, após lesão induzida por laser, no peixe dourado<sup>(Braisted et al., 1994)</sup>. Neste estudo, foi demonstrado que as células de Müller proliferam em resposta à lesão, migram para o espaço anteriormente ocupado pelos fotorreceptores danificados, surgindo, assim, a possibilidade de desdiferenciação das células de Müller em fotorreceptores, de modo a substituir os fotorreceptores que degeneraram. As células de Müller adultas, quando expostas a mitogénicos, proliferam e originam neuroesferas com capacidade de auto-renovação e multipotência, gerando neurónios e glias<sup>(Hicks and Courtois, 1990; Monnin et al., 2007)</sup>. Demonstrou-se ainda que as células de Müller na retina de pinto<sup>(Reh and Fischer, 2001)</sup> e de murganho<sup>(Dyer and Cepko, 2000)</sup> também proliferam em resposta a uma lesão, indicando a

existência de uma fonte de neurogênese regenerativa. Assim, tendo em conta estas evidências, as células de Müller, em resposta a um insulto tóxico, possuem a capacidade de substituir tipos celulares específicos previamente danificados<sup>(Fischer and Reh, 2001)</sup>. Desta forma, estas observações sugerem que as células de Müller, sob determinadas condições, podem adquirir propriedades e potencial de células estaminais neuronais e, assim, poderão ser utilizadas em estratégias de regeneração terapêutica nas doenças retinianas<sup>(Monnin et al., 2007)</sup>.

#### **1.1.5.5 Regeneração e terapia celular em doenças oculares**

A identificação e caracterização de células progenitoras neuronais poderá abrir novas perspectivas no tratamento de patologias da retina caracterizadas pela degeneração neuronal<sup>(Gage, 2000; Anderson, 2001; Engelhardt et al., 2004)</sup>, tais como: *retinitis pigmentosa* (RP), degenerescência macular associada à idade, retinopatia diabética e glaucoma. Assim, as células estaminais neuronais poderão ser úteis na recuperação da visão em doentes que sofram destas doenças, através da substituição das células danificadas e/ou através da protecção dos neurónios sobreviventes de degenerações<sup>(Fimbel et al., 2007)</sup>. O potencial tratamento de doenças degenerativas retinianas, com recurso a células progenitoras neuronais, poderá ser efectuado utilizando duas estratégias diferentes, embora complementares, nomeadamente a terapia de substituição celular e a terapia genética *ex vivo*. Apesar destes procedimentos ainda não terem sido utilizados em doenças degenerativas da retina em humanos, os resultados obtidos em diversos estudos com modelos animais indicam que estes poderão, de facto, constituir estratégias terapêuticas de enorme potencial no tratamento de doenças degenerativas da retina. Além do mais, as células progenitoras da retina, em combinação com a tecnologia de microarray de ADN, poderão ser utilizadas em estudos *in vitro* de diferenciação da retina e, assim, ser úteis na identificação de genes promotores da diferenciação e sobrevivência celular. Este conhecimento poderá ser usado como alvo terapêutico preferencial no tratamento de degenerações da retina (Figura 1.7)<sup>(Ahmad, 2001; Fimbel et al., 2007)</sup>.



**Figura 1.7 – Potencial utilização de células estaminais neuronais no tratamento de doenças degenerativas oculares**

As células progenitoras neuronais em cultura poderão ser transplantadas na retina de forma a substituir a retina danificada (fotorreceptores com tonalidade mais clara) através da sua diferenciação em fotorreceptores (fotorreceptores azuis). Em alternativa, as células progenitoras neuronais intrínsecas, tais como as células progenitoras do corpo ciliar, poderão ser estimuladas a proliferar, migrar para o local da lesão, e diferenciar-se nos fotorreceptores em falta. Paralelamente, as células progenitoras neuronais em cultura poderão também ser geneticamente modificadas no sentido de promover a sobrevivência, podendo diferenciar-se em fotorreceptores (fotorreceptores azuis) e regenerar a retina degenerada. Para tal, as células geneticamente modificadas sintetizam e libertam factores neuroprotectores, protegendo assim os fotorreceptores danificados (fotorreceptores com tonalidade mais clara). Adicionalmente, por intermédio da tecnologia de microarray de ADN, as células progenitoras em cultura poderão ainda ser utilizadas para monitorizar fármacos e factores neuroprotectores que promovam a sobrevivência de células da retina, bem como identificar genes envolvidos nos processos de diferenciação e sobrevivência das mesmas. **Setas curvas**, libertação de factores neuroprotectores (adaptado de Ahmad et al., 2001<sup>(Ahmad, 2001)</sup>).

De facto, neste seguimento, estudos em retina de peixes sugerem que a eliminação de fotorreceptores induzida por laser poderá ser recuperada a partir de uma população de células progenitoras presentes na retina<sup>(Braisted et al., 1994)</sup>. Adicionalmente, na retina adulta de murganho, foi também demonstrado que, após uma lesão na retina, é possível introduzir

células progenitoras, observando-se que as células transplantadas se integram e diferenciam em bastonetes, formam sinapses e melhoram a acuidade visual<sup>(MacLaren et al., 2006)</sup>.

## 1.2 O Neuropeptídeo Y (NPY)

### 1.2.1 O peptídeo: estrutura, síntese, localização e metabolização

#### Estrutura

O neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo constituído por 36 aminoácidos, possuindo um terminal carboxílico amidado e muitos resíduos de tirosina (designada também por Y), presentes em ambos os terminais da molécula (Figura 1.8). O NPY foi inicialmente isolado a partir de cérebro de porco, em 1982<sup>(Tatemoto, 1982)</sup>.

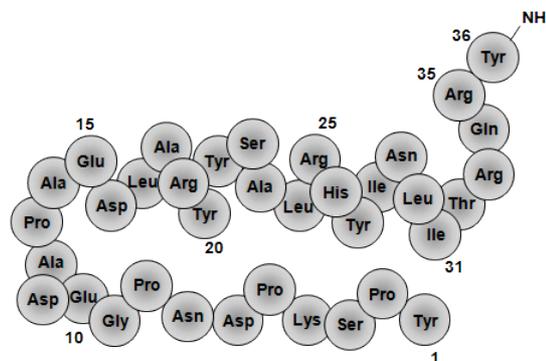


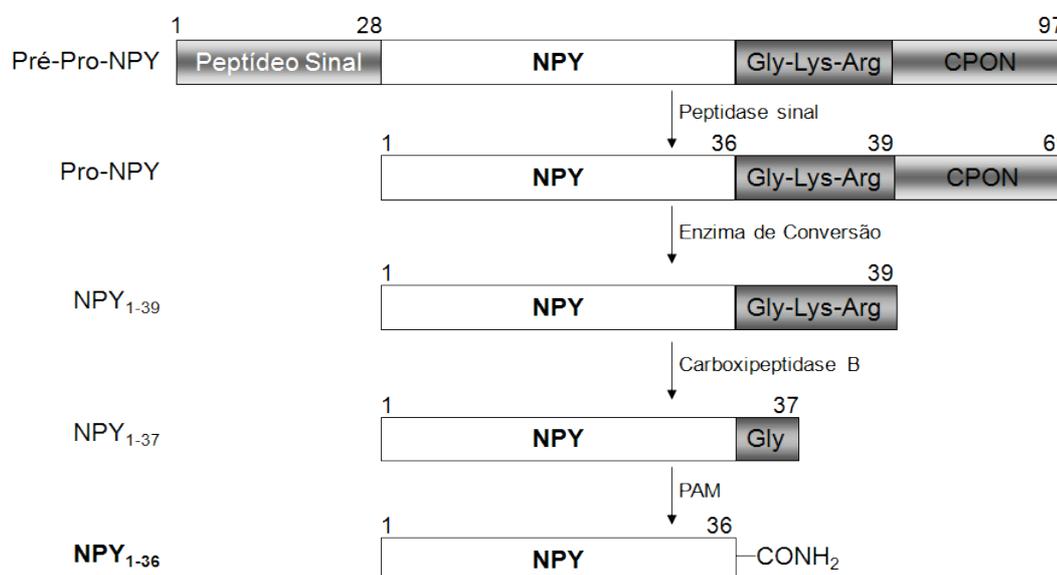
Figura 1.8 – Estrutura do neuropeptídeo Y (NPY)

O NPY pertence a uma família de peptídeos, a família do NPY, que inclui o peptídeo YY (PYY) e o polipeptídeo pancreático (PP)<sup>(Tatemoto, 1982; Schwartz et al., 1990)</sup>. O NPY é um dos neuropeptídeos mais conservados evolutivamente, enquanto que o PP varia consideravelmente entre as espécies<sup>(Larhammar et al., 1992)</sup>.

#### Síntese

À semelhança de todos os polipeptídeos e proteínas, o NPY é produzido por clivagem de um peptídeo precursor, que foi, por sua vez, sintetizado nos ribossomas e transportado para o lúmen do retículo endoplasmático e, deste, para o complexo de Golgi. O precursor

do NPY é o propeptídeo de 97 aminoácidos, designado por pré-pro-NPY<sup>(Minth et al., 1984)</sup>. Nos grânulos secretores, ocorre uma clivagem com a remoção do peptídeo sinal de 28 aminoácidos, resultando o pro-NPY, constituído por 69 aminoácidos. O pro-NPY consiste no NPY<sub>1-39</sub>, em que um grupo de três aminoácidos no terminal carboxílico, Gly<sup>37</sup>-Lys-Arg<sup>39</sup>, está flanqueado por um grupo de 33 aminoácidos (o CPON, “**C**-terminal **F**lanking **P**eptide of **N**PY”, peptídeo flanqueador do NPY, no terminal carboxílico). De seguida, o NPY<sub>1-39</sub> é sujeito à acção da enzima carboxipeptidase B (CPB), resultando o NPY<sub>1-37</sub> que, por sua vez, é o substrato da enzima de amidação peptil-glicina-amino-monoxigenase (PAM), surgindo o NPY<sub>1-36</sub> amidado que é biologicamente activo<sup>(Medeiros Mdos and Turner, 1996)</sup>. Ao NPY<sub>1-36</sub>, designaremos simplesmente por NPY (Figura 1.9).



**Figura 1.9 – Esquema da síntese do NPY a partir do precursor pré-pro-NPY.**

O pré-pro-NPY é constituído pelo peptídeo sinal de 28 aminoácidos, pelo NPY<sub>1-39</sub>, por um grupo de 3 aminoácidos no terminal carboxílico, Gly<sup>37</sup>-Lys-Arg<sup>39</sup> e pelo CPON. A remoção do peptídeo sinal origina o pro-NPY. Este contém 69 resíduos de aminoácidos, sendo constituído pelo NPY<sub>1-39</sub> e pelo peptídeo CPON. Após clivagem, pelas enzimas de conversão, resulta a formação do NPY<sub>1-39</sub>. Este peptídeo é sujeito à acção da enzima carboxipeptidase B originando o NPY<sub>1-37</sub> que por sua vez é o substrato da enzima PAM, resultando o peptídeo biologicamente activo NPY<sub>1-36</sub>, ou simplesmente NPY (adaptado de Silva, 2002)<sup>(Silva et al., 2002)</sup>.

### Localização

O NPY é considerado o neuropeptídeo mais abundante nos mamíferos e está largamente distribuído no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP)<sup>(Michel et al., 1998)</sup>. Na tabela 1.4 descreve-se, resumidamente, a distribuição do NPY no organismo, em vários modelos.

**Tabela 1.4 – Distribuição do NPY (adaptado de Salgado, 2007)**<sup>(Salgado, 2007)</sup>

<b>Distribuição</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
Medula espinal, mesencéfalo, metencéfalo	ver revisão Silva et al., 2005a
Córtex, hipotálamo, gânglio basal, tálamo, septo, estriado, amígdala	Allen et al., 1983; de Quidt and Emson, 1986a, ver revisão Silva et al., 2005a
Hipocampo, nomeadamente no giro dentado	Caberlotto et al., 2000
Lóbulo occipital e córtex temporal	Adrian et al., 1983; Beal et al., 1987; Delalle et al., 1997
Hipófise	ver revisão Grunditz et al., 1984; Jones et al., 1989; Silva et al., 2005a
Glândulas sebáceas e lacrimais	Ebara et al., 1992; Kirch et al., 1996; Seifert et al., 1996
Mucosa nasal	Zhao et al., 1998; Knipping et al., 2003
Baço, pâncreas, ilhéus de Langerhans, coração	Ahmed et al., 1997; Ponery and Adeghate, 2000; Adeghate et al., 2001; Lambert et al., 2002
Células endoteliais	Jackerott and Larsson, 1997; Jacques et al., 2003; Silva et al., 2005b
Cólon, neurónios entéricos, esfíncter pilórico	Rettenbacher and Reubi, 2001; Cox and Tough, 2002; Lindstrom and Ekblad, 2002; Anitha et al., 2006
Fígado e timo	Kranz et al., 1997; Esteban et al., 2001b
Glândulas supra-renais	de Quidt and Emson, 1986b; Fernandez-Vivero et al., 1993; Pelto-Huikko, 1989; Cavadas et al., 2001

### **Metabolização do NPY**

Entre as peptidases que apresentam alta afinidade para o NPY, a principal parece ser a dipeptidil-peptidase 4 (DPP-4; DPP-IV). Esta exopeptidase da família das propil-oligopeptidases é uma protease ligada à membrana plasmática, que cliva uma ligação peptídica, quando no peptídeo alvo existe o aminoácido prolina na penúltima posição. Assim, actuando no NPY, a DPP-4 cliva a ligação Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup> do terminal amínico, dando origem ao NPY<sub>3-36</sub>. Este peptídeo perde a afinidade para o receptor Y<sub>1</sub> e torna-se agonista

para os receptores  $Y_2$  e/ou  $Y_5$  (Medeiros and Turner, 1994; Medeiros Mdos and Turner, 1996). Existem, ainda, outras aminopeptidases que podem clivar o NPY. A dipeptidil-peptidase V8 (DPP-8; DPP-VIII) e a dipeptidil-peptidase V9 (DPP-9; DPP-IX), encontrando-se ambas localizadas no citoplasma, e, tal como a DPP-4, ambas clivam o NPY na ligação peptídica no aminoácido prolina (Abbott et al., 2000; Ajami et al., 2004). A aminopeptidase P (AP-P) é outra peptidase que hidrolisa o NPY. A AP-P hidrolisa a ligação peptídica entre o primeiro e o segundo aminoácido no terminal amínico do peptídeo, sendo o segundo aminoácido a prolina (Vanhoof et al., 1997; Venema et al., 1997), resultando em  $NPY_{2-36}$ . Os peptídeos  $NPY_{3-36}$  e  $NPY_{2-36}$  podem ainda ser degradados pela endopeptidase neutra-24-11, sendo os principais locais de clivagem a  $Tir^{20}$ - $Tir^{21}$  e  $Leu^{30}$ - $Ile^{31}$ , dando origem aos peptídeos biologicamente inactivos  $NPY_{1-20}$  e  $NPY_{31-36}$  (Yaron and Mlynar, 1968; Medeiros and Turner, 1994; Medeiros Mdos and Turner, 1996).

### 1.2.2 Receptores do NPY

O NPY exerce a sua actividade biológica através de receptores acoplados a proteínas-G, caracterizando-se estes pela existência de 7 domínios transmembranares. A família dos receptores do NPY é a mesma família para todos os membros da família do NPY, o PP e o PYY, e inclui: o receptor  $Y_1$ , inicialmente caracterizado como um receptor pós-sináptico; o receptor  $Y_2$ , que é considerado um receptor pré-sináptico; o receptor  $Y_3$ , cuja clonagem ainda não foi descrita; o receptor  $Y_4$ , que foi o primeiro receptor identificado para o PP; o receptor  $Y_5$ , que está envolvido na regulação do apetite; e o receptor  $y_6$ , que, apesar de já ter sido clonado e a sua expressão genética resultar em proteínas funcionais em coelhos e murganhos, ainda não tem função conhecida em primatas (revisão (Michel et al., 1998)). Aos subtipos  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$  ligam preferencialmente o NPY e o PYY, enquanto que ao  $Y_4$  liga, preferencialmente, o PP.

#### 1.2.2.1 O receptor $Y_1$

Para que o receptor do NPY do subtipo  $Y_1$  seja activado pelo NPY, é essencial que o terminal amínico esteja intacto. De facto, a remoção de aminoácidos deste terminal, resultando nos análogos  $NPY_{2-36}$ ,  $NPY_{3-36}$  e  $NPY_{13-36}$ , conduz a uma perda evidente da afinidade pelo receptor  $Y_1$ . As modificações do NPY ao nível do terminal carboxílico resultam em análogos igualmente activos (Grundemar et al., 1993; Silva et al., 2002). O receptor  $Y_1$  é abundantemente expresso no SNC e nos vasos sanguíneos (Grundemar et al., 1992; Wahlestedt et al., 1993).

As suas principais funções estão associadas à vasoconstrição<sup>(Capurro and Huidobro-Toro, 1999; Wiest et al., 2006)</sup>, à proliferação de células do músculo liso<sup>(Zukowska-Grojec et al., 1998b)</sup>, epitélio olfactivo<sup>(Hansel, 2001)</sup>, células progenitoras do hipocampo<sup>(Howell et al., 2003; Howell et al., 2005; Howell et al., 2007)</sup>, células  $\beta$  do pâncreas<sup>(Cho and Kim, 2004)</sup>, células de Müller<sup>(Milenkovic et al., 2004)</sup> e células tumorais<sup>(Kelley et al., 2001; Reubi et al., 2001; Komer et al., 2004)</sup>. A activação deste receptor está ainda associada à diminuição de ansiedade e depressão<sup>(Sajdyk et al., 1999; Redrobe et al., 2002)</sup>, ao aumento de apetite<sup>(Corp et al., 2001; Lecklin et al., 2003)</sup> e ao consumo de álcool<sup>(Kelley et al., 2001; Thiele et al., 2002)</sup>.

### **1.2.2.2 O receptor $Y_2$**

O receptor  $Y_2$  caracteriza-se farmacologicamente pela elevada afinidade pelo NPY e pelo PYY, mas, em contraste com o receptor  $Y_1$ , para ser activado, não requer o terminal amínico intacto, mantendo uma afinidade máxima por fragmentos de NPY com alterações no terminal amínico, ou seja, o NPY<sub>2-36</sub>, NPY<sub>3-36</sub> e o NPY<sub>13-36</sub><sup>(Michel et al., 1998)</sup>. O receptor  $Y_2$  está localizado, principalmente, a nível pré-sináptico e está implicado na inibição da libertação de neurotransmissores<sup>(Michel et al., 1998)</sup>. Este receptor tem atraído particular interesse, devido ao seu envolvimento no controlo do apetite<sup>(Naveilhan et al., 1999; Batterham et al., 2002; Sainsbury et al., 2002)</sup>, na excitabilidade neuronal e epilepsia<sup>(El Bahh et al., 2002; Herzog, 2002; Vezzani and Sperk, 2004)</sup> e na angiogénese<sup>(Zukowska-Grojec et al., 1998b; A. Jonas Ekstrand, 2003; Lee et al., 2003a)</sup>.

### **1.2.2.3 O receptor $Y_3$**

O receptor  $Y_3$  distingue-se dos restantes subtipos de receptores do NPY pelo facto de apresentar muito mais baixa afinidade para o PYY do que para o NPY e por ainda não ter sido clonado<sup>(Michel et al., 1998)</sup>. Farmacologicamente, demonstrou-se que o receptor  $Y_3$  está presente em tecidos periféricos, como o gânglio cervical de rato<sup>(Foucart et al., 1993)</sup>, cólon de rato<sup>(Dumont et al., 1994)</sup>, medula supra-renal bovina<sup>(Wahlestedt et al., 1992; Norenberg et al., 1995; Cavadas et al., 2001)</sup> e nas células cromafins humanas<sup>(Cavadas et al., 2001)</sup>. Funcionalmente, o receptor  $Y_3$  está também associado à hipotensão, bradicardia e inibição dos efeitos do glutamato<sup>(Grundemar and Hakanson, 1993)</sup> e, ainda, como receptor responsável pelo efeito estimulador do NPY, na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas<sup>(Cavadas et al., 2001; Cavadas et al., 2006)</sup>.

#### **1.2.2.4 O receptor Y<sub>4</sub>**

O receptor Y<sub>4</sub> tem maior afinidade para o PP do que para o PYY. O NPY não tem afinidade para este receptor<sup>(Lundell et al., 1995)</sup>. No homem, o ARNm do receptor Y<sub>4</sub> foi encontrado na próstata, cólon, pâncreas, intestino delgado, células do músculo liso e em determinadas regiões do cérebro, como é o caso do hipotálamo<sup>(Barrios et al., 1999; Berglund et al., 2003a; Misra et al., 2004)</sup>. O PP é conhecido por inibir a libertação exócrina do pâncreas, por induzir o relaxamento da vesícula biliar e estimular a libertação da hormona luteinizante (LH)<sup>(Horvath et al., 2001; Montet et al., 2005; Andersen, 2007)</sup>.

#### **1.2.2.5 O receptor Y<sub>5</sub>**

O receptor Y<sub>5</sub> é activado pelo NPY, PYY, [Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>34</sup>]-NPY, análogos do PYY, e fragmentos dos peptídeos, tais como, NPY<sub>3-36</sub> e PYY<sub>3-36</sub><sup>(Gerald et al., 1996; Hu et al., 1996; Borowsky et al., 1998; Michel et al., 1998)</sup>. Este receptor localiza-se no hipotálamo, estando envolvido na estimulação do apetite<sup>(Hwa et al., 1999; Cabrele et al., 2000; Lecklin et al., 2003; Beck, 2006)</sup>. Ao nível periférico, este receptor está presente nas glândulas supra-renais humanas e de murganho<sup>(Cavadas et al., 2001; Cavadas et al., 2006)</sup>.

#### **1.2.2.6 O receptor y<sub>6</sub>**

O receptor y<sub>6</sub> ainda não tem função fisiológica conhecida, mas está presente em murganhos, coelhos, primatas e humanos, tendo já sido clonado, estando ausente em ratos<sup>(Gregor et al., 1996; Matsumoto et al., 1996; Weinberg et al., 1996)</sup>. O ARNm para este receptor foi detectado no hipotálamo, hipocampo, intestino delgado e glândulas supra-renais de coelho, e no coração, músculo esquelético e hipotálamo de humanos<sup>(Gregor et al., 1996; Matsumoto et al., 1996; Statnick et al., 1998)</sup>.

#### **1.2.2.7 Vias de transdução de sinal acopladas aos receptores do NPY**

Os receptores do NPY, na maioria dos casos, estão associados a proteínas G inibidoras (G<sub>i</sub> e/ou G<sub>o</sub>). No entanto, algumas respostas resultantes da activação dos receptores de NPY parecem ser independentes das proteínas G inibidoras<sup>(Colmers and Pittman, 1989; Millar et al., 1991; Lemos and Takeda, 1995)</sup>. Os principais mecanismos intracelulares resultantes da activação dos receptores de NPY consistem na inibição da adenilciclase<sup>(Olasmaa and Terenius, 1986;</sup>

Michel, 1991) e na modulação das variações da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Motulsky and Michel, 1988; Perny and Miller, 1989). Adicionalmente, o NPY pode ainda actuar na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , pela activação ou bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem ao nível da membrana plasmática (Ewald et al., 1988; Gammon et al., 1990; Michel and Rascher, 1995). Também se demonstrou que os canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) poderão ser activados ou inibidos pelo NPY (Millar et al., 1991; Xiong and Cheung, 1995). Existem, ainda, evidências que sugerem que o NPY poderá estar associado à activação da fosfolipase A2 (Martin and Patterson, 1989) e das MAPK (Keffel et al., 1999).

### **1.2.3 O NPY e os seus receptores na retina**

Num estudo realizado na população finlandesa, demonstrou-se que um polimorfismo no gene do NPY está associado a uma predisposição para o desenvolvimento de retinopatia diabética em pacientes com diabetes tipo 2 (Niskanen et al., 2000). Verificou-se que uma substituição comum do aminoácido prolina por leucina no codão 7 do gene do NPY (Leu<sup>7</sup>Pro) aumenta o risco de desenvolvimento de retinopatia. No que diz respeito ao tipo de receptor do NPY envolvido nesta doença, algumas evidências sugerem que o receptor  $\text{Y}_2$  pode mediar o desenvolvimento de retinopatia diabética, nomeadamente ao nível do processo de neovascularização da retina (Koulu et al., 2004).

Estas evidências sugerem que o NPY terá funções importantes na retina. Contudo, as funções do NPY em processos fisiológicos e patológicos na retina são desconhecidas.

A presença de NPY na retina foi detectada pela primeira vez em 1984 por Bruun *et al.* (Bruun et al., 1984), em cobaias. Estudos posteriores demonstraram a existência de imunoreactividade para o NPY (NPY-ir), na retina de várias espécies de vertebrados e mamíferos, nomeadamente em babuíno, porco, gato, rato, murganhos, pombo, pinto, rã, truta, carpa, peixe dourado, dourada e em retinas humanas (Bruun et al., 1986; Tomqvist and Ehinger, 1988; Straznicky and Hiscock, 1989; Bruun et al., 1991; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Ammar et al., 1998; Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002; Yoon et al., 2002; Pirone et al., 2008).

A NPY-ir, em modelos animais, está presente na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares, tendo sido demonstrado que a NPY-ir está localizada predominantemente em células amácrinas e amácrinas deslocadas. Na camada nuclear interna a NPY-ir surge nos corpos celulares, enquanto que, na camada plexiforme interna, observou-se marcação para o NPY ao longo das dendrites (Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002). Em retinas humanas, a NPY-ir está preferencialmente nos corpos celulares e nos axónios das células ganglionares e amácrinas, localizadas nas camadas de células ganglionares e

nuclear interna, respectivamente<sup>(Straznicky and Hiscock, 1989; Jen et al., 1994)</sup>. Este padrão de distribuição foi também detectado na retina de gatos<sup>(Hutsler and Chalupa, 1994, 1995)</sup>.

Alguns estudos demonstraram a presença de receptores de NPY na retina de diversas espécies. No epitélio pigmentado da retina humana, foi detectado o ARNm para os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ , e, no epitélio pigmentado de bovino, foi apenas detectado o ARNm para receptores  $Y_1$  e  $Y_2$ <sup>(Ammar et al., 1998)</sup>. Na retina de rato, o receptor  $Y_1$  do NPY foi detectado nos corpos celulares das células horizontais e nas suas ramificações na camada plexiforme externa<sup>(D'Angelo et al., 2002)</sup>. Este estudo revelou ainda que a imunoreactividade para o receptor  $Y_1$  está presente nas dendrites de células amácrinas colinérgicas. Na retina de rato, atendendo à diferença entre a distribuição do NPY e do receptor  $Y_1$ , os autores sugerem que o NPY poderá actuar de forma parácrina nos receptores  $Y_1$ , de forma a modular a actividade das células amácrinas e horizontais<sup>(D'Angelo et al., 2002)</sup>. Posteriormente, confirmou-se por RT-PCR a presença dos receptores do NPY  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ , na retina de rato<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>. Até ao momento, na retina de murganho, foi apenas identificado o ARNm do receptor  $Y_1$  e  $Y_2$  do NPY<sup>(Yoon et al., 2002)</sup>. Por último, é importante referir que a expressão do NPY e dos seus receptores, a nível do SNC, não ocorre apenas em neurónios, podendo também ocorrer em células da glia, nomeadamente em astrócitos<sup>(Gimpl et al., 1993; Barnea et al., 1998; St-Pierre et al., 2000)</sup>.

### 1.2.4 Efeitos do NPY: da neuromodulação à neuroprotecção

#### 1.2.4.1 Efeito neuromodulador do NPY

Vários estudos têm demonstrado que o NPY é um neuromodulador. O NPY regula a excitabilidade neuronal, em diferentes áreas do SNC, e a sua acção pode ser mediada por efeitos pré- ou pós-sinápticos. De facto, o NPY modula a libertação de diferentes neurotransmissores e hormonas, tais como glutamato, GABA, noradrenalina, dopamina, somatostatina, serotonina (5-HT), hormona de crescimento e o factor de libertação da corticotrofina, em múltiplas áreas do SNC<sup>(ver revisão(Silva et al., 2005a))</sup>. Assim, estudos realizados em modelos animais indicam que o NPY inibe a libertação de glutamato<sup>(Bleakman et al., 1992; Greber et al., 1994; Silva et al., 2001; Silva et al., 2003c)</sup>, aspartato<sup>(Rodi et al., 2003)</sup>, hormona de crescimento<sup>(Rettori et al., 1990b)</sup>, noradrenalina<sup>(Martire et al., 1995; Tsuda et al., 1995; Bitran et al., 1999; Hastings et al., 2004)</sup> e de acetilcolina<sup>(Gu et al., 1983; Potter, 1987; Schwertfeger et al., 2004)</sup>, em diversas estruturas cerebrais. Por outro lado, este peptídeo

induz um aumento na libertação de somatostatina<sup>(Rettori et al., 1990a)</sup>, dopamina<sup>(Ault and Werling, 1999)</sup> e monóxido de azoto<sup>(Bitran et al., 1999) (ver revisão(Silva et al., 2005a))</sup>.

O NPY está co-localizado com outros neurotransmissores em diversas estruturas nervosas, como o neocórtex, hipotálamo, estriado, *nucleus accumbens*, região ventral do nucleus caudate <sup>(ver revisão(Silva et al., 2005a))</sup>. Já foi demonstrada, em modelos animais, a co-localização do NPY e do GABA no “*arcuate nucleus*” do hipotálamo, neocórtex, amígdala média, estriado e córtex visual<sup>(Hendry et al., 1984; Jones and Hendry, 1986; Papadopoulos et al., 1987; Demeulemeester et al., 1988; Aoki and Pickel, 1989; Vuillet et al., 1990; Horvath et al., 1997; Gao et al., 2003; Oberto et al., 2003)</sup>. Várias evidências apontam, ainda, para o co-armazenamento de NPY, GABA e somatostatina no córtex cerebral, substância branca subcortical, amígdala média e estriado<sup>(Smith and Parent, 1986; Aoki and Pickel, 1989; Schwartzberg et al., 1990; Oberto et al., 2003)</sup>. O NPY está co-localizado com os receptores do glutamato GluR2/4 ou GluR5/6/7, no córtex temporal e no hipocampo<sup>(Gonzalez-Albo et al., 2001)</sup>. No néo-córtex humano, verificou-se co-localização dos neurónios NPY-ir com os neurónios positivos para a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d)<sup>(Unger and Lange, 1992)</sup>.

À semelhança do que acontece noutras áreas do SNC, a presença de NPY nas células amácrinas da retinas de mamíferos sugere que este peptídeo pode funcionar como um neuromodulador<sup>(D'Angelo et al., 2002; Oh et al., 2002)</sup>. A capacidade do NPY, em concentrações da ordem do nanomolar, em alterar a libertação de neurotransmissores na retina foi demonstrada há mais de uma década<sup>(Bruun and Ehinger, 1993)</sup>. Aplicado exogenamente, o NPY afecta a libertação de [<sup>3</sup>H]glicina, [<sup>3</sup>H]dopamina, [<sup>3</sup>H]5-HT e [<sup>3</sup>H]cloreto de colina na retina de coelho e a libertação de [<sup>3</sup>H]GABA, [<sup>3</sup>H]5-HT e [<sup>3</sup>H]cloreto de colina na retina de pinto. A libertação de neurotransmissores induzida pelo NPY é dependente de energia, sendo dependente da actividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, e também de Ca<sup>2+</sup><sup>(Bruun and Ehinger, 1993)</sup>. Estudos realizados em ratos e murganhos demonstraram que as células amácrinas imunorreactivas ao NPY também são imunorreactivas ao GABA, à enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e aos transportadores de GABA (VGAT), indicando que estes neurónios são inibitórios<sup>(Aoki and Pickel, 1990)</sup>. A co-localização de GABA e de NPY também sugere que as células amácrinas libertam as duas substâncias<sup>(Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002)</sup>. Foi também demonstrada a participação do NPY, na modulação do mecanismo de ajustamento espacial na retina. O ajustamento espacial é realizado pelas células ganglionares e pensa-se que este mecanismo é regulado ao nível da camada plexiforme interna, envolvendo células amácrinas. De facto, a remoção de um subtipo destas células, nomeadamente células

amácricas que expressam NPY, provoca a perda de capacidade de ajustamento espacial por parte das células ganglionares<sup>(Sinclair et al., 2004)</sup>.

#### **1.2.4.2 Efeito proliferativo do NPY**

O NPY parece ser um potencial candidato para estimular a proliferação de células progenitoras neuronais. A actividade neuroproliferativa do NPY foi demonstrada pela primeira vez, *in vitro* e *in vivo*, em células neuronais progenitoras do epitélio olfactivo de ratos<sup>(Hansel, 2001)</sup>. Este estudo mostrou que o NPY é expresso por uma subpopulação de neuroblastos no epitélio olfactivo adulto e actua em células progenitoras neuronais, as células basais, induzindo a activação do ciclo celular. O receptor  $Y_1$  parece ser responsável pela acção proliferativa do NPY nos precursores neuronais, sendo este efeito mediado por activação de cascatas de cinases, envolvendo a proteína cinase C e as ERK1/2 (“**Extracellular Signal-Regulated Kinases**”), que pertence ao grupo das MAP (“**Mitogen-Activated Protein**”) cinases<sup>(Hansel, 2001)</sup>.

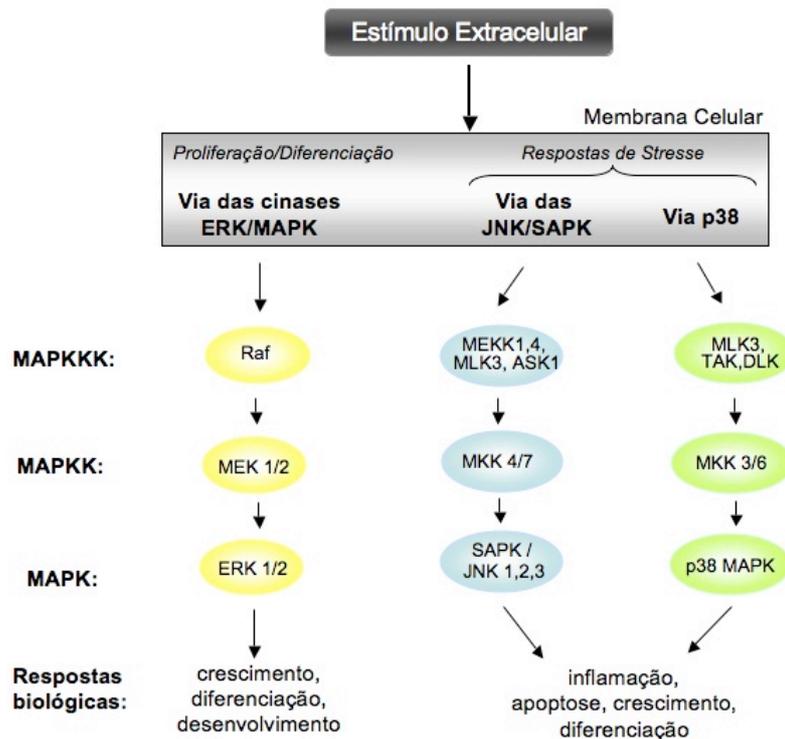
Mais recentemente, foi evidenciada a actividade neuroproliferativa do NPY em neurónios de hipocampo<sup>(Howell et al., 2003; Howell et al., 2005; Howell et al., 2007)</sup>. O NPY estimula a proliferação de células positivas para a nestina e de neuroblastos, em culturas de hipocampo de ratos recém-nascidos, e a proliferação de precursores neuronais no giro dentado do hipocampo de animais recém-nascidos e adultos, sendo esse efeito também mediado pelo receptor  $Y_1$  via activação da sinalização ERK1/2<sup>(Howell et al., 2005; Howell et al., 2007)</sup>.

O NPY também tem actividade proliferativa sobre células da glia. Estudos realizados em culturas de células de Müller da retina de cobaias mostraram que o NPY tem uma actividade proliferativa bifásica. Para baixas concentrações (0,1 ng/mL e 1 ng/mL), o NPY diminui a proliferação celular, enquanto que, na presença de elevadas concentrações (100 ng/mL), aumenta a proliferação celular<sup>(Milenkovic et al., 2004)</sup>. A expressão do receptor  $Y_1$  foi detectada em células da glia de retinas de indivíduos com vitreoretinopatia proliferativa, o que sugere que o NPY pode estar envolvido na estimulação da proliferação das células da glia em situações patológicas<sup>(Soler et al., 2002)</sup>.

Tendo em consideração o envolvimento das MAPK na indução e regulação da proliferação celular e o efeito anti- e pró-proliferativo do NO, estudámos o efeito proliferativo do NPY nas células da retina em cultura, com base nestes pressupostos. Assim, de seguida, irá ser descrita a relação das MAPK e do NO com o efeito proliferativo do NPY.

#### **1.2.4.2.1 Proteínas cinases activadas por agentes mitogénicos (MAPK) e o efeito proliferativo do NPY**

As proteínas cinases activadas por agentes mitogénicos (MAPK), encontram-se presentes em todos os eucariotas e participam em vias de transdução de sinal, desde as membranas até ao núcleo<sup>(Herskowitz, 1995; Lewis et al., 1998; Cobb, 1999)</sup>. Estas cinases são activadas num processo designado em cascata, através de fosforilações em resíduos de tirosina e treonina<sup>(Lopez-Illasaca, 1998; Cobb, 1999; English et al., 1999)</sup>. Cada cascata consiste em, pelo menos, três enzimas que são activadas em série (Figura 1.10).



**Figura 1.10 – Activação de diferentes vias de sinalização de MAPK por estímulos extracelulares.**

As vias de sinalização de MAPK contêm pelo menos três vias distintas de transdução de sinal que actuam em paralelo. Estas incluem as cinases ERK 1/2, c-JUN (também designadas JNK/SAPK) e p38. Na via da ERK 1/2, a Raf é a primeira cinase a ser activada após diversas fosforilações. A Raf pertence ao grupo das MAPKKK [MAP cinase cinase cinase ou MEK cinase (MEKK)], fosforilando 2 resíduos, um de serina e outro de treonina, das MEK 1/2 [MAPKK (MAP cinase cinase)] que irão activar directamente as ERK 1/2 [MAP cinase (MAPK)]. As vias JNK e p38 são activadas de acordo com a mesma organização descrita para as ERK 1/2, embora por diferentes cinases <sup>(Lopez-Illasaca, 1998; Cobb, 1999; English et al., 1999)</sup>.

As MAPK são capazes de converter estímulos extracelulares em sinais intracelulares que controlam a expressão génica e, eventualmente, a proliferação e diferenciação celular <sup>(Cano and Mahadevan, 1995; Cohen, 1997)</sup>. Estas cinases estão divididas em três subfamílias: as ERK, que incluem a ERK1 e a ERK2; as SAPK, também designadas cinases N-terminal do c-jun (JNK); e as cinases p38 <sup>(Lopez-Illasaca, 1998)</sup>. Estas três famílias de cinases podem ser activadas simultaneamente, através de cascatas paralelas, mas as respostas ao mesmo estímulo podem ser distintas <sup>(Cano and Mahadevan, 1995)</sup>.

No capítulo 5 deste trabalho, foi focada apenas a sinalização envolvendo as ERK 1/2 ou MAPK, no processo de proliferação de células da retina. Deste modo, descreve-se, de seguida, os mecanismos associados a estas cinases.

As cinases ERK 1, 2 e 3 foram as três primeiras MAPK de mamífero a serem clonadas, no início da década de 90. As ERK 1 e 2 são consideradas, entre as MAPK, as mais comuns nos processos de transdução de sinal, estando associadas à proliferação celular<sup>(Lewis et al., 1998; Cobb, 1999)</sup>.

Os ligandos dos receptores do tipo tirosina-cinase estimulam a sua actividade, aumentando a autofosforilação do receptor, que resulta em alterações de conformação do mesmo, criando locais de ligação para outras moléculas envolvidas numa determinada via de sinalização. As MAPK podem ser activadas através de vários mecanismos. A activação das ERK pode ocorrer através de proteínas G, da proteína cinase C (PKC)<sup>(Anderson et al., 1991; Howe and Marshall, 1993; Gutkind, 1998)</sup>, por mecanismos independentes da PKC<sup>(Farnsworth et al., 1995; Chen et al., 1998)</sup> ou através do aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular livre<sup>(Burgering et al., 1993b; Rosen et al., 1994)</sup>. A activação de proteínas G pode induzir um aumento na produção de AMPc que, dependendo do tipo de célula, poderá inibir ou activar as ERK. Estudos realizados em fibroblastos e células do músculo liso revelaram que, após a sua estimulação por factores de crescimento, o aumento de produção de AMPc pode inibir a activação das ERK<sup>(Burgering et al., 1993b; Burgering et al., 1993a; Cook and McCormick, 1993; Wu et al., 1993; Howell et al., 2007)</sup>. Pelo contrário, em células neuronais e células  $\beta$  do pâncreas, o AMPc estimula a activação das ERK<sup>(Frodin et al., 1994; Frodin et al., 1995; Khoo and Cobb, 1997)</sup>. A actividade máxima das MAPK está dependente do nível de fosforilação de resíduos de treonina e tirosina e, portanto, a remoção do grupo fosfato inibe a sua actividade. A desfosforilação de MAPK resulta da acção de MAPK fosfatases (MKP)<sup>(Guan and Dixon, 1993; Sun et al., 1993; Zheng and Guan, 1993)</sup>. Estas enzimas desfosforilam selectivamente as MAPK mas, embora possam ser desfosforilados ambos os resíduos, o resíduo de fosfotirosina é o preferencialmente desfosforilado<sup>(Chu et al., 1996b; Groom et al., 1996; Mourey et al., 1996)</sup>.

Os inibidores farmacológicos de componentes das vias das MAPK têm-se revelado indispensáveis na determinação das funções destas proteínas<sup>(Dudley et al., 1995; Favata et al., 1998; Olsen et al., 1998)</sup> como, por exemplo, na proliferação celular, diferenciação neuronal e biossíntese de citocinas inflamatórias, entre outros. No que diz respeito à proliferação, as ERK são activadas por agentes mitogénicos. Inúmeros estudos indicam que as ERK desempenham um papel essencial na sinalização mitogénica. De facto, demonstrou-se que a expressão constitutiva das formas activas das ERK1/2 leva à transformação de fibroblastos e à produção de tumores em murganhos “knock-out”<sup>(Mansour et al., 1994)</sup>. Adicionalmente, uma proteína resultante da fusão da ERK2 e da MEK1, quando expressa no núcleo, é suficiente para que ocorra transformação dos fibroblastos, o que sugere que a activação da ERK2 é suficiente para a transformação de células imortalizadas<sup>(Robinson et al., 1998)</sup>. Existem, também,

alguns estudos que demonstram o envolvimento das ERK 1/2 com o efeito proliferativo do NPY, nomeadamente em células progenitoras do epitélio olfactivo e do hipocampo, células da glia e em células  $\beta$  do pâncreas<sup>(Hansel, 2001; Cho and Kim, 2004; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005)</sup>.

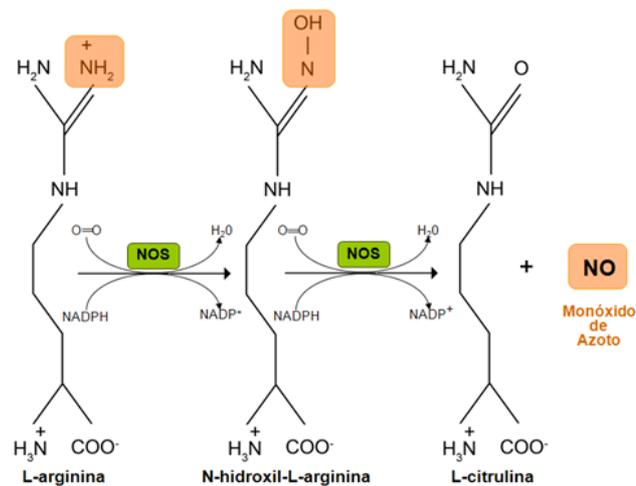
#### **1.2.4.2.2 O monóxido de azoto (NO) e o efeito proliferativo do NPY**

O monóxido de azoto (NO) é uma molécula gasosa inorgânica, que se caracteriza como radical livre instável, com um tempo de meia-vida muito curto (2 a 20 segundos)<sup>(Garthwaite and Boulton, 1995; Toda and Nakanishi-Toda, 2007)</sup>. O NO foi reconhecido como um mensageiro, no sistema nervoso central, há, aproximadamente, duas décadas<sup>(Garthwaite et al., 1988)</sup>. Uma propriedade chave do NO, que se destaca de outras moléculas sinalizadoras do SNC, é a sua extrema difusibilidade em ambientes aquosos e lipídicos, o que permite uma rápida distribuição do sinal e, também, alcançar tecidos distantes do seu local de produção<sup>(Garthwaite and Boulton, 1995)</sup>.

#### **Síntese e funções do NO**

As enzimas responsáveis pela síntese do NO designam-se por sintases do monóxido de azoto (NOS). Existem três isoformas da NOS: NOS neuronal (ou NOS tipo I, nNOS)<sup>(Bredt et al., 1991)</sup>, NOS indutível (NOS II, iNOS)<sup>(Nunokawa et al., 1993; Nathan, 1994)</sup>, e NOS endotelial (NOS III, eNOS)<sup>(Janssens et al., 1992)</sup>. A nNOS é constitutivamente expressa no cérebro e nervos periféricos e é uma enzima solúvel que, para a sua activação, requer  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulina e cofactores como a tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), um grupo heme, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD) e flavina adenina mononucleótido (FMN). A expressão da iNOS pode ser induzida em vários tipos de células e tecidos, mediante determinado tipo de estímulos. Por exemplo, a expressão da iNOS é induzida nos macrófagos pelo lipopolissacarídeo (LPS) e por citocinas<sup>(Hevel et al., 1991; Stuehr et al., 1991)</sup>. A eNOS é constitutivamente expressa, principalmente, por células endoteliais<sup>(Forstermann et al., 1991)</sup>.

O NO é produzido por transformação do substrato L-arginina em N-hidroxi-L-arginina por hidroxilação e esta em L-citrulina. As reacções catalisadas pelas NOS ocorrem na presença de oxigénio ( $\text{O}_2$ ) e de vários cofactores (Figura 1.11).



**Figura 1.11 – Esquema representativo da biossíntese do monóxido de azoto.**

A reacção de síntese do NO inicia-se com a hidroxilação da L-arginina, originando um composto intermediário, a N-hidroxi-L-arginina, que por sua vez é oxidada, dando origem à L-citrulina e ao NO.

As acções biológicas do NO são amplamente conhecidas, tendo-se vindo a demonstrar que o NO tem acções benéficas ou citotóxicas, dependendo das concentrações de NO e do ambiente celular<sup>(Keynes and Garthwaite, 2004)</sup>. Baixas concentrações de NO têm acções benéficas, enquanto que concentrações excessivas ou a combinação de NO com espécies reactivas de oxigénio produzem efeitos deletérios<sup>(Estrada and Murillo-Carretero, 2005)</sup>. Assim, considera-se que as isoformas eNOS e nNOS, que produzem pequenas quantidades de NO, estão mais associadas a processos fisiológicos, estando a isoforma iNOS, que produz grandes quantidades de NO, mais associada a processos patológicos, incluindo processos inflamatórios, lesões de tecidos e morte celular por apoptose<sup>(Estrada and Murillo-Carretero, 2005)</sup>.

O NO produzido pela eNOS no endotélio vascular causa vasodilatação, diminuição da resistência vascular, redução da pressão sanguínea, inibição da adesão e agregação das plaquetas, inibição da adesão de leucócitos e prevenção da aterosclerose<sup>(ver revisão(Toda and Nakanishi-Toda, 2007))</sup>. No SNC, o NO actua como neuromodulador, regulando a actividade neuronal. O glutamato, por exemplo, estimula a formação de NO através do aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , podendo a produção excessiva de NO conduzir a processos neurodegenerativos agudos ou crónicos<sup>(ver revisão(Estrada and Murillo-Carretero, 2005; Toda and Nakanishi-Toda, 2007))</sup>. O NO gerado pela iNOS modula os processos inflamatórios através de múltiplas vias, desempenhando uma função importante na regulação de reacções imunológicas.

### **Regulação da síntese de NO**

A activação das isoformas eNOS e nNOS depende da elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, enquanto que a isoforma iNOS é regulada ao nível da transcrição e a sua activação é independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayashi et al., 1999; Alderton et al., 2001). Todas as isoformas precisam de calmodulina para que ocorra a sua activação (Bredt and Snyder, 1994). A regulação das várias isoformas da NOS pode ainda ocorrer por fosforilação, catalisada por diferentes proteínas cinases, resultando numa modulação da sua actividade enzimática (Li et al., 2007; Rameau et al., 2007).

### **Mecanismos intracelulares activados pelo NO**

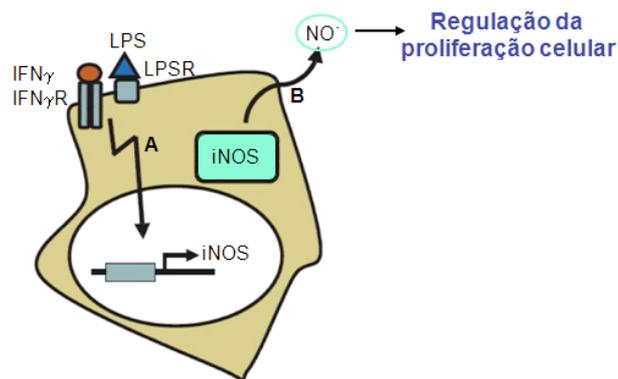
A maioria dos efeitos biológicos do NO são mediados pelo monofosfato cíclico de guanósina (GMPc) (Garthwaite, 1991). A enzima solúvel guanilil ciclase (GC) é o primeiro alvo do NO, ligando-se a um grupo heme da GC e, desse modo, estimula a enzima a converter trifosfato de guanósina (GTP) em GMPc (Bredt and Snyder, 1989). O GMPc pode actuar em canais iónicos dependentes de GMPc, activar a proteína cinase G (PKG) e fosfodiesterases dependentes de GMPc (PDEs) (Lucas et al., 2000; Lincoln et al., 2001), modulando assim a actividade de uma variedade de substratos celulares. O GMPc está também envolvido na regulação do conteúdo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Archer et al., 1994; Alioua et al., 1995). Além dos efeitos mediados através do GMPc, o NO pode ainda produzir efeitos através de um mecanismo independente de GMPc, ou seja, através da S-nitrosilação de proteínas (Stamler et al., 2001).

### **O NO e o GMPc na regulação da proliferação celular**

A proliferação celular é um processo que é modulado pelo NO (Villalobo, 2006). A estimulação da produção endógena de NO pela iNOS, induzida por factores como o interferão- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), o LPS, o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ou interleucina (IL)-1 $\beta$ , inibe a proliferação de vários tipos de células, incluindo linfócitos (Nunokawa and Tanaka, 1992; Goureau et al., 1993; Hajri et al., 1998), células do músculo liso (Nunokawa and Tanaka, 1992; Stein et al., 1995), células hepáticas (Kawada et al., 1998) e células tumorais do pâncreas (Hajri et al., 1998). A produção de NO pela eNOS também é capaz de inibir a proliferação celular, inibindo moléculas reguladoras do ciclo celular (Sharma et al., 1999). Por exemplo, o NO inibe a via das MAPK e a actividade do promotor do factor de transcrição *c-fos* (Maeda et al., 2000). Por outro lado, apesar de se considerar

que o principal efeito do NO na proliferação celular é um efeito inibidor, existem evidências que suportam uma acção estimuladora do NO na proliferação celular. Este comportamento paradoxal aparente poderá estar relacionado com a existência de diferentes concentrações de NO, nas diferentes condições experimentais (Du et al., 1997; Hajri et al., 1998; Krischel et al., 1998; Ulibarri et al., 1999; Frank et al., 2000; Luczak et al., 2004; Bal-Price et al., 2006)

A neurogénese em adultos também é modulada pelo NO. Na ausência de patologia, o NO sintetizado pela nNOS no cérebro pode inibir a proliferação de células progenitoras neuronais (Estrada and Murillo-Carretero, 2005). Contudo, após uma lesão cerebral, a produção excessiva de NO em diferentes tipos celulares está associada a um aumento da neurogénese (Estrada and Murillo-Carretero, 2005) (Figura 1.12).



**Figura 1.12 – Controlo da proliferação celular pela NO.**

A interação de citocinas, como por exemplo o IFN $\gamma$ , ou de LPS bacteriano, com os seus receptores (IFN $\gamma$ R e LPSR) na superfície celular, desencadeiam mecanismos de sinalização (A) que induzem a expressão da iNOS e a consequente produção de elevadas quantidades de NO. (B) O NO produzido inibe a proliferação de células vizinhas. Por outro lado, a expressão de outras isoformas da NOS (não representadas na figura) leva à produção de menores quantidades de NO. Nestes casos, o NO estimula a proliferação celular (adaptado de Villalobo et al, 2006) (Villalobo, 2006).

O NO também está envolvido na regulação da proliferação celular na retina. Este facto será abordado na secção seguinte (1.2.4.4.5).

O GMPc, dependendo do tipo celular, também pode actuar como agente pró-proliferativo ou anti-proliferativo. O efeito anti-proliferativo do GMPc é maioritariamente mediado pela PKG, embora, em determinadas condições, também envolva a proteína cinase A<sup>(Cornwell et al., 1994; Hutchinson et al., 1997; Hanada et al., 2001; Osinski et al., 2001)</sup>. Este efeito correlaciona-se, ainda, com a inibição da actividade da ERK 1/2, o aumento da expressão da fosfatase-1 das proteínas cinases activadas por agentes mitogénicos (MKP-1)<sup>(Hutchinson et al., 1997; Yu et al., 1997; Suhasini et al., 1998)</sup>, a modulação da regulação da expressão genética associada ao ciclo celular e a redução da síntese de Endotelina-1 (ET-1)<sup>(Fujisaki et al., 1995; Mitsutomi et al., 1999)</sup>. O efeito pró-proliferativo do GMPc foi observado em células endoteliais, estando associado a um aumento da actividade da ERK 1/2, podendo ainda estar relacionado com o aumento da produção do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF)<sup>(Hood and Granger, 1998; Parenti et al., 1998; Zhang et al., 2003)</sup>.

#### 1.2.4.2.3 O NO na retina: localização das isoformas da NOS e regulação fisiológica

O NO também contribui para a regulação fisiológica ocular<sup>(Toda and Nakanishi-Toda, 2007)</sup>. Na retina, foram identificadas todas as isoformas da NOS, sendo que as isoformas neuronal e indutível foram detectadas, principalmente, nas células amácrinas<sup>(Lopez-Costa et al., 1997; Gotzes et al., 1998; Honjo et al., 2002; Leal et al., 2007; Piehl et al., 2007)</sup>.

Na retina, o NO pode também desempenhar funções neuroprotectoras, nomeadamente após situações de hipóxia ou isquémia. A isquémia retiniana, causada pela oclusão da artéria central da retina, induz alterações no electroretinograma. Estas alterações podem ser eliminadas após microinjecções, próximo de uma arteríola constricta de um dador externo de NO, possivelmente resultando num fornecimento melhorado de oxigénio e de nutrientes ao tecido lesado, o que sugere que o aumento do NO atenua os efeitos de uma situação isquémica<sup>(Liu et al., 1995; Donati et al., 1998)</sup>. O aumento de produção de NO pela eNOS é também essencial na sobrevivência das células endoteliais na retina de rato, após isquémia<sup>(Honjo et al., 2002)</sup>. O NO apresenta também um efeito neuroprotector, após uma injeção de NMDA no vítreo. A activação dos receptores NMDA provoca uma redução dos níveis de ARNm e de proteína da tirosina hidroxilase (TH), que é atenuada na presença de um dador externo de NO (NOC-18). Kitaoka e autores (2003) sugerem que este efeito neuroprotector do NO poderá estar associado com a indução da expressão de TH e o

aumento dos níveis de dopamina<sup>(Kitaoka et al., 2003)</sup>. O efeito neuroprotector do NO foi demonstrado também em neurónios da retina, através da inibição da apoptose por uma via dependente de GMPc e da proteína cinase G<sup>(Mejia-Garcia and Paes-de-Carvalho, 2007)</sup>. Adicionalmente, na retina, o NO está também associado à modulação da libertação de neurotransmissores. De facto, o NO afecta a libertação de acetilcolina<sup>(Kraus and Prast, 2001)</sup>, glutamato<sup>(Prast and Philippu, 2001)</sup>, dopamina<sup>(Segovia and Mora, 1998; Salum et al., 2006)</sup> e serotonina<sup>(Ginap and Kilbinger, 1998; Straub et al., 2007)</sup>. Além destes neurotransmissores, na retina de anfíbios, foi demonstrado que o NO estimula a libertação de GABA e inibe a libertação de glicina<sup>(lentile et al., 1996; Yu and Eldred, 2005)</sup>.

No entanto, na retina, o NO não participa apenas em efeitos benéficos. De facto, na disfunção endotelial, a activação das NOS constitutivas causa desregulação do olho. Esta desregulação está associada ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo glaucoma, isquémia e retinopatia diabética. A activação da iNOS, por endotoxinas, inflamação e citocinas, produz elevadas quantidades de NO, por longos períodos de tempo, induzindo acções fisiopatológicas no nervo óptico e na retina. Do mesmo modo, quantidades excessivas de NO produzido na retina em consequência da excitotoxicidade e isquémia são lesivas para as células ganglionares e outros neurónios presentes no olho<sup>(Toda and Nakanishi-Toda, 2007)</sup>. Assim, o conhecimento aprofundado acerca dos efeitos benéficos e patológicos do NO é necessário para o desenvolvimento de novas terapias<sup>(Toda and Nakanishi-Toda, 2007)</sup>.

Relativamente à regulação da proliferação celular na retina pelo NO, estudos realizados em retina embrionária de pinto demonstraram que dadores externos de NO reduzem a proliferação celular de uma forma independente das vias de GMPc e das ERK 1/2<sup>(Magalhaes et al., 2006)</sup>. Por outro lado, em retinas de ratos recém-nascidos tratadas com L-arginina, observou-se um aumento da proliferação celular, sugerindo que o NO poderá desempenhar um papel importante na maturação da retina pós-natal<sup>(Kim et al., 2002)</sup>.

### **1.2.4.3 Efeito neuroprotector do NPY**

A neuroprotecção do SNC é um fenómeno fundamental na prevenção da morte celular, como se verifica no caso das doenças neurodegenerativas. Os efeitos neuroprotectores do NPY, após a estimulação excessiva dos receptores do glutamato (excitotoxicidade), estão bem documentados. Em culturas organotípicas de rato e de murganho, o NPY diminui a morte celular induzida por agonistas dos receptores do glutamato<sup>(Silva et al., 2003c; Xapelli et al., 2007)</sup>.

O NPY é também capaz de reduzir a excitotoxicidade noutras áreas do cérebro, tais como na amígdala e no córtex<sup>(Domin et al., 2006)</sup>.

Fortes evidências sugerem que o NPY pode desempenhar funções neuroprotectoras, durante algumas situações patológicas do SNC, como por exemplo, na epilepsia, isquémia ou doenças neurodegenerativas. Cérebros de indivíduos que sofriam de epilepsia evidenciam uma sobre-expressão de NPY nos interneurónios<sup>(Mathern et al., 1995; Furtinger et al., 2001)</sup>. Do mesmo modo, em modelos animais de epilepsia, detectou-se um aumento do ARNm do NPY no hipocampo, amígdala, estriado, córtex e em áreas extralímbicas<sup>(Marksteiner et al., 1989; Marksteiner et al., 1990c; Marksteiner et al., 1990a; Bellmann et al., 1991; Vezzani et al., 1996)</sup>. Assim, a sobre-expressão do NPY em ambos os casos, humanos e modelos animais, poderá representar uma resposta compensatória endógena à actividade epiléptica. De facto, fármacos anti-convulsivantes previnem a frequência das convulsões e o aumento dos níveis de NPY<sup>(Marksteiner et al., 1989; Marksteiner et al., 1990b; Marksteiner et al., 1990a)</sup>. Além disso, a administração de injeções intracerebroventriculares (ICV) de NPY inibe a actividade epiléptica<sup>(Woldbye et al., 1996)</sup>.

Klemp and Woldbye, 2001). Adicionalmente, murganhos “knock-out” para o NPY são incapazes de terminar a actividade convulsiva espontânea e a administração de NPY, antes da indução de convulsões, previne a morte destes animais<sup>(Erickson et al., 1996; Baraban et al., 1997)</sup>. A modulação da actividade epiléptica parece envolver os receptores do NPY Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub><sup>(Kofler et al., 1997; Husum et al., 2004)</sup>.

### **1.3 A Neurotoxicidade na retina**

#### **1.3.1 Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose**

Não obstante nem sempre ser fácil a distinção entre morte celular por apoptose ou necrose, apoptose e necrose apresentam características bioquímicas e morfológicas particulares. A necrose, normalmente, resulta de uma lesão severa, como por exemplo uma exposição a agentes tóxicos ou uma situação de stresse aguda. Caracteriza-se por um esgotamento rápido de ATP, uma expansão da célula e ruptura da membrana plasmática. A necrose é, frequentemente, seguida de uma resposta inflamatória no local da lesão, devido a um derramamento do conteúdo das células para o meio intercelular. A apoptose, ou morte celular programada, representa o mecanismo mais comum na regulação da homeostase relativa ao número de células de um determinado tecido no organismo, extremamente importante durante o desenvolvimento, bem como em inúmeras doenças degenerativas<sup>(Cellerino et al., 2000)</sup>. A apoptose é considerada um evento activo, no qual as células em degeneração activam um programa de auto-destruição, envolvendo a síntese *de novo* de proteínas e, assim, o consumo de energia<sup>(Cellerino et al., 2000)</sup> (Figura 1.13). Caracteriza-se pela ruptura da membrana nuclear, fragmentação de DNA, condensação de cromatina, exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática e evaginações da membrana<sup>(Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980)</sup>.

### 1.3.1.1 Caspases

A família de proteínas, denominadas caspases, é uma família de proteases cisteínicas, que clivam resíduos de aspartato, sendo essenciais em determinados processos apoptóticos. A apoptose pode ser desencadeada por sinais provenientes da activação de receptores localizados na membrana plasmática, sendo designada via extrínseca, ou pela libertação de moléculas mitocondriais para o citoplasma, designando-se esta via por via intrínseca ou mitocondrial<sup>(Liu et al., 1998; Liu et al., 1999)</sup>.

As caspases estão presentes nas células como precursores inactivos que necessitam de ser clivados por outras caspases, um mecanismo comum a todas as caspases, de forma a tornarem-se activas, num processo que ocorre em cascata.

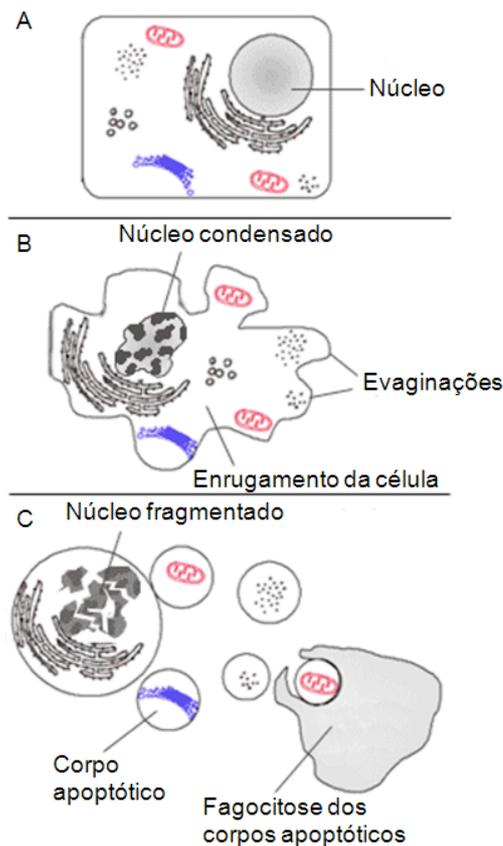


Figura 1.13 – Esquema representativo das características morfológicas do processo apoptótico

**A-** Célula intacta; **B-** O processo de apoptose inicia-se pela condensação do núcleo, contracção da célula e pelas evaginações da membrana plasmática; **C-** Na fase tardia da morte celular por apoptose, observa-se a fragmentação do núcleo, a formação de corpos apoptóticos e, finalmente, a fagocitose dos corpos apoptóticos por células fagocíticas.

A clivagem proteolítica ocorre pela remoção do pró-domínio da caspase e, dessa forma, a caspase adquire actividade catalítica<sup>(Chan and Mattson, 1999; Leist and Jaattela, 2001)</sup>. As caspases podem ser divididas em caspases iniciais (caspases 2, 8, 9 e 10) e caspases efectoras (caspases 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 e 13). As caspases iniciais são activadas em resposta a um insulto celular e são responsáveis pela clivagem e activação das caspases efectoras, que são responsáveis pelos eventos proteolíticos associados à morte celular por apoptose<sup>(Chan and Mattson, 1999; Leist and Jaattela, 2001)</sup>. A existência de caspases iniciais previne a activação directa das caspases efectoras, existindo assim uma regulação mais rigorosa da cascata apoptótica.

A caspase-3 é considerada a principal caspase efectora e pode ser activada por ambas as vias de apoptose, extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca, a caspase-8 activada cliva e activa a caspase-3, bem como outras caspases. Na via mitocondrial, ocorre a libertação de citocromo c da mitocôndria para o citosol, que se vai ligar à pró-caspase-9 e ao factor activador de proteases apoptóticas 1 (“apoptosis protease activating factor-1”; Apaf-1), formando um complexo designado de apoptossoma e resultando na activação da caspase-9<sup>(Li et al., 1997; Zou et al., 1999)</sup>. A caspase-9 actua, de seguida, na pró-caspase-3, activando-a. A caspase-3 activa é capaz de clivar diversos substratos intracelulares, tais como proteínas do citoesqueleto, enzimas de reparação do ADN, proteínas cinases e proteínas anti-apoptóticas, causando morte celular<sup>(Chan and Mattson, 1999)</sup>.

### **1.3.2 Cálcio: o mensageiro secundário intracelular na retina**

O ião cálcio pode funcionar como um sinal intracelular, sendo responsável pelo controlo de inúmeros processos celulares, tais como, crescimento e diferenciação celular, excitose e excitabilidade neuronal. Devido a isto, os neurónios deverão regular de forma rigorosa a  $[Ca^{2+}]_i$ , de forma a estabelecerem um equilíbrio eficiente para que a sinalização de  $Ca^{2+}$  ocorra adequadamente. A  $[Ca^{2+}]_i$ , numa célula em repouso, deve permanecer em níveis muito baixos (cerca de 100 nM). Elevações relativamente pequenas ou localizadas da  $[Ca^{2+}]_i$  são suficientes para induzir a activação de enzimas ou de canais iónicos. Assim, os neurónios deverão desenvolver mecanismos homeostáticos, de modo a regular a  $[Ca^{2+}]_i$ .

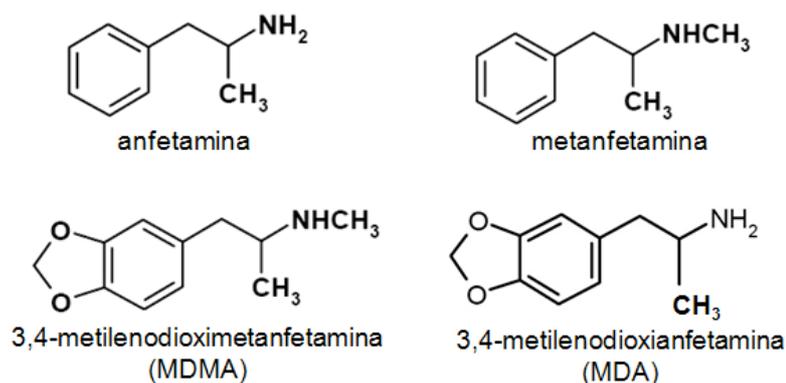
e a localização de íões  $\text{Ca}^{2+}$ , no interior da célula<sup>(Graham et al., 1990; Rahn et al., 1991; Zhou and Neher, 1993; Bindokas and Miller, 1995)</sup>.

A acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol ou em compartimentos celulares poderá activar processos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se encontram latentes ou que operam, normalmente, a níveis baixos. A activação excessiva destes processos, que incluem, por exemplo, processos enzimáticos com o envolvimento de proteases, lipases ou endonucleases, poderão conduzir a lesões celulares ou promover a formação de produtos de reacção tóxicos que, em última instância, causam morte celular<sup>(ver revisão(Sattler and Tymianski, 2000))</sup>.

## 1.4 A MDMA

### 1.4.1 A história da MDMA – MDMA: sinónimo de “ecstasy”?

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; “ecstasy”, “Adam”, “X”, “e”) é um derivado da anfetamina (Figura 1.14).



**Figura 1.14 – Estruturas químicas de MDMA e de anfetaminas relacionadas.**

As anfetaminas são derivadas da feniletilamina, quimicamente relacionada com o composto alucinogénico natural, a mescalina (adaptado de Green et al., 2003<sup>(Green et al., 2003)</sup>).

Originalmente, a MDMA foi sintetizada em 1912, mas apenas nos anos 50 foi considerada como uma droga psicoactiva<sup>(Shulgin and Nichols, 1978; Bernschneider-Reif et al., 2006)</sup>. Desde 1985 que a MDMA é considerada uma droga ilícita, visto que pode apresentar um elevado potencial de abuso, tem potencial neurotóxico e é desprovida de aplicação clínica<sup>(www.usdoj.gov/dea)</sup>.

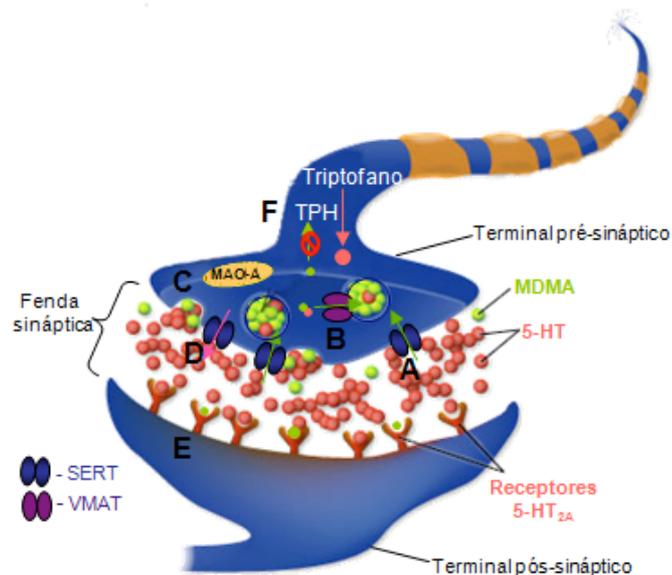
A “ecstasy” é ilicitamente comercializada sob diversas cores, formas e tamanhos ou em pastilhas que são decoradas com as mais variadas imagens ou símbolos<sup>(www.ecstasy.org)</sup>.

Contudo, atendendo a que se trata de uma droga ilícita, é necessário ter presente o grau de pureza das pastilhas de ecstasy utilizadas, uma vez que estas não apresentam exclusivamente MDMA na sua composição (80 a 150 mg de MDMA), contendo também, por vezes, outras substâncias psicoactivas, tais como, cafeína, cetamina e outros compostos relacionados com as anfetaminas<sup>(Green et al., 2003)</sup>. Não obstante estes factos, a ecstasy é uma droga recreativa altamente consumida, maioritariamente, por jovens adultos<sup>(Parrott, 2005)</sup> em festas. Estas festas incluem, principalmente, música “*techno*” (som gerado electronicamente), vídeos gerados por computador e espectáculos com luzes laser, onde os participantes dançam durante toda a noite.

## **1.4.2 A farmacologia da MDMA**

### **1.4.2.1 MDMA – Agonista monoaminérgico indirecto**

Os primeiros estudos sobre a “ecstasy” sugeriram que esta droga causa toxicidade selectiva nos neurónios serotoninérgicos<sup>(Stone et al., 1986)</sup>. Estudos posteriores demonstraram ainda que, no cérebro de rato, a MDMA actua ao nível do sistema monoaminérgico, estimulando o efluxo de serotonina (5-HT) e de dopamina (DA), embora esta em menor extensão<sup>(Johnson et al., 1986; Schmidt et al., 1987; Amato et al., 2007)</sup>. Na figura 1.15, está representado o mecanismo de acção da MDMA, no terminal nervoso serotoninérgico. No entanto, é importante referir que, no homem, ainda não está completamente esclarecido o efeito do consumo de MDMA na libertação de monoaminas.



**Figura 1.15 – Mecanismo de acção da MDMA ao nível do terminal serotoninérgico.**

A MDMA usa os transportadores de serotonina (SERT) para entrar no terminal nervoso, apesar de, em elevadas concentrações, conseguir entrar por difusão (A). Uma vez no interior do terminal nervoso pré-sináptico, a MDMA entra nas vesículas sinápticas através do transportador monoaminérgico (VMAT), induzindo de forma rápida a libertação de serotonina (5-HT) das vesículas para o citosol, possivelmente através de um mecanismo de inversão do transportador (B). Por outro lado, a enzima MAO-A, localizada na membrana mitocondrial externa, é responsável pela degradação da 5-HT, sendo a sua actividade parcialmente inibida pela MDMA (C). Consequentemente, ocorre um aumento do conteúdo citosólico de 5-HT e a MDMA provoca uma rápida libertação de 5-HT para a fenda sináptica através da inversão do transportador SERT (D). Paralelamente, a MDMA liga-se aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> pós-sinápticos (E). Adicionalmente, a MDMA também inibe a enzima hidroxilase do triptofano (TPH), o passo limitante na síntese de 5-HT (F), facto este que terá relevância na reposição dos níveis de 5-HT com o consumo crónico de MDMA (adaptado de <http://learn.genetics.utah.edu>).

No cérebro, a MDMA interage com transportadores vesiculares e membranares<sup>(Berger et al., 1992; Crespi et al., 1997)</sup>. Possivelmente, a MDMA entra nas vesículas através de VMAT, provocando a saída do conteúdo das mesmas (5-HT, DA ou NA), através da inversão do transportador vesicular<sup>(Partilla et al., 2006)</sup>. No que diz respeito aos transportadores membranares de serotonina (SERT), tem sido demonstrado que a activação destes pela MDMA tem um papel crucial na toxicidade que ocorre ao nível dos terminais dos neurónios serotoninérgicos, levando à depleção de 5-HT dos terminais. A administração de inibidores dos SERT confirma este facto, na medida em que a toxicidade serotoninérgica causada pela MDMA é completamente prevenida em áreas como o córtex, o hipocampo e o estriado de rato<sup>(Sanchez et al., 2001)</sup>.

Para além do descrito anteriormente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram ainda que a actividade da monoaminaoxidase A (MAO-A) é parcialmente inibida pela MDMA,

causando, desta maneira, um aumento nos níveis extracelulares das monoaminas<sup>(Yamamoto and Spanos, 1988; Leonardi and Azmitia, 1994; Baumann et al., 2005)</sup>. Estudos realizados em cérebro de ratos confirmam que a inibição da MAO-A potencia a libertação de 5-HT induzida pela MDMA<sup>(Hewton et al., 2007)</sup>. Por outro lado, foi sugerido recentemente que a oxidação das monoaminas pela MAO-B poderá também contribuir para a neurotoxicidade induzida pela MDMA<sup>(Alves et al., 2007)</sup>. A administração de MDMA a ratos também diminui a actividade da triptofano hidroxilase (TPH), a enzima responsável e limitante na síntese de 5-HT, em várias áreas do cérebro, tais como, neo-estriado, hipotálamo, hipocampo e córtex<sup>(Stone et al., 1986; Schmidt and Taylor, 1987; Molliver et al., 1990; O'Shea et al., 2006)</sup>.

#### **1.4.2.2 MDMA – Agonista dos receptores da serotonina tipo 2A**

A MDMA é um agonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub><sup>(Sadzot et al., 1989)</sup> e, relativamente à sua afinidade para estes receptores, apresenta um valor da constante  $K_i$  entre 1 e 10  $\mu\text{M}$ <sup>(Battaglia et al., 1988)</sup>.

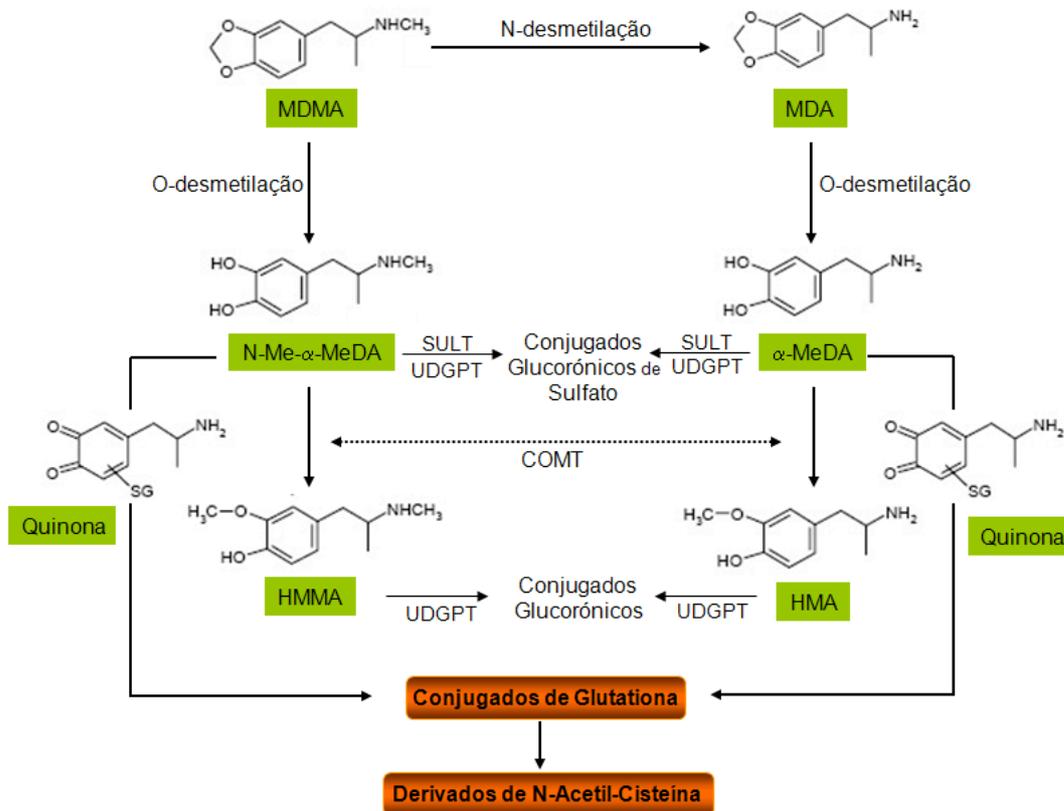
#### **1.4.2.3 MDMA – Farmacocinética**

A MDMA é uma base fraca, de baixo peso molecular, com grupos hidrofóbicos<sup>(de la Torre et al., 2004)</sup>. Estas propriedades permitem-lhe difundir com alguma facilidade, através de membranas celulares. Estudos realizados em humanos sugerem que a concentração máxima ( $C_{\text{max}}$ ) da droga no plasma surge 1,5 a 3 h, após a sua ingestão<sup>(de la Torre et al., 2000)</sup>. O tempo de meia-vida da MDMA no organismo é de 6 a 12 horas e a sua eliminação ocorre, essencialmente, a nível hepático e renal. O metabolismo hepático é a principal via de metabolização da droga, apesar de uma percentagem significativa da mesma permanecer inalterada<sup>(de la Torre et al., 2004)</sup>. Na realidade, a metabolização da MDMA depende da idiosincrasia dos indivíduos, não se baseando numa farmacocinética linear<sup>(de la Torre et al., 2000)</sup>. É também importante salientar que, em casos de consumo repetido de MDMA, as concentrações disponíveis da droga aumentam de forma desproporcional, tendo-se verificado que a MDMA tem capacidade de inibir o seu próprio metabolismo<sup>(Farre et al., 2004)</sup>.

Estas evidências foram também observadas em modelos animais, nomeadamente em ratos. As diferenças na farmacocinética da MDMA entre animais de diferentes estirpes, que estarão, em parte, relacionadas com diferenças nas enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização da MDMA nos animais, também permite justificar as diferenças

observadas entre indivíduos, onde existem vários polimorfismos nas enzimas hepáticas, que poderão reflectir-se em termos de actividade enzimática<sup>(Chu et al., 1996a)</sup>.

Apesar das diferenças entre indivíduos, sexos e estirpes, o metabolismo da MDMA, quer em humanos, quer em ratos, segue um padrão semelhante para ambas as espécies. Na figura 1.16, de forma resumida, estão indicadas as principais vias de metabolização da MDMA.



**Figura 1.16 – Principais vias metabólicas da MDMA.**

A MDMA sofre uma N-desmetilação, dando origem ao composto 3,4-metilenedioxianfetamina (MDA), e também uma O-desmetilação, originando a N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDA). Em ratos, a MDA formada através de N-desmetilação é principal via metabólica, enquanto que em humanos a O-desmetilação predomina. A MDA é O-desmetilada originando  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDA). Ambos os compostos, N-Me- $\alpha$ -MeDA e  $\alpha$ -MeDA sofrem O-metilação originando 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) e 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA), respectivamente. Estas reacções são reguladas pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT - “*catechol-O-methyltransferase*”). N-Me- $\alpha$ -MeDA,  $\alpha$ -MeDA, HMMA e HMA poderão sofrer sulfatação e glucuronidação por acção da sulfotransferase (SULT) e da uridina-difosfato-glucuronil transferase (UDPGT), respectivamente. Por outro lado, a N-Me- $\alpha$ -MeDA e a  $\alpha$ -MeDA poderão sofrer uma oxidação e formar quinonas, que por sua vez se poderão conjugar com a glutatona. Reacções metabólicas posteriores poderão ainda levar à produção de derivados de N-Acetil-Cisteína (adaptado de de la Torre et al., 2004<sup>(de la Torre and Farre, 2004)</sup>).

#### 1.4.2.4 Efeitos agudos da MDMA em modelos animais e no homem

Os efeitos agudos causados pela MDMA em modelos animais, nomeadamente em ratos, murganhos e macacos, inclui, fundamentalmente, hipertermia, hiperactividade e o síndrome serotoninérgico. Este síndrome engloba alterações comportamentais, que

resultam da depleção de 5-HT nos terminais nervosos, entre as quais se destacam o aumento da actividade locomotora, movimentos da cabeça em “zig-zag”, abdução dos membros anteriores e proptoma<sup>(Yamamoto and Spanos, 1988; McNamara et al., 1995; De Souza et al., 1997; Shankaran and Gudelsky, 1999)</sup>. Na realidade, o aumento de temperatura de forma aguda devido à MDMA em modelos animais é um dos poucos efeitos que pode ser directamente comparado com os efeitos observados no homem. Na tabela 1.5, encontram-se descritos, de forma resumida, os principais efeitos agudos detectados em diversos modelos animais e os sintomas clínicos observados no homem, após consumo de “ecstasy”. O consumo excessivo de “ecstasy” poderá conduzir ao colapso cardíaco, falência hepática e renal e mesmo à morte. Casos de morte relacionados com o consumo de “ecstasy” são raros, sobretudo mortes envolvendo somente o consumo exclusivo de MDMA. Contudo, na Europa, no ano de 2005, foram registadas 77 mortes relacionadas com o consumo de “ecstasy”<sup>(Addition, 2006)</sup>.

**Tabela 1.5 – Efeitos agudos e sintomas causados pela administração e/ou consumo de MDMA**

<b>Efeitos agudos</b>	<b>Modelos de estudo</b>	<b>Referências</b>
Hipertermia	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
	Ratos	Broening et al., 1995; Malberg and Seiden, 1998; Green et al., 2005
	Murganhos	Miller and O'Callaghan, 1995; Johnson et al., 2000; Colado et al., 2001
	Coelhos	Blessing and Seaman, 2003; Blessing et al., 2003
	Cobaia	Saadat et al., 2004
	Porco	Fiege et al., 2003
Alteração da actividade locomotora	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
	Macacos	Taffe et al., 2006
	Ratos	Yamamoto and Spanos, 1988; McNamara et al., 1995; De Souza et al., 1997; Shankaran and Gudelsky, 1999
Síndrome serotoninérgico	Ratos	Yamamoto and Spanos, 1988; McNamara et al., 1995; De Souza et al., 1997; Shankaran and Gudelsky, 1999
Taquicardia e arritmia	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
	Ratos	Gordon et al., 1991; O'Cain et al., 2000
Vasoconstrição	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
	Ratos e coelhos	Fitzgerald and Reid, 1994
Alterações psicológicas humor, interacção social, euforia, tremores	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
Naúseas, suores e espasmos	Homem	Cohen and Cocores, 1997; Vollenweider et al., 1998; Liechti and Vollenweider, 2000
Alterações neuroendócrinas	Homem	Henry et al., 1998; de la Torre et al., 2000

### 1.4.3 Efeitos crónicos da MDMA – Neurotoxicidade

#### 1.4.3.1 Neurotoxicidade induzida por MDMA – evidências em modelos animais e humanos

A toxicidade da MDMA e dos seus metabolitos em neurónios serotoninérgicos foi demonstrada há mais de duas décadas<sup>(Ricaurte et al., 1985; Schmidt et al., 1986)</sup>. O consumo crónico da MDMA diminui os níveis intracelulares de 5-HT e do seu principal metabolito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), e diminui o número de SERT<sup>(Schmidt and Taylor, 1987; Itzhak et al., 2003; O'Shea et al., 2006)</sup>. Outros estudos têm demonstrado que o sistema dopaminérgico também é afectado<sup>(Stone et al., 1987; O'Callaghan and Miller, 1994; Colado et al., 2001; Colado et al., 2004)</sup>.

A Tabela 1.6 resume os efeitos neurotóxicos da MDMA, detectados em diferentes modelos experimentais animais e em humanos.

#### 1.4.3.2 Neurotoxicidade induzida por MDMA – mecanismos de neurotoxicidade

##### 1.4.3.2.1 Hipertermia

As anfetaminas, incluindo a MDMA, são conhecidas por causar hipertermia<sup>(Gordon et al., 1991; Dafters, 1995; Dafters and Lynch, 1998)</sup>. Na realidade, uma das principais causas da toxicidade em humanos provocada pela MDMA é a elevação da temperatura corporal, podendo atingir-se temperaturas de 43°C<sup>(Green et al., 2003; Capela et al., 2006b)</sup>. Este facto é de uma grande importância, uma vez que a MDMA é, normalmente, consumida em locais onde a temperatura ambiente é geralmente elevada, o que poderá exacerbar o efeito de toxicidade da MDMA.

Malberg e Seiden<sup>(Malberg and Seiden, 1998)</sup> demonstraram a importância da temperatura ambiente na depleção crónica de 5-HT e 5-HIAA, após a administração de MDMA. Diminuições do conteúdo de 5-HT e do seu principal metabolito (5-HIAA) não foram observadas em nenhuma área cerebral, em ambientes cujas temperaturas variaram entre os 20-24°C. Todavia, para temperaturas ambientes de 26°C ou superiores, a depleção de 5-HT e 5-HIAA é significativa. Assim, pode afirmar-se que pequenos aumentos na temperatura ambiente são suficientes para causar efeitos tóxicos significativamente maiores no sistema serotoninérgico<sup>(Malberg and Seiden, 1998)</sup>. A hipertermia tem sido ainda associada ao aumento do efluxo de DA e 5-HT no estriado e núcleo *accumbens* de rato<sup>(O'Shea et al., 2005)</sup>.

Existem evidências de que a MDMA também provoca uma disfunção na regulação

da temperatura, uma vez que ratos expostos a MDMA a temperaturas ambientais acima de 24°C apresentam hipertermia, enquanto que ratos em ambientes com temperatura de 10°C apresentam hipotermia<sup>(Gordon et al., 1991)</sup>.

**Tabela 1.6** – Efeitos neurotóxicos da MDMA em diferentes modelos experimentais animais e em humanos

	Espécie	Marcador de neurodegeneração e/ou áreas do cérebro afectadas	
<b>In Vitro</b>	Rato	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apoptose em culturas de neurónios neo-corticais<sup>(Stumm et al., 1999)</sup> e corticais<sup>(Capela et al., 2006b; Cunha-Oliveira et al., 2006; Warren et al., 2006)</sup>, culturas de células granulares de cerebelo<sup>(Jimenez et al., 2004)</sup>, hepatócitos<sup>(Montiel-Duarte et al., 2002)</sup>, e em células PC12<sup>(Milhazes et al., 2006)</sup>.</li> </ul>	
	Cultura de células	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apoptose em neurónios serotoninérgicos<sup>(Simantov and Tauber, 1997)</sup>.</li> </ul>	
<b>In vivo/ Ex vivo</b>	Murganhos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redução do conteúdo de 5-HT no estriado e hipocampo, de DAT no estriado e de SERT no córtex<sup>(Itzhak et al., 2003)</sup>.</li> <li>Activação de microglia<sup>(Thomas et al., 2004)</sup>.</li> </ul>	
	Ratos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redução dos níveis de 5-HT, 5-HIAA e SERT no neo-córtex, estriado e hipocampo; e da actividade da TPH no estriado, hipocampo, hipotálamo e córtex<sup>(Stone et al., 1986; Schmidt and Taylor, 1987; Molliver et al., 1990; O'Shea et al., 2006)</sup>.</li> <li>Redução na marcação para 5-HT, SERT e TPH no neo-córtex, estriado, tálamo, hipocampo, septo e amígdala<sup>(O'Hearn et al., 1988; Xie et al., 2006)</sup>.</li> <li>Redução da densidade de receptores 5-HT<sub>2A</sub> no córtex<sup>(Reneman et al., 2002)</sup>.</li> <li>Degeneração neuronal no córtex parietal, córtex insular/<i>perirhinal</i>, tálamo ventromediano/ventrolateral, <i>tenia tecta</i> e sistema límbico<sup>(Commins et al., 1987; Schmued, 2003; Armstrong and Noguchi, 2004; Meyer et al., 2004; Tamburini et al., 2006)</sup>.</li> <li>Imunorreactividade para a caspase-3 em áreas do córtex<sup>(Meyer et al., 2004)</sup>.</li> <li>Activação de células da macro- e da microglia na região CA1 do hipocampo<sup>(Adori et al., 2006)</sup>; hipotálamo e córtex<sup>(Orio et al., 2004)</sup>.</li> <li>Diminuição da actividade da glutatona peroxidase (GPx) e do conteúdo de glutatona (GSH) na retina<sup>(Mirañda et al., 2007)</sup>.</li> <li>Risco de efeitos prejudiciais na aprendizagem e memória quando ocorre exposição pré-natal a MDMA<sup>(Broening et al., 1994; Koprach et al., 2003; Galigneau et al., 2005)</sup>.</li> </ul>	
		Estudos comportamentais	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disfunções crónicas ao nível da memória e aprendizagem, alucinações visuais, ataques de pânico, depressão, impulsividade<sup>(Creighton et al., 1991; McCann et al., 1996; Quednow et al., 2006)</sup>.</li> <li>Risco de defeitos congénitos para os fetos com exposição a MDMA<sup>(McElhatton et al., 1999; Ho et al., 2001)</sup>.</li> </ul>
		Estudos <i>post mortem</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redução de 5-HT no estriado e de 5-HIAA no cérebro<sup>(Kish et al., 2000)</sup>.</li> <li>Redução da densidade e actividade de SERT em cérebro<sup>(McCann et al., 1998; Buchert et al., 2003; Buchert et al., 2004; McCann et al., 2005)</sup>.</li> </ul>

### 1.4.3.2.2 A importância do metabolismo da MDMA na sua toxicidade

No sentido de tentar esclarecer se é a presença de MDMA ou dos seus metabolitos que desencadeiam o processo de toxicidade no cérebro, realizaram-se estudos nos quais se administrou MDMA, MDA, N-Me- $\alpha$ -MeDA e  $\alpha$ -MeDA directamente no cérebro, tendo-se demonstrado que, apesar de ocorrer um aumento de libertação de 5-HT, não se detecta toxicidade serotoninérgica (Paris and Cunningham, 1992; Esteban et al., 2001a). Estes resultados sugerem que o metabolismo sistémico é necessário para produzir compostos intermediários sucessivamente mais reactivos que os compostos originais que, por sua vez, induzem a formação de radicais livres e, em consequência, neurotoxicidade no cérebro (Esteban et al., 2001a; de la Torre and Farre, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos com os metabolitos N-Me- $\alpha$ -MeDA e  $\alpha$ -MeDA. Caso sejam administrados directamente no cérebro, não causam toxicidade. Contudo, se os metabolitos forem administrados perifericamente, ocorre neurotoxicidade (Miller et al., 1996). Assim, os metabolitos da MDMA e MDA, que incluem orto-quinonas, conjugados de glutationa e derivados de N-Acetil-Cisteína (NAC), que são potencialmente neurotóxicos (Monks and Lau, 1997; Jones et al., 2005), poderão ter um papel importante na toxicidade causada pela MDMA. A tabela 1.7 resume alguns dos estudos realizados em modelos animais com metabolitos da MDMA.

Tabela 1.7 – Efeito dos metabolitos da MDMA em modelos animais.

<b>Estudos In vivo</b>	Injecções ICV de 5-(NAC)- $\alpha$ -MeDA e 5-(GSH)- $\alpha$ -MeDA causam alterações de comportamento e aumentam os níveis de 5-HT e DA (Miller et al., 1996).
	Injecções de 5-(NAC)- $\alpha$ -MeDA e 5-(GSH)- $\alpha$ -MeDA no estriado, córtex e hipocampo causam alterações comportamentais e uma diminuição prolongada de 5-HT (Bai et al., 1999).
	A administração de 2,5-(GSH)- $\alpha$ -MeDA reduz os níveis de 5-HT no estriado, hipocampo e córtex (Miller et al., 1997).
	A aplicação de 5-(NAC)-N-Me- $\alpha$ -MeDA produz alterações agudas de comportamento e outros conjugados de tio-éster da $\alpha$ -MeDA diminuem as concentrações de 5-HT e 5-HIA no estriado e córtex (Jones et al., 2005).
<b>Estudos In vitro</b>	Os metabolitos da MDMA causam morte celular em culturas de células PC12 (Milhazes et al., 2006), neurónios corticais (Capela et al., 2006a) e de hipocampo (Capela et al., 2006b), células cardíacas (Carvalho et al., 2004) e hepatócitos (Hiramatsu et al., 1990).

#### **1.4.4 A MDMA na retina**

Pouco se conhece acerca do efeito da MDMA no olho e, mais em particular, na retina. Uma vez que a retina é um tecido nervoso, será de prever que os danos causados em consequência de uma exposição a MDMA serão semelhantes aos registados em outras áreas do cérebro.

Existem alguns estudos *post mortem* que demonstram a presença de MDMA e MDA em estruturas oculares, nomeadamente nas paredes do globo ocular e no humor vítreo que está em contacto com a retina<sup>(De Letter et al., 2002a)</sup>. As concentrações de MDMA detectadas no humor vítreo são próximas dos níveis detectados no sangue *ante-mortem*. As concentrações de fármacos no humor vítreo são muito mais estáveis do que no sangue, tornando-se, assim, mais representativas dos níveis presentes no sangue *ante-mortem*<sup>(De Letter et al., 2000)</sup>. No entanto, existe apenas um trabalho, muito recente, que demonstra que a administração de MDMA a ratos induz stresse oxidativo na retina<sup>(Miranda et al., 2007)</sup>. A MDMA diminuiu a concentração de glutathione (GSH) e reduziu a actividade da glutathione peroxidase (GPx), na retina. Além disso, aumentou o número de células apoptóticas na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares. Assim, uma vez que os efeitos da MDMA na retina são largamente desconhecidos, será extremamente importante avaliar os danos potenciais desta droga de abuso na retina.

##### **1.4.4.1 Evidências de toxicidade da MDMA na retina - casos clínicos**

Existem poucos relatos sobre o efeito da MDMA no sistema visual. Contudo, são frequentes as descrições, por parte dos consumidores de “ecstasy”, de disfunções da percepção visual e visões persistentes<sup>(Creighton et al., 1991; Passie et al., 2002)</sup>. Existem evidências clínicas que demonstram que o consumo de MDMA poderá ter consequências graves a nível visual, apesar de alguns autores sugerirem que essas ocorrências poderão não estar relacionadas com drogas de abuso<sup>(Firth, 2006)</sup>. Existe um caso em que foi relatada a ocorrência de uma hemorragia retiniana, na zona da mácula, no olho esquerdo de uma mulher de 22 anos, após a ingestão de “ecstasy”<sup>(Jacks and Hykin, 1998)</sup>. Outro estudo relata sintomas de visão central pouco nítida, no olho direito, num homem de 30 anos, após consumo de várias doses de “ecstasy”<sup>(Michael et al., 2003)</sup>.

#### **1.4.4.2 A Serotonina e os Receptores Serotoninérgicos na retina**

Os níveis de 5-HT na retina de mamíferos são muito baixos. No entanto, existem evidências que indicam que a 5-HT pode actuar na retina como neurotransmissor e neuromodulador<sup>(Pootanakit and Brunken, 2001)</sup>. De facto, alguns subtipos de receptores da 5-HT estão presentes na retina de alguns modelos experimentais. O receptor 5-HT<sub>1A</sub> é expresso na retina de peixe dourado<sup>(Lima et al., 1994)</sup>, coelho<sup>(Chidlow et al., 1998)</sup> e rato<sup>(Pootanakit and Brunken, 2000)</sup>. O ARNm dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> foi detectado na retina de coelho, nos fotorreceptores e nas células bipolares<sup>(Pootanakit et al., 1999)</sup>. Mais recentemente, detectou-se ARNm dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, nos corpos celulares de neurónios presentes na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares<sup>(Perez-Leon et al., 2004)</sup>. Os receptores 5-HT<sub>3</sub> foram detectados na retina humana e, também, nas retinas de rato e coelho. As isoformas A e B destes receptores foram detectadas nos terminais dos fotorreceptores<sup>(Pootanakit and Brunken, 2001)</sup>. O ARNm dos receptores 5-HT<sub>7</sub> foi detectado em retinas de coelho e rato<sup>(Chidlow et al., 1998)</sup>.

A acrescentar a estes factos, existem alguns estudos que demonstram que a activação dos receptores de serotonina modula a libertação de neurotransmissores na retina. O receptor 5-HT<sub>2A</sub> modula a libertação de dopamina e GABA, na retina de coelho<sup>(Neal et al., 2001)</sup>. Também se demonstrou que os receptores 5HT<sub>2</sub> e 5HT<sub>3</sub> modulam a transmissão de sinal nas células bipolares<sup>(Brunken and Jin, 1993)</sup>.

## **1.5 Objectivos do trabalho**

Na retina, o NPY foi detectado em diferentes tipos de células, nomeadamente em células amácrinas e ganglionares<sup>(Straznicky and Hiscock, 1989; Jen et al., 1994; Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002)</sup>. As funções do NPY na retina ainda estão muito pouco esclarecidas. Todavia, alguns estudos indicam que o NPY é libertado da retina, após estimulação com luz de elevada frequência, ou por despolarização, participa em múltiplos circuitos do processo de informação visual e modula a libertação de neurotransmissores<sup>(Bruun et al., 1991; Sinclair et al., 2004)</sup>. A acrescentar, foi identificado um polimorfismo no gene do NPY que confere uma predisposição para o desenvolvimento de retinopatia diabética. Assim, os objectivos desta tese foram os seguintes:

- 1) Identificar a presença de NPY e dos receptores do NPY na retina de rato e, em particular, em diferentes tipos de células da retina de rato em cultura. Para tal, utilizaram-se retinas, culturas primárias mistas de retina de rato e culturas de células de microglia e linhas celulares de células de Müller e de células endoteliais.
- 2) Uma vez que o NPY é um neuromodulador e a regulação da  $[Ca^{2+}]_i$  tem um papel central na fisiologia celular, investigou-se o papel do NPY e dos seus receptores na regulação das alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  em neurónios da retina.
- 3) Várias evidências demonstram que o NPY regula a proliferação de diversos tipos de células. Neste contexto, investigou-se o papel do NPY e dos seus receptores na proliferação de células da retina e procurou-se esclarecer os mecanismos de sinalização intracelular acoplados à activação dos receptores do NPY envolvidos na proliferação celular, mais particularmente as vias de sinalização que envolvem o NO e as ERK 1/2.
- 4) Por último, considerando que o NPY exerce efeitos neuroprotectores significativos no SNC e que a MDMA causa neurotoxicidade, investigou-se o efeito neurotóxico da MDMA em células da retina e o potencial papel neuroprotector do NPY, avaliando-se o tipo de células da retina mais susceptíveis ao efeito neurotóxico da MDMA e o tipo de morte celular.







## **Capítulo 2**

### **Materiais e Métodos**



## **2.1 Materiais**

O Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), o Meio Essencial Mínimo de Eagle Modificado (DMEM)/F-12 HAM, DMEM 31600, 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), éster metílico de L-nitroarginina (L-NAME), inibidor da MEK 1/2 (U0126), reagente de Trizol (Trizol), dietilpirocarbonato (DEPC), brometo de 2,5-difeniltetrazólio-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) (MTT), iodeto de propídeo (PI), azul de tripano, fluoreto de fenilmetilsufonilo (PMSF), quimostatina, leupetina, antiparina, pepstatina A (CLAP), ditioneitol (DTT), brometo de etídio e os anticorpos primários anti-murganho, anti-GFAP e anti-MAP-2 (proteína-2 associada aos microtúbulos) foram adquiridos à Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA. A tripsina, a penicilina, a estreptomicina e *kit* de amplificação de ELISA (*Immunoselect Kit*), foram obtidas da GIBCO BRL, Life Technologies, Escócia. O 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-ona (ODQ) e o antagonista do receptor Y<sub>5</sub> do NPY, L-152,804, foram adquiridos à Tocris, Bristol, Reino Unido. As membranas de polivinildieno (PVD), a solução de quimiofluorescência melhorada (ECF) e a Taq® da ADN polimerase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, Inglaterra. Outros reagentes utilizados em *Western Blot* foram adquiridos à BioRad, Hercules, EUA. As sequências de nucleótidos (*primers*) utilizados foram fornecidas pela MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemanha. O *kit* de síntese de ADNc (*1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR*) foi adquirido à Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EUA. O Neuropeptídeo Y e os agonistas dos receptores do NPY utilizados, NPY<sub>13-36</sub>, [Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>36</sup>]NPY, NPY (19-23)-(Gly<sup>1</sup>,Ser<sup>3</sup>,Gln<sup>4</sup>,Thr<sup>6</sup>,Ala<sup>31</sup>,Aib<sup>32</sup>,Gln<sup>34</sup>)-PP e r-PP foram adquiridos à Bachem, Bubendorf, Suíça. Os antagonistas dos receptores do NPY, BIBP 3226 e BIIE 0246 foram obtidos dos Laboratórios Peninsula, Belmont, CA, EUA e da Boehringer Ingelheim Pharma, Alemanha, respectivamente. O soro fetal bovino (FBS) foi adquirido à Biochrom, Berlim, Alemanha. O anticorpo primário anti-BrdU foi adquirido à Oxford Biotechnology, Raleigh, NC, EUA. O anticorpo primário anti-caspase-3 foi obtido da Cell Signalling, Danvers, MA, EUA. Os anticorpos primários, anti-antigénio CD 68 (ED1) e o anti-antigénio-1 do macrófago (Mac-1) foram fornecidos pela Serotec, Raleigh, NC, EUA. O meio de montagem e o anticorpo primário GFAP anti-coelho foram obtidos da Dako Cytomation, DK-2600 Glostrup, Dinamarca. O anticorpo anti-MAP-2 anti-coelho foi obtido na Chemicon International, Hampshire, Reino Unido. O anticorpo anti-nestina foi adquirido à BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EUA. O anticorpo anti-TUJ 1 (β-3-tubulina) foi obtido da Covance Research Products Inc, Berkeley, CA, EUA. Os anticorpos primários anti-NPY05 e

anti-NPY02 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Eric Grouzmann do Centro Hospitalar Universitário Vaudois, Lausanne, Suíça. Os anticorpos primários, na forma fosforilada (ERK 1/2-fosf) e na forma total ERK 1/2, foram obtidos à Promega Corporation, Madison, WI, EUA. O Fura-2/AM, o Pluronic F-127, o Hoescht 33342 e os anticorpos secundários (Imunoglobulina G; IgG), produzidos em cabra, anti-murganho conjugado com o fluoróforo Alexa-Fluor 488 ou com Alexa-Fluor 594, anti-rato conjugado com Alexa-Fluor 594, anti-coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 ou com Alexa-Fluor 594, foram adquiridos à Molecular Probes, Leiden, Holanda. A albumina de soro bovino (BSA) foi obtida da Calbiochem-Boehringer, San Diego, CA, EUA. A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA; ecstasy) foi gentilmente cedida pelo Dr. Félix Carvalho do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Todos os restantes reagentes foram obtidos da Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA.

As soluções de Fura-2/AM e de Pluronic F-127 foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO). A solução do antagonista do receptor  $Y_1$  do NPY, BIBP 3226, foi preparada em metanol, e a solução de BIIE 0246, antagonista do receptor  $Y_2$  do NPY, em 30% de DMSO. As soluções dos restantes reagentes foram preparadas em água ultra-pura.

## 2.2 Animais

Todo o trabalho que envolveu animais foi realizado de forma a minimizar a dor e o sofrimento dos mesmos, de acordo com as normas estabelecidas pelas comissões de ética para o uso de animais de laboratório pela Associação para a Investigação em Visão e Oftalmologia (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*; ARVO). Os ratos da estirpe Wistar foram mantidos no biotério em ciclo claro – escuro, de 12 em 12 horas, com comida e água *ad libitum*.

## 2.3 Modelos celulares

### 2.3.1 Cultura primária de células da retina de rato

As células da retina foram isoladas de ratos Wistar com 3 a 5 dias de idade. Os animais foram sacrificados por decapitação, os olhos foram enucleados e colocados numa caixa de cultura, contendo uma solução sem  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (solução CMF-*calcium and*

*magnesium free*)<sup>1</sup>. Com o auxílio de uma lupa binocular e de uma fonte de luz, as retinas foram dissecadas em condições estéreis. Posteriormente, as retinas foram transferidas para uma solução CMF contendo tripsina 0,1% (m/v) e incubadas, durante 15 minutos, a 37°C. No fim desse período, o tecido foi centrifugado a 130 x g, durante um minuto (Centrífuga Sorval RT 6000B). Depois de se eliminar o sobrenadante, adicionou-se MEM suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e FBS inativado pelo calor (10% v/v), tamponizado com 25 mM de HEPES e 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, e as células da retina foram dissociadas mecanicamente, pipetando o sedimento 10 a 14 vezes, com uma pipeta de 5 mL. Em seguida, contaram-se as células viáveis num hemocítmetro, através do teste de Azul de Tripano (0,4%), que permite identificar as células não viáveis. Após uma diluição apropriada, as células foram cultivadas com uma densidade de 2x10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup> em lamelas de vidro de 16 mm de diâmetro, previamente colocadas em caixas de cultura com 12 ou 24 poços, ou em caixas de cultura de 35 mm ou 60 mm de diâmetro, dependendo da finalidade das experiências a realizar. Em todos os casos, as lamelas e as caixas de cultura foram previamente revestidas com poli-D-lisina (0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas, durante 9 dias, a 37°C, sob atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3.2 Cultura primária de microglia da retina de rato**

As culturas primárias de microglia da retina de rato foram isoladas a partir de ratos Wistar, com 3 a 5 dias de idade, como descrito anteriormente por Wang *et al.* (2005)<sup>(Wang et al., 2005)</sup>, com algumas alterações. Tal como descrito no ponto 2.3.1, para a preparação de culturas primárias da retina de rato, as retinas foram dissecadas em CMF, sob condições estéreis, com o auxílio de uma lupa. De seguida, procedeu-se à digestão enzimática das retinas, numa solução de CMF suplementada com tripsina 0,1% (m/v) e DNase 0,001% (m/v), durante 15 minutos, a 37°C. Após a dissociação mecânica das células da retina com uma pipeta de 5 mL, a tripsina foi inativada com 10% (v/v) de FBS, previamente inativado pelo calor, e as células foram sedimentadas por centrifugação a 130 x g, durante um minuto. As células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM/F-12 HAM, suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e FBS inativado pelo calor (10% v/v), tamponizado com 25 mM de HEPES e 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4. De seguida, após contagem das células viáveis, através do teste de Azul de Tripano (0,4%), as

<sup>1</sup> **CMF**: 137 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 0,45 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,34 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM de glicose, pH 7,4.

células foram cultivadas em frascos de cultura de plástico de 75 cm<sup>2</sup> de superfície, previamente revestidos com poli-D-lisina (0,1 mg/mL), com uma densidade de 1,5x10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup>. As células da retina de rato foram mantidas em cultura a 37°C, sob atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, e o meio foi substituído de 3 em 3 dias. Após duas semanas, as microglias foram destacadas, por agitação, dos frascos de cultura a 150 r.p.m., durante 30 min, utilizando um meio de cultura novo, contendo soro, após lavagem das células. As células da microglia em suspensão foram cultivadas em lamelas de vidro de 16 mm revestidas com poli-D-lisina (0,1 mg/mL), com uma densidade de 2,5x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>.

### **2.3.3 Cultura de células endoteliais da retina de rato (linha celular TR-iBRB2)**

A linha celular TR-iBRB2, de células endoteliais da retina de rato, é uma linha celular condicionalmente imortalizada, obtida de células endoteliais de capilares retinianos de ratos transgênicos ts SV 40 (*Conditionally Immortalized Retinal Capillary Endothelial Cell Line* - TR-iBRB - *Transgenic Rat-inner Blood-Retinal Barrier*). Esta linha celular expressa um gene do antígeno da proteína T do vírus SV 40 sensível à temperatura (*Temperature-sensitive SV 40 large T-antigen gene*), cujo peso molecular é de 94 kDa, que se torna inativo a 37°C<sup>(Hosoya et al., 2001)</sup> e, assim, a temperatura ótima de proliferação é de 33°C. Esta linha celular apresenta uma taxa de crescimento estável, sendo o seu tempo de duplicação celular de 19 h a 21h.

As células foram cultivadas em DMEM (DMEM 31600), suplementado com 4 mM de glutamina, 17,9 mM de bicarbonato de sódio, 111,65 unidades/mL de benzilpenicilina de potássio, 0,1 mg/mL de estreptomicina de sulfato e 10% FBS (v/v) inativado pelo calor, em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> revestidos com colagénio (0,5 mg/mL). A cultura foi mantida a 33°C, sob uma atmosfera de 95% ar/5%CO<sub>2</sub>, durante 2-4 dias, até alcançar uma confluência de 80-90%. Após esta fase, as células foram destacadas e dissociadas, através de um processo de tripsinização suave. A acção da tripsina foi inibida através da adição de DMEM com 10% (v/v) de FBS. As células viáveis foram contadas, utilizando o método de exclusão de Azul de Tripano e, posteriormente, foram colocadas em caixas de cultura com 6 poços, com uma densidade de 250 células/cm<sup>2</sup>, e mantidas a 33°C, durante 7 dias.

### **2.3.4 Cultura de células de Müller da retina de rato (linha celular TR-MUL)**

As células de Müller foram obtidas a partir da linha celular condicionalmente imortalizada de células de Müller da retina de ratos transgênicos ts A58 Tg. Esta linha celular, tal como descrito no ponto 2.3.3, expressa um gene do antígeno da proteína T do vírus SV e, portanto, as condições de cultura destas células são semelhantes às condições de cultura utilizadas para as células endoteliais TR-iBRB2, com exceção do meio de cultura utilizado, DMEM com elevada glicose (4500 mg/mL). Por outro lado, em contraste com a taxa de crescimento das TR-iBRB, esta linha celular apresenta um tempo de duplicação celular de 30h<sup>(Masatoshi Tomi, 2003)</sup>.

## **2.4 Experiências de libertação de NPY em culturas primárias de retina**

As experiências de libertação de NPY de células da retina em cultura foram realizadas utilizando células cultivadas em caixas de cultura de 60 mm de diâmetro, com 3 milhões de células/cm<sup>2</sup>. Determinou-se a quantidade de NPY libertado durante 10 minutos, na ausência ou na presença do agente despolarizante cloreto de potássio (KCl, 50 mM).

Após 9 dias em cultura, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de Krebs<sup>1</sup> e colocadas durante 20 minutos com o mesmo tampão e, posteriormente, incubadas na presença de 50 mM de KCl. Após 10 minutos, o meio foi recolhido e transferido para tubos Eppendorf mantidos em gelo e, posteriormente, centrifugado (1000 x g; 7 minutos; 4 °C; Eppendorf 5415R), para eliminar células ou resíduos celulares que tenham sido recuperadas juntamente com o meio de incubação. Para o doseamento de NPY, o meio de incubação foi colocado em tubos Polysorp (Nunc<sup>®</sup>), contendo 5% de Tween 20 (v/v) e 0,03 M de EDTA. No final da experiência, para se dosear o conteúdo intracelular de NPY, as células de cada poço foram raspadas, utilizando tampão Krebs, contendo 0,08% de Tween 20 e 50 mM de EDTA. A suspensão celular foi congelada a -20 °C. Antes de se realizar o doseamento de NPY, as amostras foram descongeladas, sonicadas (6 pulsos de amplitude 50, durante 2 segundos cada pulso; Sonics e Materials, Danbury, EUA) e centrifugadas a 16 000 x g, durante 8 minutos, a 4 °C.

---

<sup>1</sup> **Tampão de Krebs:** 132 mM de NaCl; 4 mM de KCl; 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de CaCl<sub>2</sub>; 10 mM de glicose; 10 mM de HEPES, suplementado com 0,001% de Tween 20, pH 7,4.

### 2.4.1 Doseamento do NPY

Para determinar a concentração de NPY, utilizou-se um método de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*; ensaio imunoenzimático), com dois anticorpos (NPY02 e NPY05), como descrito por Grouzmann *et al.* (1992), com algumas modificações<sup>(Grouzmann et al., 1992)</sup>. Cada poço de microplaca de 96 poços (Polysorp, Nunc®) foi revestido com 130 ng (100 µl) do anticorpo monoclonal NPY02, diluído em 50 mM de tampão Tris, pH 7,5, durante 16 h a 4 °C. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com tampão Tris-Tween (50 mM de Tris, 0,08% de Tween 20, pH 7,5) e, posteriormente, foram revestidos com 200 µl de uma solução 5% de leite desnatado em tampão Tris-Tween. Após 4 lavagens com o tampão Tris-Tween, foram adicionados 100 µl das soluções padrão de NPY (curva de calibração) e as respectivas amostras a analisar, seguindo-se um período de incubação de 16 horas, à temperatura ambiente, sob agitação suave. Após 4 lavagens com tampão Tris-Tween, adicionou-se o segundo anticorpo, NPY05 (100 µl, 6 µg/mL), ligado à fosfatase alcalina, e procedeu-se a uma incubação, durante 7 horas, à temperatura ambiente. Após 2 lavagens com tampão Tris com 0,25% de Tween 20 e 2 lavagens com tampão Tris com 0,88% de NaCl, adicionaram-se 50 µl de substrato (solução de NADPH do *kit* de amplificação de ELISA) a cada poço. Após 45 minutos de incubação, adicionaram-se 50 µl do amplificador (mistura de desidrogenase do etanol e diaforase; *kit* de amplificação de ELISA) e a leitura de densidade óptica foi determinada a 492 nm (SLT spectra II). O limite de detecção foi de 0,5 pM.

### 2.5 Imunocitoquímica

As células foram lavadas três vezes num tampão salino de fosfato (PBS – *phosphate buffered saline*)<sup>1</sup> a 37° C, depois do meio de cultura ser aspirado. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído (4% paraformaldeído, 4% sacarose, em PBS), durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes, à temperatura ambiente, com PBS. No caso das experiências de avaliação da proliferação celular, as células foram sujeitas, nesta fase da experiência, a um processo de desnaturação do ADN, utilizando HCl 1 M durante 30 minutos, a 37°C, seguindo-se 3 lavagens com PBS. De seguida, procedeu-se à permeabilização das células, utilizando uma solução de Triton X-100 (0,2%) em PBS, durante 5 minutos, também à temperatura ambiente, assim como todos os passos seguintes. Para bloquear ligações inespecíficas do

---

<sup>1</sup>PBS: 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

anticorpo primário, as células foram incubadas com 3% de BSA e 0,2% de Tween em PBS (PBS-TB), durante 60 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de anticorpo primário diluído em PBS-TB, durante 90 minutos. Todos os anticorpos primários utilizados nas diversas experiências de imunocitoquímica estão indicados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Lista de anticorpos primários utilizados nas experiências de imunocitoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem animal</b>	<b>Diluição</b>
Anti-BrdU	Rato	1:50
Anti-Caspase-3 activa (Asp 175)	Coelho	1: 500
Anti-antígeno CD 28 (ED1)	Murganho	1:200
Anti-GFAP	Murganho	1:500
	Coelho	1:400
Anti-antígeno-1 do macrófago (Mac-1)	Rato	1:500
Anti-MAP-2	Murganho	1:500
	Coelho	1:500
Anti-Nestina	Murganho	1:300
Anti-NPY 05	Murganho	1:1000
Anti-NPY 02	Murganho	1:1000
Anti- $\beta$ -3-tubulina (TUJ 1)	Murganho	1:500

Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes, durante 5 minutos de cada vez, e incubadas, durante 60 minutos, com uma solução de anticorpo secundário, também diluído em PBS-TB (os anticorpos secundários utilizados são policlonais, com especificidade para o animal no qual o anticorpo primário é produzido), conjugado a um fluoróforo [cabra anti-murganho, conjugado com o fluoróforo Alexa-Fluor 488 (1:200) ou Alexa-Fluor 594 (1:200); cabra anti-rato conjugado com Alexa-Fluor 594 (1:150); cabra anti-coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 (1:200) ou com Alexa-Fluor 594

(1:200)], que permitiu a posterior visualização da marcação (imunoreactividade) por microscopia de fluorescência. Por último, após lavagem de 5 minutos em PBS, os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (1 µg/mL em PBS), durante 5 minutos e, após duas lavagens em PBS, as lamelas foram montadas em lâminas de vidro, utilizando meio de montagem. As células foram visualizadas com um microscópio de fluorescência Zeiss Axioshop 2 Plus (Carl Zeiss, Inc.), adquiridas com uma câmara digital Cool Snap HQ (Roper Scientific, Tucson), e as imagens foram guardadas em formato “.zvi” com uma resolução de 1388x1040 pixels. Depois das imagens terem sido convertidas para formato “.jpg”, com uma resolução de 1388x1040 pixels, foram analisadas usando o Adobe Photoshop CS 8.0 (Adobe Systems Inc.).

### 2.5.1 Avaliação da proliferação celular por incorporação de BrdU

A proliferação celular foi avaliada pela incorporação do composto BrdU no ácido desoxirribonucleico (ADN) das células em cultura em divisão, uma vez que este composto é um análogo da timidina. Ao sétimo dia de cultura (48 horas antes de se fixarem as células), adicionou-se NPY (1-1000 nM), agonistas e/ou antagonistas dos receptores do NPY ao meio de cultura (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2** Agonistas e antagonistas de receptores do neuropeptídeo Y

<b>Fármaco</b>	<b>Concentração</b>
Agonista do receptor Y <sub>2</sub> (NPY <sub>13-36</sub> ; )	100 nM
Agonista do receptor Y <sub>4</sub> (r-PP)	100 nM
Agonista do receptor Y <sub>5</sub> (NPY <sub>19-23</sub> (Gly <sup>1</sup> ,Ser <sup>3</sup> ,Gln <sup>4</sup> ,Thr <sup>6</sup> ,Ala <sup>31</sup> ,Aib <sup>32</sup> Gln <sup>34</sup> )PP)	100 nM
Antagonista do receptor Y <sub>1</sub> (BIBP 3226)	1000 nM
Antagonista do receptor Y <sub>2</sub> (BIIE 0246)	1000 nM
Antagonista do receptor Y <sub>5</sub> (L-152,804 )	1000 nM

O efeito do inibidor da sintase do monóxido de azoto (NOS), L-NAME (éster metílico de L-nitroarginina), do inibidor da guanilil ciclase, ODQ (1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-ona) e do inibidor MEK 1/2, U0126 (1 µM), também foi estudado. Em todas as condições testadas, a proliferação celular foi avaliada pela adição de BrdU (10 µM) ao meio de cultura, 16 horas antes de se fixarem as células. Durante este período, as células que sofrerem mitose irão incorporar o BrdU, que será detectado por imunocitoquímica, através da utilização do anticorpo anti-BrdU (tabela 2.1). Após a imunocitoquímica (detalhes referidos na secção anterior), as células foram visualizadas com um microscópio de fluorescência Zeiss Axioshop 2 Plus (Carl Zeiss, Inc.), adquiridas com uma câmara digital Cool Snap HQ (Roper Scientific, Tucson), e as imagens foram guardadas em formato “.zvi”, com uma resolução de 1388x1040 pixels. Depois das imagens terem sido convertidas para formato “.jpg”, com uma resolução de 1388x1040 pixels, foram analisadas usando o Adobe Photoshop CS 8.0 (Adobe Systems Inc.).

## **2.6 Extracção de ARN e Reacção de Polimerização em Cadeia com Transcrição Reversa “Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR)**

O ácido ribonucleico (ARN) total foi extraído a partir de culturas celulares ou amostras de tecido, usando o reagente Trizol, de acordo com o protocolo fornecido pela empresa.

### **2.6.1 Extracção de ARN total de culturas celulares**

As células da retina de rato, cultivadas em caixas de 35 mm de diâmetro, foram lisadas com 1 mL de reagente de Trizol. De seguida, preparou-se um homogeneizado de cada condição em estudo, fazendo-se passar o lisado celular diversas vezes pela ponta da pipeta, que foi guardado em tubos eppendorf. Após 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,2 mL de clorofórmio, por cada mL de reagente de Trizol utilizado inicialmente. Os tubos foram agitados, vigorosamente, durante 15 segundos e deixados em repouso, à temperatura ambiente, durante 2 a 3 minutos. Após este passo, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g, durante 15 minutos, a 4°C (Eppendorf 5415R) e, em seguida, recolheu-se a fase aquosa e transferiu-se para um novo tubo. O ARN, que se

encontra disperso na fase aquosa, foi precipitado pela adição de isopropanol (0,5 mL por cada mL de reagente de Trizol), durante 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 12000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o ARN precipitado foi lavado uma vez com etanol a 75% (pelo menos 1 mL por cada mL de reagente de Trizol utilizado inicialmente). Para isso, agitaram-se vigorosamente os tubos e centrifugaram-se as amostras a 7500 x g, durante 5 minutos, a 4°C. Por fim, deixou-se evaporar o etanol residual e o ARN foi dissolvido em 20 µl de água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), finalizando-se o processo com uma incubação a 60°C, durante 10 minutos. As amostras foram armazenadas a -80°C.

### **2.6.2 Extracção de ARN total de amostras de tecido**

A homogeneização de cada duas retinas extraídas de ratos Wistar decorreu num homogeneizador de vidro, contendo 1 mL de reagente de Trizol, a 4 °C. O homogeneizado de retina foi centrifugado a 12000 x g, durante 10 minutos, a 4°C, de forma a remover o material insolúvel. O sobrenadante resultante, que contém o ARN e proteínas, foi transferido para um novo tubo e deixado à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após a adição de 0,2 mL de clorofórmio (por cada mL de TRIZOL adicionado inicialmente) a cada amostra, os tubos foram vigorosamente agitados, durante 15 segundos, e mantidos à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após centrifugação a 12000 x g, durante 15 minutos, a 4°C (Eppendorf 5415R), a fase aquosa, que contém o ARN, foi transferida para um novo tubo, tendo-se acrescentado 0,5 mL de isopropanol por cada mL de TRIZOL utilizado inicialmente. As amostras mantiveram-se, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, ao que se seguiu uma centrifugação a 12000 g x durante 10 minutos a 4°C. Após a transferência do sobrenadante para um novo tubo, adicionou-se 0,45 mL de isopropanol, permanecendo as amostras à temperatura ambiente, durante 15 minutos, seguindo-se uma nova centrifugação a 12000 x g, durante 10 minutos, de modo a conseguir uma precipitação adequada do ARN. O sobrenadante foi removido e o ARN foi lavado com etanol a 75% (utilizando pelo menos 1 mL por cada mL de reagente de TRIZOL), através de agitação vigorosa dos tubos, seguida de uma centrifugação a 7500 x g, durante 5 minutos, a 4°C. O tubo, contendo o ARN da amostra, foi deixado à temperatura ambiente em contacto com o ar, de forma a permitir a evaporação do etanol, durante 5 a 10 minutos. Por fim, adicionaram-se 20 µL de água previamente tratada com DEPC e homogeneizou-se o

ARN, finalizando-se o processo com uma incubação a 60°C, durante 10 minutos. As amostras foram armazenadas a - 80°C.

### **2.6.3 Quantificação de ARN**

O ARN total extraído de culturas celulares ou de retina foi diluído previamente 100 x em água livre de RNases. A quantificação realizou-se por medição da densidade óptica (DO) para o comprimento de onda a 260 nm (amostras de ADN puras podem ler-se apenas no comprimento de onda de 260 nm) e 280 nm (detecta a presença de ARN). A pureza do ARN foi determinada pela razão da DO obtida a 260 e 280 nm ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) (RNA/DNA calculator GeneQuantII, Pharmacia Biotech Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Preparações de ARN puras apresentam uma razão  $A_{260nm}/A_{280nm}$  de 2. A concentração de ARN ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi calculada com base na DO, no coeficiente de extinção molar para o ARN e no factor de diluição.

### **2.6.4 RT-PC**

#### **2.6.4.1 Transcrição Reversa**

A cadeia simples de ADN complementar (ADNc) foi sintetizada, usando um *kit* de síntese da cadeia de ADNc. A reacção iniciou-se, após a incubação de 2  $\mu\text{g}$  de ARN total de todos os modelos em estudo (retina intacta, cultura primária mista da retina de rato, e cultura de células endoteliais da retina de rato - linha celular TR-iBRB2), com oligonucleótidos aleatórios (oligo (dT) primers), inibidor da enzima do ARN, e enzima de transcrição reversa (RT) produzida no vírus mieloblastose de aves (AMV RT), fornecidos pelo "*kit*", durante 1 hora, a 42°C.

#### **2.6.4.2 Reacção de Polimerização em Cadeia**

A reacção de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada, utilizando pares de sequências de nucleótidos (*primers*) específicos para os genes do NPY, receptores do NPY e actina de rato. Os pares de sequências de nucleótidos utilizados e os respectivos tamanhos de produto estão indicados na tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Sequências de nucleótidos utilizados na RT-PCR

	Sequência de nucleótidos	Tamanho do produto (bp)
<b>NPY</b>	5' – AGAGATCCAGCCCTGAGACA - 3' 5' – AACGACAACAAGGGAAATGG - 3	236
<b>Y<sub>1</sub></b>	5' – AACCTCTCCTTCTCAGACTTGC - 3 5' – CACAGTGTTGAAGATGGTAAGG - 3	616
<b>Y<sub>2</sub></b>	5' – CTCCAAGCAAATCAGCTTCC - 3 5' – GTTTTGTGCCTTCGCTGATGG - 3	318
<b>Y<sub>4</sub></b>	5' – AACCTACTCATTGCCAACCTG - 3 5' – ATGTAGCAGACCAGGATGAAG - 3	476
<b>Y<sub>5</sub></b>	5' – GTGTTCCCGAGGTGCTTCTA - 3 5' – ATTCCGAGCAGCAGCTGTAT - 3	248
<b>actina</b>	5' – GACTACCTCATGAAGATCCT - 3 5' – ATCTTGATCTTCATGGTGCTG - 3	427

bp – pares de bases

Como controlos positivos, para o NPY e receptor Y<sub>4</sub> do NPY utilizou-se ADNc de cérebro de rato e para os receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub> do NPY utilizaram-se plasmídeos específicos. Como controlo de quantidade do ADNc amplificado, também se realizaram reacções de amplificação com as amostras em estudo na presença das sequências específicas para o gene da actina. Os ensaios realizados na ausência de amostras de ARN, que foram substituídas por água, constituíram os controlos negativos.

Todas as amplificações ocorreram na presença de um tampão de PCR, contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de sequências aleatórias de nucleótidos (oligo dT), 0,2 µM do par de cada sequência específica de nucleótidos (NPY e receptores do NPY), e 2,5 unidades/mL de Taq® da ADN polimerase.

As reacções de polimerização decorreram da seguinte forma: 1 min a 95 °C (desnaturação), 35 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturação), 55 °C durante 1 min (emparelhamento dos primers) e uma extensão durante 1 min a 72 °C. No final dos 35 ciclos, procedeu-se a uma extensão final das cadeias durante 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio. A análise densitométrica das bandas foi realizada num sistema de análise de imagem *Versa-Doc* (Modelo 3000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

## **2.7 Ensaios de Viabilidade celular**

### **2.7.1 Ensaio da redução do MTT**

Este ensaio colorimétrico avalia a viabilidade celular, uma vez que o sal de tetrazólio (MTT) é reduzido pelas redutases mitocondriais de células vivas, passando de uma solução de coloração amarela para um precipitado violeta (cristais de formazan)<sup>(Mosmann, 1983)</sup>. A viabilidade das células da retina de rato em cultura foi avaliada na presença e na ausência dos fármacos em estudo, indicados na secção de Resultados e nas Figuras. Ao fim de 9 dias em cultura, em placas de cultura de 24 poços, as células da retina de rato foram lavadas com tampão de Krebs<sup>1</sup> e, posteriormente, foram incubadas com 300 µL de MTT, 0,5 mg/mL) em tampão de Krebs, durante uma hora, a 37°C. Após este período, removeu-se o meio e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 0,04 M de HCl em isopropanol. Por fim, transferiu-se 200 µL de cada poço para uma placa de 96 poços e a absorvância foi lida a 570 nm no leitor de ELISA (SLT spectra II), usando um filtro de referência de 620 nm. Todas as experiências foram efectuadas em triplicado e a extensão da redução do MTT foi expressa como percentagem da absorvância obtida nas condições controlo (sem fármacos).

### **2.7.2 Ensaio de Iodeto de Propídio**

O iodeto de propídio (PI) é uma substância polar, que entra apenas nas células cujas membranas celulares se encontram danificadas e que, por isso, já não formam uma barreira semi-permeável efectiva, ligando-se ao ADN celular. O PI ligado ao ADN emite fluorescência vermelha intensa e brilhante (630 nm), quando excitado com luz na gama azul-verde (493 nm). Esta sonda fluorescente tem sido considerada uma sonda não tóxica para os neurónios<sup>(Pozzo Miller et al., 1994)</sup>, sendo, por isso, largamente utilizada como um indicador da integridade da membrana neuronal<sup>(Vitale et al., 1993)</sup> e de morte celular<sup>(Pozzo Miller et al., 1994; Pringle et al., 1997)</sup>. As células da retina cultivadas em lamelas de vidro de 16 mm de diâmetro, com uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, foram incubadas com os fármacos em estudo, conforme indicado na secção de Resultados e nas Figuras. Após 9 dias em cultura, as células controlo e as células expostas aos fármacos foram incubadas com PI (0,04 mg/mL) diluído

---

<sup>1</sup> **Tampão de Krebs:** 132 mM de NaCl; 4 mM de KCl; 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 mM de CaCl<sub>2</sub>; 6 mM de glicose; 10 mM de HEPES, pH 7.4.

em tampão de Krebs<sup>1</sup>, durante 4 a 5 minutos. Depois deste período, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss Axioshop 2 Plus), acoplado a uma câmara digital (AxioCam HRC), e contaram-se as células marcadas com PI.

## **2.8 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) e “Western e Blot”**

### **2.8.1 Preparação de extractos celulares**

As células cultivadas em placas de cultura de 35 mm de diâmetro foram lavadas 2 vezes com PBS frio e lisadas a 4 °C com um meio de lise<sup>2</sup> suplementado com 100 µM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM de ditioneitol (DTT), 1 µg/mL de quimostatina, 1 µg/mL de leupeptina, 1 µg/mL de antiparina, 5 µg/mL de pepstatina A (CLAP), 1 mM de ortovanadato, pH 7,4. Os inibidores de proteases (PMSF, DTT e CLAP) impediram a degradação proteica, enquanto que a fosforilação foi prevenida pela presença do ortovanadato. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Biorad). Adicionou-se, a cada uma das amostras, uma solução desnaturante<sup>3</sup> 6x concentrada e as mesmas foram aquecidas a 95 °C, durante 5 minutos. A BSA foi usada como padrão para a determinação da curva-padrão.

### **2.8.2 SDS-PAGE e “Western Blot”**

Os extractos celulares (60 µg de proteína total) foram aplicados num gel de poliacrilamida descontínuo, cuja parte superior continha 4% de poliacrilamida e o gel inferior com 10% de poliacrilamida (gel de corrida). A electroforese<sup>4</sup> decorreu em condições desnaturantes, permitindo a separação das proteínas aplicadas, na presença de SDS (SDS-PAGE), no sistema de electroforese Mini Protean III (Biorad, Hercules, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas

---

<sup>1</sup> **Tampão de Krebs:** 140 mM de NaCl; 5 mM de KCl; 1 mM de CaCl<sub>2</sub>; 1 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5,5 mM de glicose; 20 mM de HEPES, 1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4.

<sup>2</sup> **Meio de lise:** 50 mM de KCl; 50 mM de PIPES; 10 mM de EGTA; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5% de Triton X-100.

<sup>3</sup> **Solução desnaturante:** 0,5 M de Tris; 30% de glicerol; 10% de SDS; 0,6 M de DTT; 0,0012% de azul de bromofenol.

<sup>4</sup> **Solução de electroforese:** 0,2 M de Tris; 1 M de Bicina; 0,017 M de SDS, pH=8,3.

de difluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente activadas com metanol, por electrotransferência<sup>1</sup>, durante 90 minutos a 500 mA, a 4 °C. As membranas foram depois bloqueadas, durante 1 hora, com 5% (m/v) de leite desnatado, com 0,1% Tween 20 em PBS (TBS-T) e incubadas, durante 90 minutos, à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C, com o anticorpo primário diluído em 1% (m/v) de leite desnatado em TBS-T. As membranas foram depois lavadas, durante 30 minutos, com uma solução de 0,5% (m/v) de leite desnatado em TBS-T, e incubadas, durante 30 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário marcado com a fosfatase alcalina, diluído em 1% (m/v) de leite desnatado em TBS-T. De seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T, durante 30 minutos, e reveladas utilizando o método ECF (*Enhanced Chemifluorescence*, Quimiofluorescência melhorada). A análise e quantificação da imunoreactividade das bandas de interesse foram efectuadas por densitometria, usando o sistema *Quantity One* (Biorad).

## **2.9 Imagiologia de cálcio intracelular em células individuais com a sonda Fura-2/AM**

Para analisar as variações da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em células individuais, utilizou-se a sonda fluorescente Fura-2/AM<sup>(Grynkiewicz et al., 1985)</sup>. Esta sonda pertence à família de compostos derivados da molécula de EGTA, à qual foram adicionados diferentes grupos cromóforos<sup>(Grynkiewicz et al., 1985)</sup>. O composto Fura-2/AM é um éster acetoximetílico da sonda Fura-2 que, após incorporação nas células, é rapidamente hidrolisado por esterases não-específicas, formando ácido acético e formaldeído, libertando assim a sonda Fura-2, que é sensível ao  $Ca^{2+}$  livre.

As células da retina de rato, cultivadas sobre lamelas de vidro, foram lavadas três vezes com tampão de Krebs<sup>2</sup>, suplementado com 0,1% BSA livre de ácidos gordos, e depois incubadas com a sonda Fura-2/AM (5  $\mu$ M), em tampão de Krebs suplementado com 0,1% de BSA livre de ácidos gordos e 0,02% de Pluronic F-127, numa incubadora a 37°C, sob uma atmosfera humidificada de 95% ar/5%  $CO_2$ , durante 45 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de Krebs suplementado com 0,1% de BSA.

<sup>1</sup> **Solução de electrotransferência:** 2 M de NaOH; 0,5% de metanol 10%, pH=11.

<sup>2</sup> **Tampão de Krebs:** 132 mM de NaCl; 4 mM de KCl; 1,4 mM de  $MgCl_2$ ; 1 mM de  $CaCl_2$ ; 6 mM de glicose; 10 mM de Hepes; 10 mM de  $NaHCO_3$ , pH=7,4.

As lamelas contendo as células foram montadas rapidamente numa câmara de perfusão (modelo P5, série 20, Warner Instruments) e, de imediato, adicionaram-se 150 µL de tampão de Krebs aquecido (37°C) sobre a face da lamela com as células. A câmara de perfusão foi instalada num microscópio Axiovert 200 (Zeiss) e ligada a um sistema de perfusão, com um fluxo de aproximadamente 2,5 mL/min. A experiência foi controlada e seguida através de um computador acoplado a uma câmara digital (AxioCam), sendo todos os dados registados no computador, através do *software* Metafluor, versão 5.0 (Axiovision).

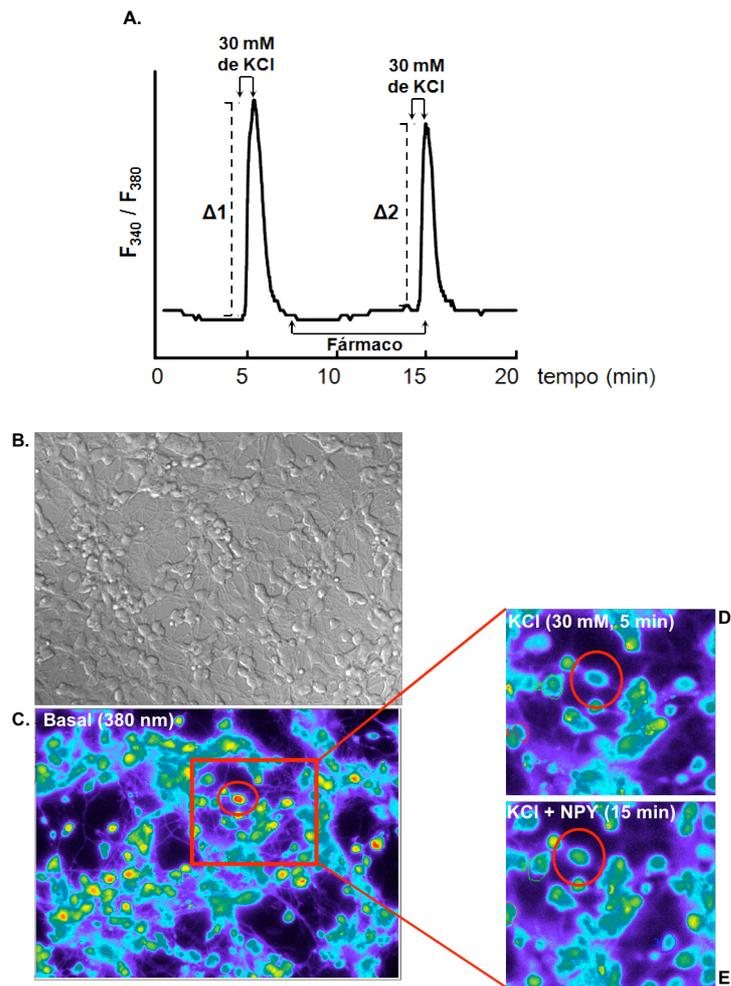
O registo das respostas celulares só se iniciou após a estabilização do fluxo do tampão de Krebs e as células foram continuamente perfundidas durante o período das experiências (20 minutos), a 37°C. As células foram visualizadas no modo de fluorescência ( $\lambda_{\text{emissão}}$ : 510 nm;  $\lambda_{\text{excitação}}$ : 340/380 nm) e o software foi registando as imagens de fluorescência do campo de visualização, resultantes da exposição alternada a feixes de excitação com 340 nm e 380 nm (Figura 2.1 C, D e E).

Na figura 2.1 A, onde está apresentado um registo das alterações de cálcio numa célula da retina, também está indicado o protocolo experimental utilizado e o método da análise da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em cada célula. Após a estabilização do fluxo, iniciou-se o registo. As células continuaram a ser perfundidas com tampão de Krebs, durante 5 minutos e, exactamente aos 5 minutos, as células passaram a ser perfundidas com um tampão salino com uma concentração de KCl elevada (30 mM)<sup>1</sup>, durante 30 segundos.

Este período foi considerado como o primeiro período de estimulação das células, uma vez que as células são despolarizadas pelo KCl, ocorrendo por isso um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , visualizando-se uma diminuição de fluorescência a 380 nm, no corpo celular de cada neurónio (Figura 2.1 D). Após este período, as células voltaram a ser perfundidas por tampão de Krebs, regressando aos valores basais da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , até aos 15 minutos (Figura 2.1 B). Nesta altura, o tampão de Krebs foi novamente substituído por meio despolarizante de KCl, durante 30 segundos. Nos 4 minutos e 30 segundos restantes, as células voltaram a ser perfundidas com o tampão de Krebs.

---

<sup>1</sup> **Tampão Krebs com 30 mM de KCl** : 106 mM de NaCl; 30 mM de KCl; 1,4 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; 6 mM de glicose; 10 mM de HEPES; 10 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , pH=7,4.



**Figura. 2.1 – Representação esquemática do protocolo experimental usado nas experiências de imagiologia de  $Ca^{2+}$  em células da retina em cultura**

(A) As experiências de avaliação das variações de  $[Ca^{2+}]_i$  nas células da retina em cultura decorreram durante 20 minutos. As células foram estimuladas aos 5 e 15 minutos com o tampão de Krebs, com 30 mM de KCl. O efeito dos fármacos testados foi avaliado perfundindo as células após o primeiro estímulo com meio de Krebs com fármaco, sendo o segundo estímulo efectuado também na presença de fármaco. Os resultados obtidos foram expressos através da razão  $\Delta 2/\Delta 1$ ; (B) Imagem representativa de uma cultura de células da retina obtida no modo de transmissão (sem fluorescência); (C) A mesma imagem que em (B), mas iluminada com fluorescência a 380 nm, visualizando-se os corpos celulares de cada neurónio da retina, apresentando tonalidades de amarelo (menos saturado) a vermelho (mais saturado), consoante a concentração da sonda Fura-2-AM. Nesta fase da experiência consideramos a situação basal, ou seja, ainda não ocorreu estimulação das células; (D) Ampliação da zona demarcada na imagem (B) após a estimulação da cultura com 30 mM de KCl aos 5 min, ocorrendo um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  detectada pela diminuição de fluorescência nos corpos celulares dos neurónios, comparativamente à tonalidade na situação basal (B); (E) Ampliação da zona demarcada na imagem (B) após a estimulação da cultura com 30 mM de KCl + 100 nM de NPY aos 15 min, ocorrendo um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  detectada pela diminuição de fluorescência nos corpos celulares dos neurónios, comparativamente à tonalidade na situação basal (B), mas menor que na situação (D).

Para avaliar o efeito de fármacos na  $[Ca^{2+}]_i$ , as células foram sujeitas a uma perfusão com tampão de Krebs com os fármacos em estudo, entre os 5 min e 30 segundos e os 15 minutos; aos 15 minutos, as células voltaram a ser despolarizadas pela solução de KCl contendo também o fármaco em estudo (Figura 2.1 E).

Os fármacos utilizados nestas experiências, bem como as respectivas concentrações, estão enumerados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Fármacos utilizados nas experiências de imagiologia de cálcio em células da retina de rato.

<b>Fármaco</b>	<b>Concentração</b>
NPY	100 nM
Agonista dos receptores $Y_1/Y_5$ ([Leu <sup>31</sup> ,Pro <sup>34</sup> ]NPY)	100 nM
Agonista do receptor $Y_2$ (NPY <sub>13-36</sub> )	300 nM
Agonista do receptor $Y_4$ (r-PP)	100 nM
Agonista do receptor $Y_5$ (NPY <sub>19-23</sub> (Gly <sup>1</sup> ,Ser <sup>3</sup> ,Gln <sup>4</sup> ,Thr <sup>6</sup> ,Ala <sup>31</sup> ,Aib <sup>32</sup> ,Gln <sup>34</sup> )PP)	100 nM
Antagonista do receptor $Y_1$ (BIBP 3226)	1000 nM
Antagonista do receptor $Y_5$ (L-152,804 )	1000 nM

Para a análise dos resultados, utilizou-se o *software* Metafluor 2 (Axiovision). Resumidamente, após a selecção e demarcação dos corpos celulares de neurónios existentes na lamela em estudo, o software permitiu a obtenção do registo das variações da  $[Ca^{2+}]_i$  em cada um dos corpos celulares seleccionados (Figura 2.1 C). Através da análise de cada registo, determinaram-se as duas amplitudes de resposta em cada célula, resultantes dos estímulos com o meio despolarizante de KCl aos 5 ( $\Delta 1$ ) e aos 15 minutos ( $\Delta 2$ ), e calculou-se a razão  $\Delta 2/\Delta 1$ . Para a análise dos resultados, uma vez que se observou a existência de populações de neurónios com respostas farmacológicas diferentes, foram considerados dois grupos de células, que correspondem a dois intervalos de variação da razão  $\Delta 2/\Delta 1$ , que serão designados por **grupo A** – células que apresentam a razão  $\Delta 2/\Delta 1$  superior ou igual a 0,80 ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ) – e **grupo B** – células cuja razão  $\Delta 2/\Delta 1$  é inferior a 0,80 ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ).

## **2.10 Análise Estatística**

Os resultados apresentados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A significância estatística foi determinada através de uma análise de variância (ANOVA), seguida de testes *à posteriori*, nomeadamente de Dunnet e Bonferroni, como indicado nas legendas das figuras.







## **Capítulo 3**

### ***O Neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina de rato***



### **3.1 Introdução**

Tal como descrito na Introdução Geral (Capítulo 1), a retina é uma estrutura do tecido nervoso muito organizada, que contém duas classes principais de células: neurónios e células da glia, que se encontram estrategicamente localizadas ao longo de várias camadas de células<sup>(Yang, 2004)</sup>.

O NPY é um peptídeo presente em várias áreas do SNC<sup>(Silva et al., 2005a)</sup>, existindo igualmente na retina de diferentes espécies animais<sup>(Bruun et al., 1986; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Oh et al., 2002)</sup>. Relativamente aos receptores do NPY, o ARNm para os receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub> foi detectado em retina de rato<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>. No entanto, ainda não está esclarecida a função do sistema do NPY na retina. Algumas observações indicam que as células que expressam NPY podem participar em múltiplos circuitos do processo de informação visual na retina interna de murganho<sup>(Sinclair et al., 2004)</sup>. Adicionalmente, demonstrou-se que o NPY modula a libertação de neurotransmissores na retina de coelho e de pinto<sup>(Bruun and Ehinger, 1993)</sup>. Contudo, a libertação de NPY, estimulada por luz de frequência elevada ou por despolarização, foi demonstrada apenas na retina de rã<sup>(Bruun et al., 1991)</sup> e, por isso, é necessário um estudo mais aprofundado das condições necessárias para a libertação de NPY.

Várias evidências indicam que o NPY estimula a proliferação e a migração de células endoteliais<sup>(Zukowska-Grojec et al., 1998a; Zukowska-Grojec et al., 1998b; Marion-Audibert et al., 2000; Gherzi et al., 2001; A. Jonas Ekstrand, 2003)</sup>. Recentemente, demonstrou-se que o receptor do NPY do subtipo Y<sub>2</sub> está envolvido na patogénese da retinopatia diabética<sup>(Koulu et al., 2004)</sup>.

Alguns estudos sugerem que a expressão do NPY e dos seus receptores no SNC poderá não estar confinada aos neurónios e poderá ocorrer também nas células da glia, nomeadamente nos astrócitos<sup>(Gimpl et al., 1993; Barnea et al., 1998; St-Pierre et al., 2000)</sup>. No entanto, na retina, não existem evidências da presença de NPY nas células da glia, nomeadamente nas células de Müller, nos astrócitos ou nas células da microglia.

Assim, neste estudo, pretendeu-se: 1) identificar o tipo de células da retina que expressam NPY. Para tal, utilizaram-se retinas intactas de rato, culturas primárias mistas da retina de rato e de células de microglia da retina de rato e linhas celulares de células de Müller e de células endoteliais da retina de rato; 2) investigar a presença dos receptores do NPY nas células da retina; 3) avaliar a libertação de NPY nas culturas primárias da retina de rato.

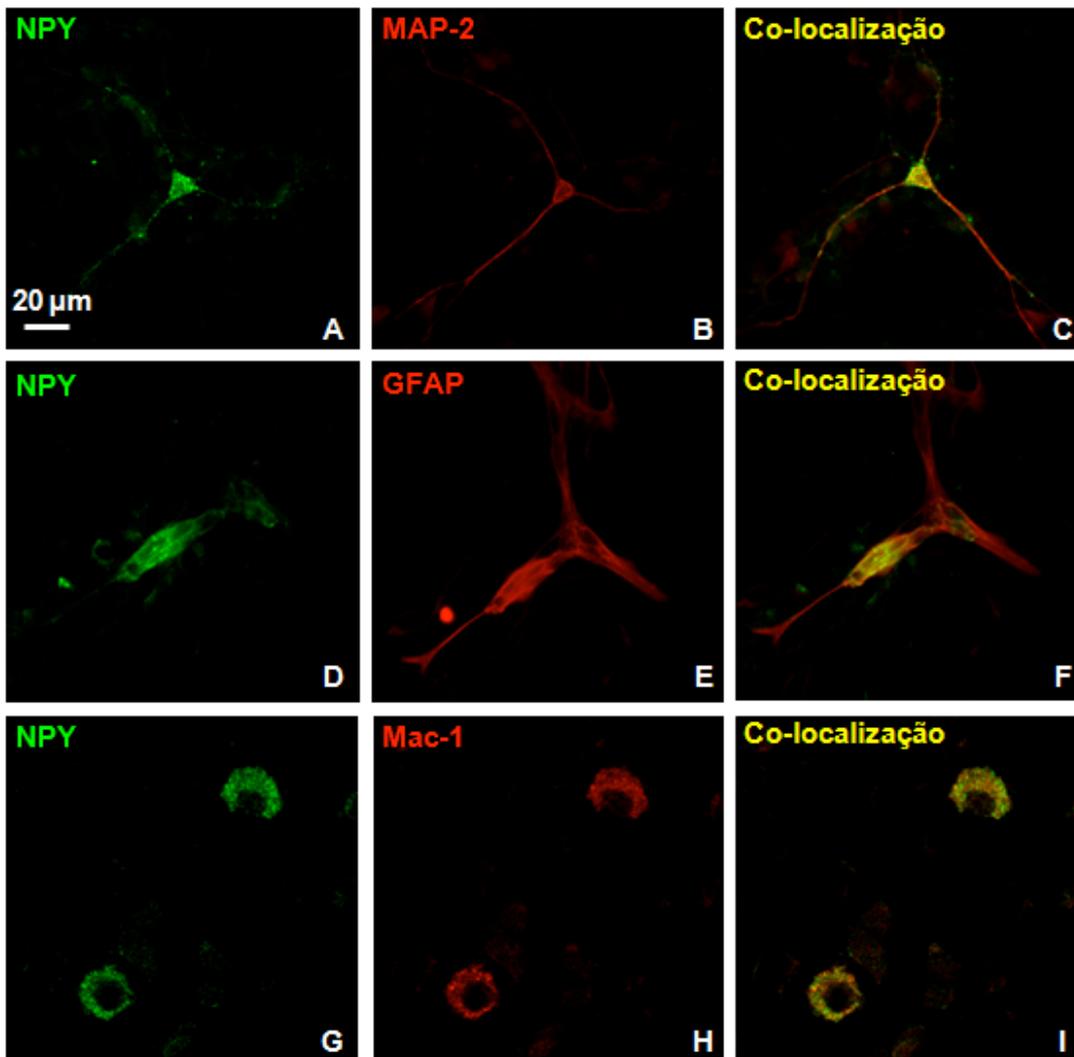
## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Determinação do conteúdo de NPY na retina de rato e em culturas de células da retina

As retinas isoladas a partir de ratos machos *Wistar*, com nove semanas de idade, continham  $15,1 \pm 1,4$  fmol de NPY/ $\mu$ g de proteína (n=4). O conteúdo intracelular de NPY, nas culturas primárias da retina de rato, foi de  $1,4 \pm 0,1$  fmol de NPY/ $\mu$ g de proteína (n=3, em duplicado de três culturas independentes). Nas células endoteliais da retina de rato (linha celular TR-iBRB2), os níveis de NPY encontravam-se abaixo do limite de detecção do ensaio de doseamento de NPY ( $< 0,5$  pM).

### 3.2.2 A expressão de NPY em diferentes tipos de células da retina

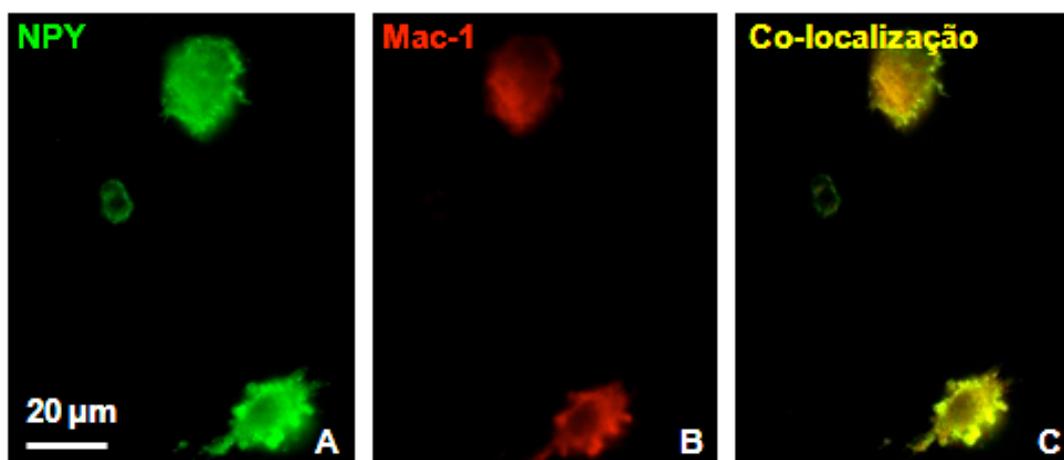
A detecção de NPY e pró-NPY nas culturas primárias de retina foi realizada por imunocitoquímica, utilizando um anticorpo monoclonal, o NPY02<sup>(Grouzmann et al., 1992)</sup> (Figura 3.1). Algumas das células positivas para o NPY foram identificadas como sendo neurónios (marcação com um anticorpo anti-MAP-2), uma vez que se observou uma co-localização das marcações para NPY e MAP-2. O NPY foi detectado nos corpos celulares dos neurónios, bem como em alguns prolongamentos (Figura 3.1, A-C). A imunoreactividade de NPY também foi detectada em células positivas para GFAP, um marcador de astrócitos e células de Müller (Figura 3.1, D-F), e em células da microglia, que foram identificadas utilizando um anticorpo anti-Mac-1 (Figura 3.1, G-I). Quando se utilizou o anticorpo NPY05<sup>(Grouzmann et al., 1992)</sup>, que também é um anticorpo monoclonal que se liga ao terminal carboxílico amidado do NPY, observou-se um padrão de marcação semelhante.



**Figura 3.1 – O Neuropeptídeo Y está presente em diferentes tipos de células da retina.**

O NPY foi detectado (verde) com o anticorpo NPY02, (1:1500) (A, D, G). As células da retina de rato em cultura foram duplamente marcadas com o anticorpo anti-NPY e com os anticorpos marcadores de neurónios, macroglia e microglia. Assim, os neurónios (vermelho) foram identificados pelo anticorpo anti-MAP-2 (1:500) (B e C); os astrócitos e células de Müller foram detectados (vermelho) com o anticorpo anti-GFAP (1:500) (E e F); as células da microglia foram marcadas (vermelho) com o anticorpo anti-Mac-1 (H e I). As imagens são representativas de três culturas independentes.

De forma a confirmar a presença de NPY nas células da microglia, utilizou-se uma cultura primária de células de microglia, onde foi também possível detectar a presença de imunorreactividade para o NPY (Figura 3.2).

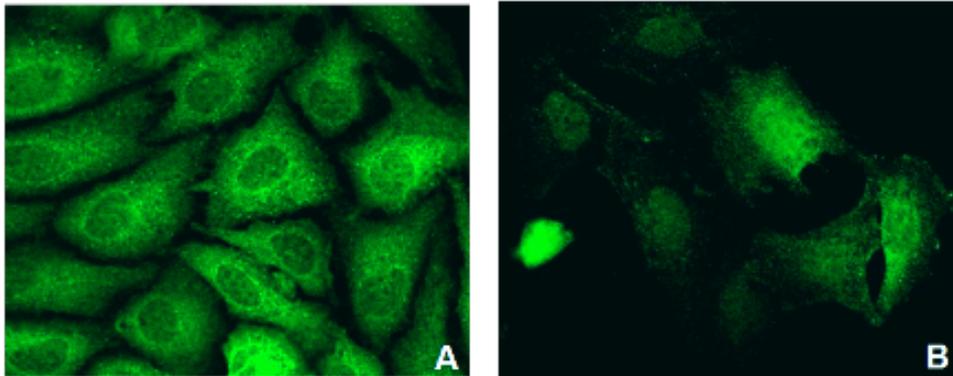


**Figura 3.2 – O NPY está presente nas células da microglia da retina de rato.**

O NPY foi detectado (verde) com o anticorpo monoclonal anti-NPY (NPY02, 1:1500) (A) e as células da microglia foram marcadas com o anticorpo anti-Mac 1 (B). (C) Co-localização de NPY e Mac-1. As imagens são representativas de três culturas independentes.

A presença de NPY nas células endoteliais da retina de rato foi também detectada por imunocitoquímica com o anticorpo anti-NPY02. Observou-se uma marcação ponteadada ao longo de toda a célula, embora maioritariamente no citoplasma e na região perinuclear (Figura 3.3 A).

A presença de NPY nas células de Müller foi confirmada pela marcação de NPY na linha celular de células de Müller de rato (TR-MUL) (Figura 3.3 B).



**Figura 3.3 – O NPY está presente nas células endoteliais e nas células de Müller da retina de rato.**

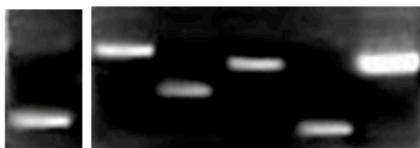
A presença de NPY foi detectada em células endoteliais da retina de rato (A) e em células de Müller da retina de rato (B). A marcação de NPY (anticorpo NPY02, 1:1500) foi detectada nas linhas celulares de células endoteliais (TR-iBRB2) e de células de Müller (TR-MUL) da retina de rato. As imagens são representativas de três culturas independentes. Ampliação de 600x.

### **3.2.3 Presença do ARNm do NPY e dos receptores do NPY por RT-PCR nas células da retina de rato**

O ARNm do NPY e dos receptores do NPY foi detectado nas retinas intactas de rato, nas culturas primárias da retina de rato e na linha celular de células endoteliais da retina de rato (Figura 3.4). Relativamente aos receptores do NPY, o ARNm para os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$  foi detectado quer na retina, quer nas células da retina em cultura (Figura 3.4, A e B). Nas células endoteliais da retina de rato, também foi detectado o ARNm para os mesmos receptores, com excepção do receptor  $Y_5$  (Figura 3.4 C).

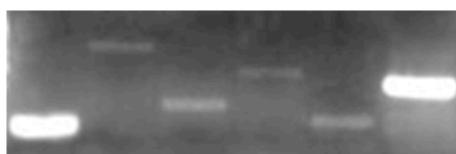
**A. Retina de rato**

NPY Y<sub>1</sub> Y<sub>2</sub> Y<sub>4</sub> Y<sub>5</sub> actina



**B. Células de retina de rato em cultura**

NPY Y<sub>1</sub> Y<sub>2</sub> Y<sub>4</sub> Y<sub>5</sub> actina



**C. Células endoteliais de retina de rato**

NPY Y<sub>1</sub> Y<sub>2</sub> Y<sub>4</sub> Y<sub>5</sub> actina



**Figura 3.4 – Expressão de ARNm do NPY e dos receptores do NPY nas células da retina.**

O ARNm do NPY e dos seus receptores foi detectado na retina de rato (A), nas células da retina em cultura (B) e nas células endoteliais (C). A expressão do ARNm do NPY e dos seus receptores foi investigada através da reacção de polimerização em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR), seguida de electroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR resultantes foram: NPY, 236 bp; Receptor Y<sub>1</sub>, 616 bp; Receptor Y<sub>2</sub>, 318 bp; Receptor Y<sub>4</sub>, 476 bp; Receptor Y<sub>5</sub>, 248 bp; actina, 427 bp. Cada imagem é representativa de três retinas de diferentes animais e de três culturas independentes.

**3.2.4 Libertação de NPY das células da retina em cultura**

A quantidade de NPY libertado constitutivamente (libertação basal) estava abaixo do limite de detecção do ensaio de doseamento de NPY. A incubação das células durante 10 minutos com 50 mM de KCl induziu uma libertação de NPY de  $7,8 \pm 4,2\%$  do conteúdo intracelular total de NPY (n=3). A quantidade de NPY libertada foi entre 0,5-3,0 pM.

### 3.3 Discussão

Apesar do NPY estar presente na retina de diversas espécies<sup>(Bruun et al., 1986; Tornqvist and Ehinger, 1988; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Oh et al., 2002)</sup>, a função deste peptídeo na retina não está esclarecida, devido, em parte, à falta de informação acerca dos tipos de células da retina, que expressam e libertam NPY, e sobre a expressão e localização dos seus receptores. O objectivo do presente estudo, utilizando diferentes modelos celulares, consistiu em identificar o tipo de células da retina que expressam o NPY e identificar o tipo de receptores do NPY que são expressos pelas células da retina.

O NPY biologicamente activo, o NPY amidado, foi quantificado por um ensaio de ELISA, através do qual se verificou que o peptídeo está presente na retina intacta e nas células da retina em cultura. A presença do NPY nas células da retina foi confirmada por imunocitoquímica e por RT-PCR. Estudos anteriores já tinham demonstrado que o NPY está presente em retinas de rato<sup>(Ferriero and Sagar, 1989; Oh et al., 2002)</sup> e de outras espécies de mamíferos, incluindo murganhos<sup>(Sinclair and Nirenberg, 2001)</sup>, macacos<sup>(Marshak, 1989)</sup> e o homem<sup>(Tornqvist and Ehinger, 1988; Jen et al., 1994)</sup>.

Nas células da retina em cultura, recorrendo a imunocitoquímica de dupla marcação, verificou-se que o NPY está presente nos neurónios da retina. Esta observação está de acordo com outros estudos que descrevem que a imunorreactividade do NPY se localiza maioritariamente em neurónios, especialmente nas células amácrinas e ganglionares<sup>(Hutsler et al., 1993; Ammar et al., 1998; Sinclair and Nirenberg, 2001)</sup>. Na retina de rato, demonstrou-se que a imunorreactividade ao NPY está presente em duas populações de células amácrinas, uma localizada na camada nuclear interna e a outra na camada de células ganglionares<sup>(Oh et al., 2002)</sup>. Estas evidências sugerem que, na retina, e principalmente na retina interna, o NPY poderá participar em múltiplos circuitos, mediando o processamento da informação visual.

Outras evidências sugerem que a expressão do NPY e dos seus receptores, no sistema nervoso central, poderá não se encontrar apenas nos neurónios, podendo ocorrer também nas células da glia, nomeadamente nos astrócitos<sup>(Gimpl et al., 1993; Barnea et al., 1998; St-Pierre et al., 2000)</sup>. De facto, no presente trabalho, verificou-se que a imunorreactividade do NPY também foi detectada nas células da macroglia e da microglia. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que na retina o NPY não é expresso somente nos neurónios, mas que está também presente nas células da glia. Alguns estudos sugerem, de forma inequívoca, que tanto as células da macroglia como as da microglia estão associadas a disfunções retinianas, tais como a vítreoretinopatia, retinopatia diabética, *retinitis pigmentosa* e

degenerescência macular relacionada com a idade<sup>(McGillem and Dacheux, 1998; Rungger-Brandle et al., 2000; Soler et al., 2002; Gupta et al., 2003)</sup>. Por conseguinte, a presença de NPY nas células da macro- e da microglia sugere um possível papel do peptídeo nos processos inflamatórios detectados nas patologias referidas anteriormente, o qual deveria ser objecto de estudo, no futuro<sup>(Leal et al., 2005; Meleth et al., 2005; Zhou et al., 2005)</sup>.

Neste estudo, o NPY foi também detectado nas células endoteliais da retina (linha celular TR-iBRB), por imunocitoquímica e pela expressão do ARNm. A marcação ponteadada foi particularmente evidente no citoplasma e à volta do núcleo. Anteriormente, já tinha sido detectada a presença de NPY noutras células endoteliais, tais como células endoteliais do cordão umbilical humano<sup>(Cai et al., 1993; Silva et al., 2005b)</sup> e nas células endoteliais cardíacas humanas<sup>(Cai et al., 1993)</sup>. Além do NPY, detectou-se também ARNm para os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_4$  do NPY, mas não para o receptor  $Y_5$ , nas células endoteliais da retina. A presença dos receptores  $Y_1$  e  $Y_2$  em células endoteliais é consistente com estudos prévios realizados em células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs)<sup>(Zukowska-Grojec et al., 1998b; Silva et al., 2003b)</sup>. Pelo contrário, o ARNm para o receptor  $Y_4$  do NPY não foi detectado nas HUVECs e o receptor  $Y_5$  apenas foi detectado após tratamento com citocinas<sup>(Silva et al., 2003b)</sup>. Estas diferenças entre os dois tipos de células endoteliais na expressão do ARNm dos receptores do NPY poderá influenciar a fisiologia celular<sup>(Rymaszewski et al., 1992)</sup>.

No presente trabalho, demonstrou-se que o ARNm dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$  está presente nas células da retina, tendo em consideração que foi detectado, quer na retina, quer nas células da retina em cultura. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados com retina de rato<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>. Na retina de murganho, também foi detectado o ARNm dos receptores  $Y_1$  e  $Y_2$  do NPY<sup>(Yoon et al., 2002)</sup>. Estudos de imunohistoquímica, realizados em retina de rato, mostraram que o receptor  $Y_1$  está presente nas células amácrinas localizadas na camada nuclear interna e também nos corpos celulares e nas dendrites das células horizontais localizadas na camada plexiforme externa<sup>(D'Angelo et al., 2002)</sup>. Além disso, na retina de rato, existe uma diferença na localização da imunoreactividade para o NPY e para o seu receptor  $Y_1$ , o que sugere que o NPY poderá actuar de forma parácrina em células localizadas distantes do seu local de libertação<sup>(D'Angelo et al., 2002)</sup>. Por outro lado, a localização dos receptores  $Y_4$  e  $Y_5$  permanece por esclarecer. Relativamente aos receptores  $Y_2$ , foi descrito anteriormente que tanto o NPY como agonistas dos receptores  $Y_2$  inibem o influxo de  $Ca^{2+}$ , induzido por despolarização, para os axónios das células bipolares<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>.

Neste estudo, quantificou-se, pela primeira vez, a libertação das formas biologicamente activas do NPY (NPY<sub>1-36</sub>, NPY<sub>2-36</sub> e NPY<sub>3-36</sub>), induzida por concentrações de potássio elevadas, nas células da retina de rato em cultura. Estudos prévios já tinham demonstrado a libertação de NPY na retina de rã, de forma dependente de cálcio, induzida por concentrações elevadas de potássio ou por luz de frequência elevada<sup>(Bruun et al., 1991)</sup>.

Em conclusão, no presente trabalho, utilizando diversos modelos (retina de rato, culturas primárias mistas e de células de microglia da retina de rato, e linhas celulares de células de Müller e de células endoteliais da retina de rato), demonstrou-se que o NPY é sintetizado e expresso por diferentes populações de células presentes na retina de rato. A principal inferência deste estudo é, na verdade, o facto da marcação de NPY ter sido detectada nas células da macroglia (células de Müller) e da microglia. Assim, o desenvolvimento e caracterização de novos modelos de células da retina, associados a um estudo mais aprofundado do papel do NPY nas células da glia, poderão permitir esclarecer o papel do NPY na fisiopatologia da retina.







## **Capítulo 4**

***O Neuropeptídeo Y inibe as alterações da  $[Ca^{2+}]_i$   
induzida por KCl nos neurónios da retina  
de rato através da activação dos  
receptores de NPY  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$***



## 4.1 Introdução

A distribuição do NPY está identificada em várias áreas do SNC, sendo associada com inúmeras condições fisiopatológicas<sup>(Wettstein et al., 1995; Silva et al., 2005a)</sup>. Na retina, a imunoreactividade para o NPY foi detectada em diferentes espécies, nomeadamente em murganhos, ratos, cobaias, gatos, macacos e humanos<sup>(Bruun et al., 1986; Straznicky and Hiscock, 1989; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Oh et al., 2002; Álvaro et al., 2007b)</sup>. A presença de NPY encontra-se, principalmente, nas células amácrinas e nas células ganglionares<sup>(Hutsler and Chalupa, 1994; Ammar et al., 1998; Sinclair and Nirenberg, 2001)</sup>. No caso da retina de rato, o NPY localiza-se em duas populações de células amácrinas: uma localizada na camada nuclear interna e a outra na camada de células ganglionares, designando-se, neste caso, células amácrinas deslocadas<sup>(Sinclair and Nirenberg, 2001)</sup>.

O efeito do NPY é mediado através da activação de seis subtipos de receptores acoplados a proteínas G, designadamente os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  e  $y_6$ . Até ao momento, todos os receptores se encontram clonados, à excepção do receptor  $y_6$ <sup>(Larhammar et al., 1992; Lundell et al., 1995; Rose et al., 1995; Gerald et al., 1996; Weinberg et al., 1996)</sup>. Na retina de rato<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004; Álvaro et al., 2007b)</sup> e nas células da retina de rato<sup>(Álvaro et al., 2007b)</sup> em cultura, foi detectada a expressão do ARNm dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ .

No entanto, conforme descrito na Introdução geral (Capítulo 1), a função do NPY na retina é ainda pouco conhecida. Todavia, diversos estudos têm indicado que o NPY modula a excitabilidade neuronal em várias regiões do SNC<sup>(revisão(Silva et al., 2005a)</sup>. Por exemplo, na retina de coelho e de pinto, o NPY afecta a libertação de vários neurotransmissores, tais como, glutamato, GABA, glicina, adrenalina, dopamina e somatostatina<sup>(Bruun and Ehinger, 1993)</sup>.

A função do  $Ca^{2+}$  nas vias de sinalização intracelular é largamente conhecida. Também está bem documentado que a alteração da homeostase do  $Ca^{2+}$  poderá conduzir à morte celular<sup>(Sattler and Tymianski, 2000)</sup>. Vários estudos têm demonstrado que o NPY inibe o influxo de  $Ca^{2+}$  em neurónios de hipocampo, tálamo e “*arcuate nucleus*”<sup>(Sun and Miller, 1999; Silva et al., 2001; Sun et al., 2001)</sup>, assim como nos terminais nervosos das células bipolares da retina<sup>(D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>.

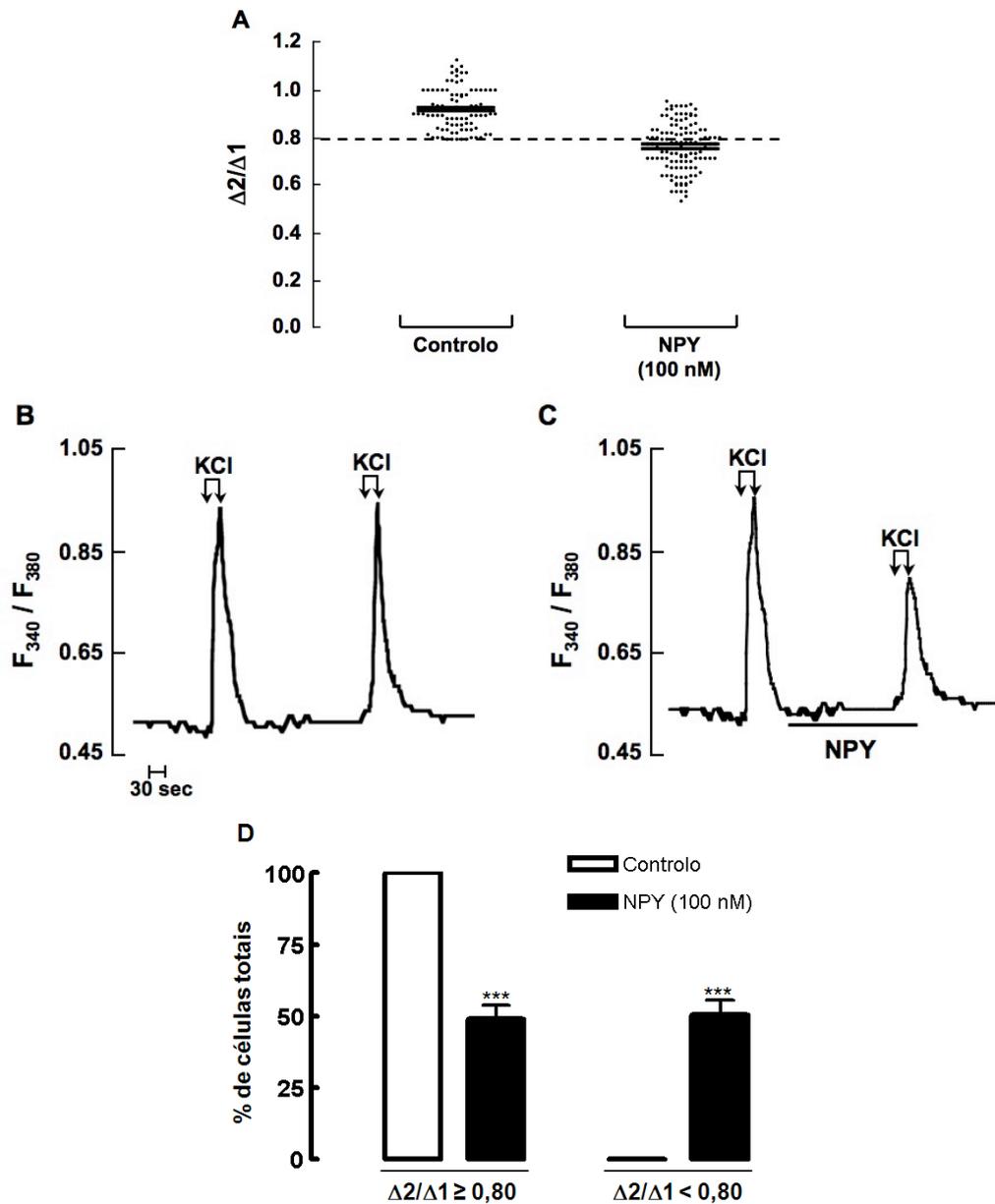
Deste modo, os objectivos deste capítulo foram: 1) investigar o papel do NPY nas variações da  $[Ca^{2+}]_i$  nos neurónios da retina e 2) identificar os receptores do NPY envolvidos na modulação das alterações da  $[Ca^{2+}]_i$ .

## 4.2 Resultados

### 4.2.1 O NPY inibe as alterações da $[Ca^{2+}]_i$ evocadas por KCl em neurónios da retina em cultura

As variações da  $[Ca^{2+}]_i$  foram analisadas exclusivamente nos corpos celulares dos neurónios da retina em cultura, após despolarização dos mesmos com 30 mM de KCl. As variações da  $[Ca^{2+}]_i$  reflectem as diferenças da razão de fluorescência a 340 nm e 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) entre o valor basal (antes do estímulo) e o pico (o valor mais elevado, após o estímulo). As células foram estimuladas duas vezes, aos 5 e aos 15 min (Figura 4.1 B e C) e, em todas as experiências, o primeiro estímulo foi utilizado como controlo interno. Os resultados serão apresentados como a razão entre as amplitudes do segundo e do primeiro estímulo ( $\Delta 2/\Delta 1$ ). Nas experiências controlo, os neurónios da retina foram estimulados na ausência de fármacos. Em todas as restantes condições, os fármacos estavam presentes, após o primeiro estímulo até ao final do segundo estímulo (durante 10 min; ver Figura 2.1 no Capítulo 2).

As células controlo apresentaram uma razão  $\Delta 2/\Delta 1$  de  $0,91 \pm 0,1$  (89 células analisadas), tendo o valor das razões variado entre 0,80 e 1,13 (Figura 4.1). Na presença de 100 nM de NPY, os valores da razão  $\Delta 2/\Delta 1$  situaram-se entre 0,53 e 0,95 (121 células analisadas) e o valor médio obtido foi de  $0,77 \pm 0,2$  (média  $\pm$  SEM). Comparando os valores médios da razão  $\Delta 2/\Delta 1$  entre as células controlo e as células expostas a NPY, verifica-se que não existem diferenças significativas entre ambos. Contudo, apesar das diferenças não serem significativas, analisando com atenção a Figura 4.1, pode observar-se que o NPY reduz as alterações de cálcio em várias células. Assim sendo, os resultados sugerem que existem dois grupos distintos de neurónios: neurónios que não respondem a NPY ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ; grupo A) e neurónios que respondem ao NPY ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ; grupo B). De facto, pode observar-se que existe um número significativo de células cujas respostas apresentam valores de  $\Delta 2/\Delta 1$  inferiores a 0,80, quando são expostas a NPY, o que nunca se verifica nas células controlo. As Figuras 4.1 B e C apresentam registos representativos de uma célula controlo (Figura 4.1 B) e de uma célula exposta a NPY (Figura 4.1 C), onde se evidencia que o NPY inibe significativamente as alterações da  $[Ca^{2+}]_i$ , pelo menos em determinados neurónios. Tendo em consideração o que foi referido anteriormente, nas Figuras 4.1 D, 4.2 e 4.3, os resultados são apresentados em percentagem de células nos grupos A e B relativamente ao total de células analisadas, para cada situação experimental.

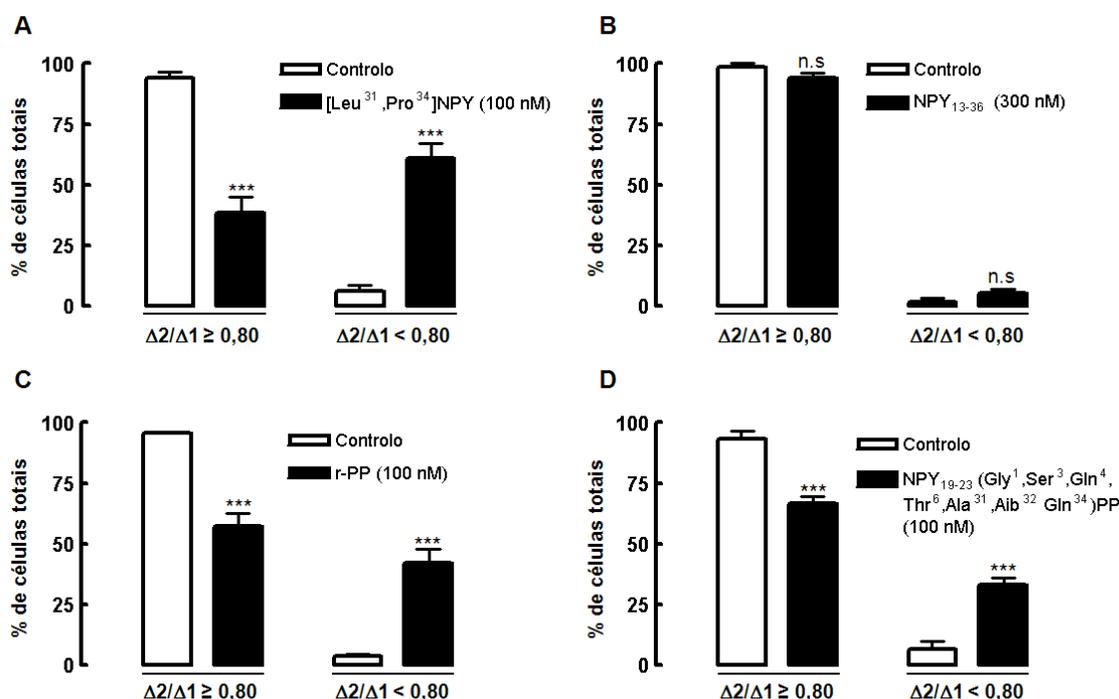


**Figura 4.1 – Efeito do NPY nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por KCl nos neurónios da retina.** (A) Representação da distribuição dos valores da razão  $\Delta 2/\Delta 1$  relativamente aos neurónios da retina analisados. As culturas de retina foram estimuladas na ausência (controlo) ou na presença de NPY (100 nM). (B,C) Registos representativos das variações da  $[Ca^{2+}]_i$  de neurónios da retina obtidos na ausência (B) ou na presença de NPY (C). (D) Quantificação dos neurónios da retina pertencentes ao grupo A ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ) e ao grupo B ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ) na situação controlo e quando as células foram expostas a NPY (100 nM). Os resultados são expressos em percentagem do número total de células analisadas em cada situação experimental (controlo e na presença de NPY), e representam a média  $\pm$  SEM de 74 a 138 células de 3 a 5 culturas independentes. \*\*\*  $p < 0,001$  comparativamente ao controlo; ANOVA de duas vias com teste de Bonferroni à posteriori.

Na presença de NPY (100 nM), a percentagem de neurónios no grupo A ( $49,1 \pm 4,8\%$ ) diminuiu significativamente comparativamente ao controlo ( $100,0 \pm 0,0\%$ ) e, conseqüentemente, aumentou a percentagem de neurónios no grupo B ( $50,9 \pm 4,8\%$ ; Figura 4.1 D).

#### **4.2.2 Efeito dos agonistas e antagonistas dos receptores do NPY nas variações da $[Ca^{2+}]_i$ induzidas por KCl nos neurónios da retina**

Na medida em que o efeito inibitório do NPY nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por KCl poderá ser devido à activação de diferentes tipos de receptores do NPY, analisou-se o efeito de vários agonistas (Figura 4.2) e antagonistas (Figura 4.3) dos receptores do NPY. Todos os agonistas dos receptores do NPY utilizados, excepto o agonista do receptor  $Y_2$  (NPY<sub>13-36</sub>; 300 nM), diminuíram significativamente a percentagem de células no grupo A e, conseqüentemente, aumentaram a percentagem de células no grupo B (Figura 4.2). O agonista dos receptores  $Y_1/Y_5$  ([Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>34</sup>]NPY; 100 nM) diminuiu a percentagem de células no grupo A para  $38,7 \pm 6,3\%$  comparativamente ao controlo ( $93,9 \pm 3,1\%$ ), aumentando a percentagem de células no grupo B ( $61,3 \pm 6,3\%$ ) relativamente à situação controlo ( $6,1 \pm 3,1\%$ ; Figura 4.2 A). Pelo contrário, o agonista do receptor  $Y_2$  (NPY<sub>13-36</sub>; 300 nM) não induziu qualquer alteração significativa na distribuição dos neurónios da retina, quer no grupo A ( $98,4 \pm 1,6\%$  no controlo e  $94,4 \pm 1,7\%$  com NPY<sub>13-36</sub>), quer no grupo B ( $1,6 \pm 1,6\%$  no controlo e  $5,6 \pm 1,7\%$  com NPY<sub>13-36</sub>) (Figura 4.2 B). O agonista do receptor  $Y_4$  (r-PP; 100 nM) reduziu a percentagem de células no grupo A de  $95,9 \pm 0,4\%$  no controlo para  $57,6 \pm 5,5\%$  e, conseqüentemente, aumentou a percentagem de células no grupo B de  $4,1 \pm 0,4\%$  no controlo para  $42,4 \pm 5,5\%$  com o agonista o r-PP (Figura 4.2 C). O agonista do receptor  $Y_5$  [(NPY<sub>19-23</sub>(Gly<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Gln<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Ala<sup>31</sup>, Aib<sup>32</sup>, Gln<sup>34</sup>)PP; 100 nM)] também diminuiu significativamente a percentagem de células no grupo A ( $93,5 \pm 3,6\%$  no controlo e  $66,6 \pm 3,0\%$  com o agonista do receptor  $Y_5$ ) e aumentou a percentagem de células no grupo B ( $6,5 \pm 3,6\%$  no controlo e  $33,4 \pm 3,0\%$  com o agonista do receptor  $Y_5$ ) (Figura 4.2 D). Estes resultados, globalmente, sugerem que o efeito inibitório do NPY nas variações da  $[Ca^{2+}]_i$  é mediado pela activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ .

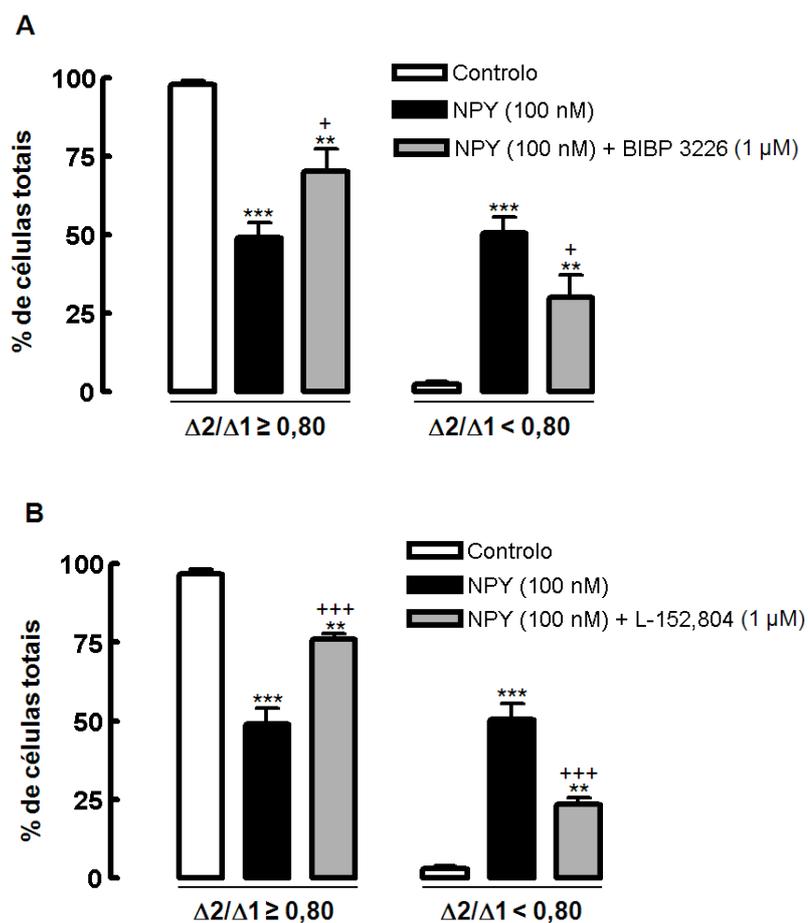


**Figura 4.2 – Efeito dos agonistas dos receptores do NPY nas variações da  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por KCl nos neurónios da retina.**

As células da retina foram expostas aos agonistas dos receptores do NPY, nomeadamente (A)  $[Leu^{31}Pro^{34}]NPY$  (agonista dos receptores  $Y_1/Y_5$ ; 100 nM), (B)  $NPY_{13-36}$  (agonista do receptor  $Y_2$ ; 300 nM), (C) r-PP (agonista do receptor  $Y_4$ ; 100 nM) e (D)  $NPY_{19-23}(Gly^1, Ser^3, Gln^4, Thr^6, Ala^{31}, Aib^{32}, Gln^{34})PP$  (agonista do receptor  $Y_5$ ; 100 nM). Os resultados são expressos como a percentagem de neurónios da retina no grupo A ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ) e no grupo B ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ) relativamente ao número total de células analisado, nas células controlo e nas células expostas a NPY, e representam a média  $\pm$  SEM de 53 a 240 células de 3 a 5 culturas independentes. n.s.  $p > 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparativamente ao controlo; ANOVA de duas vias com teste de Bonferroni à posteriori.

De forma a confirmar os resultados anteriores, as células da retina foram expostas ao NPY (100 nM) em combinação com os antagonistas dos receptores  $Y_1$  ou  $Y_5$  (Figura 4.3 A e B). Na presença do antagonista do receptor  $Y_1$  (BIBP3226; 1  $\mu M$ ), o efeito inibitório do NPY foi parcialmente abolido, dado que ocorreu um aumento na percentagem de células do grupo A ( $70,1 \pm 7,2\%$ ) e um decréscimo na percentagem de células no grupo B ( $29,9 \pm 7,2\%$ ), comparativamente à percentagem de células em ambos os grupos, quando estas são expostas apenas ao NPY ( $49,1 \pm 4,8\%$  no grupo A e  $50,9 \pm 4,8\%$  no grupo B; Figura 4.3 A). Do mesmo modo, o antagonista do receptor  $Y_5$  (L-152,804; 1  $\mu M$ ) também reduziu o efeito inibitório do NPY nas variações da  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 4.3 B), visto que a diminuição,

induzida pelo NPY, da percentagem de células no grupo A ( $49,1 \pm 4,8\%$ ) relativamente ao controlo ( $97,2 \pm 1,4\%$ ) foi parcialmente prevenida pelo L-152,804 ( $76,3 \pm 1,9\%$ ). Por outro lado, o aumento da percentagem de células no grupo B induzido pelo NPY ( $50,9 \pm 4,8\%$ ), comparativamente ao controlo ( $2,8 \pm 1,4\%$  das células analisadas), foi inibido na presença do antagonista do receptor  $Y_5$  ( $23,7 \pm 1,9\%$  das células analisadas) (Figura 4.3 B).



**Figura 4.3 – Efeito dos antagonistas dos receptores do NPY nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  evocadas por KCl e moduladas pelo NPY.**

As células da retina em cultura foram incubadas com NPY (100 nM) na ausência ou na presença **(A)** do antagonista do receptor  $Y_1$  (BIBP3226; 1  $\mu$ M) ou **(B)** do antagonista do receptor  $Y_5$  (L-152,804; 1  $\mu$ M). Os resultados são expressos em percentagem de neurónios da retina presentes no grupo A ( $\Delta 2/\Delta 1 \geq 0,80$ ) e no grupo B ( $\Delta 2/\Delta 1 < 0,80$ ) relativamente ao número total de células analisadas em cada situação experimental (controlo, células incubadas com NPY, ou células co-incubadas com NPY e os antagonistas dos receptores do NPY), e representam a média  $\pm$  SEM de 73 a 168 células de 3 a 5 culturas independentes. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparativamente ao controlo; +  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  comparativamente ao NPY. ANOVA de duas vias com teste de Bonferroni à posteriori.

### 4.3 Discussão

Sabe-se que o NPY e os seus receptores, nomeadamente os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ , estão presentes na retina de diferentes espécies<sup>(Bruun et al., 1986; Jen et al., 1994; Oh et al., 2002; Yoon et al., 2002; D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>. Por outro lado, existem estudos que sugerem que este peptídeo é provavelmente libertado da retina em resposta a determinados estímulos visuais, nomeadamente estimulação com luz de elevada frequência ou por despolarização<sup>(Bruun et al., 1991)</sup>. Estas evidências indicam que o NPY poderá mediar o processamento da informação visual na retina<sup>(Sinclair et al., 2004)</sup>.

No SNC, o NPY modula a excitabilidade neuronal através de múltiplos mecanismos pré- e pós-sinápticos, que estão associados à modulação da libertação de neurotransmissores, hormonas e neuromoduladores, tais como o glutamato, GABA, adrenalina, dopamina, 5-HT, hormona do crescimento e somatostatina, entre outros<sup>(Silva et al., 2005a)</sup>. Relativamente à retina, aplicações exógenas de NPY também afectam a libertação de alguns neurotransmissores, tais como a glicina, dopamina, 5-HT e GABA na retina de coelho e de pinto<sup>(Bruun and Ehinger, 1993; Ortrud Uckermann, 2006)</sup>. Além disso, o NPY inibe também a actividade da adenilciclase, na retina de coelho<sup>(Bruun et al., 1994)</sup>.

O  $Ca^{2+}$  é um sinal intracelular ubíquo responsável pelo controlo de inúmeras respostas celulares<sup>(Berridge et al., 2000)</sup> e, por isso, os neurónios necessitam de regular rigorosamente a  $[Ca^{2+}]_i$ , de forma a evitar uma ineficiente sinalização de  $Ca^{2+}$  que, em última instância, poderá resultar em morte celular<sup>(Sattler and Tymianski, 2000)</sup>. Em neurónios e sinaptossomas de hipocampo, os sinais de  $Ca^{2+}$  são inibidos pela aplicação de NPY<sup>(Bleakman et al., 1992; Silva et al., 2001, 2003a)</sup>. De igual forma, na região CA1 do hipocampo, a transmissão sináptica excitatória é inibida pelo NPY, através da redução do influxo de  $Ca^{2+}$ <sup>(Colmers et al., 1988)</sup>. Mais ainda, em neurónios talâmicos e células ganglionares, a presença de NPY reduz as correntes de  $Ca^{2+}$ <sup>(Bleakman et al., 1991; Sun et al., 2001)</sup>. Outros estudos demonstraram ainda que o NPY inibe correntes de  $Ca^{2+}$  e de  $K^+$  nos neurónios do "arcuate nucleus"<sup>(Sun and Miller, 1999)</sup>.

No que diz respeito ao presente estudo, verificou-se que o NPY inibe as variações da  $[Ca^{2+}]_i$  em neurónios da retina de rato despolarizados com KCl. No entanto, o efeito inibitório do NPY não é evidente em todos os neurónios da retina e, por este motivo, considerou-se a existência de dois grupos distintos de neurónios: um grupo de células que não responde ao NPY e outro grupo de células que responde ao peptídeo. De facto, é provável que alguns neurónios da retina não expressem receptores do NPY, ou então possam expressar estes receptores, mas que não estejam acoplados à regulação da  $[Ca^{2+}]_i$ . Assim, nos neurónios que respondem a NPY, o efeito inibitório induzido pelo NPY

foi mediado pela activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ , mas não pelo subtipo  $Y_2$ .

Até ao momento, conhece-se apenas um trabalho que demonstra que o influxo de  $Ca^{2+}$  em células bipolares da retina é inibido pelo NPY, através da activação do receptor  $Y_2$  (D'Angelo and Brecha, 2004). No córtex de rato, o receptor do NPY do subtipo  $Y_1$  é responsável pela redução da entrada de  $Ca^{2+}$  e consequente inibição da libertação de glutamato (Wang, 2005). A modulação da  $[Ca^{2+}]_i$  em neurónios do hipocampo de rato deve-se também à activação do receptor  $Y_1$ . Contudo, estudos realizados em sinaptossomas e neurónios de hipocampo demonstraram que, paralelamente à activação do receptor  $Y_1$ , o receptor do NPY do subtipo  $Y_2$  também modula a  $[Ca^{2+}]_i$  induzida por KCl (Silva et al., 2001, 2003a). Mais recentemente, foi revelado que, em culturas organotípicas de hipocampo de rato, a activação dos receptores  $Y_1$  e  $Y_2$  promove a activação de mecanismos neuroprotectores contra a excitotoxicidade celular (Xapelli et al., 2007). Em neurónios talâmicos, a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  induzida pelo NPY é mediada pela activação do receptor  $Y_2$  (Sun et al., 2001). No caso dos neurónios do "arcuate nucleus", múltiplos receptores do NPY ( $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ ) regulam as condutâncias de  $Ca^{2+}$  e de  $K^+$ , promovendo a redução da excitabilidade neuronal e da libertação de neurotransmissores (Sun and Miller, 1999). Deste modo, estas evidências, conjuntamente com os resultados apresentados neste capítulo, indicam que diferentes subtipos de receptores do NPY poderão mediar o mesmo efeito deste peptídeo. De facto, no presente trabalho, a modulação da  $[Ca^{2+}]_i$  nos neurónios da retina envolveu a activação dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ . O envolvimento destes receptores foi demonstrado através de estudos farmacológicos, com recurso a agonistas e antagonistas selectivos para os diferentes subtipos de receptores do NPY, verificando-se que o bloqueio dos receptores do subtipo  $Y_1$  e  $Y_5$  foi capaz de reduzir o efeito inibitório produzido pelo NPY. Apesar de tudo, esta inibição não foi completa, devido ao facto de mais do que um receptor poder estar envolvido na mesma função. Além disso, é provável que tais receptores se encontrem distribuídos heterogeneamente nos neurónios da retina e, em alguns neurónios, poderá haver um receptor com um papel predominante.

Está estabelecido que a alteração da homeostase do  $Ca^{2+}$  pode conduzir à morte neuronal (Sattler and Tymianski, 2000). Por exemplo, a activação excessiva dos receptores ionotrópicos do glutamato causa um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  que poderá desencadear processos que resultam em morte celular. Este evento descreve a excitotoxicidade e pensa-se que seja um dos principais mecanismos que contribuem para a neurodegeneração do SNC, em situações de isquémia, trauma ou outras doenças neurodegenerativas (Sattler and Tymianski, 2000).

De facto, a neurotoxicidade induzida pelo glutamato foi demonstrada na retina de murganho, rato, coelho e pinto<sup>(Olney, 1969; Olney et al., 1986; Osborne et al., 1996; D'Angelo and Brecha, 2004)</sup>, sendo a mesma fortemente dependente da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ <sup>(Choi, 1988)</sup>. Em células ganglionares da retina, que expressam receptores ionotrópicos do glutamato, também se verificou a ocorrência de apoptose em consequência do aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>(Colombaioni et al., 1998)</sup>. Adicionalmente às propriedades moduladoras do NPY, este peptídeo também exerce efeitos neuroprotectores, os quais poderão estar associados com o seu efeito inibitório na libertação de glutamato, tal como foi descrito no hipocampo de rato<sup>(Silva et al., 2003c; Silva et al., 2005c; Silva et al., 2007)</sup>. De facto, nas células da retina em cultura, verificámos que o NPY previne a morte celular induzida por glutamato<sup>(Álvaro et al., 2007a)</sup>. Assim, o potencial efeito protector do NPY pode dever-se quer à redução da  $[Ca^{2+}]_i$ , quer à diminuição da libertação de glutamato.

Em conclusão, neste trabalho, demonstrou-se que o NPY inibe o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em neurónios da retina, através da activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ . Além disso, o efeito inibitório do NPY nos aumentos da  $[Ca^{2+}]_i$  poderá constituir um potencial mecanismo neuroprotector do NPY na retina, nomeadamente na prevenção da morte das células ganglionares, característica do glaucoma. A redução dos níveis de  $Ca^{2+}$  também poderá contribuir para reduzir a libertação de glutamato nas células da retina e, desse modo, prevenir a activação excessiva dos receptores ionotrópicos do glutamato, principalmente nas células ganglionares, onde estes receptores são abundantemente expressos.







## **Capítulo 5**

***O Neuropeptídeo Y estimula a proliferação das  
células da retina em cultura:  
envolvimento do monóxido de azoto***



## **5.1 Introdução**

Várias evidências sugerem que o NPY modula a proliferação celular. O NPY inibe a proliferação de células do epitélio pigmentado da retina humana<sup>(Troger et al., 2003)</sup> mas, por outro lado, estimula a proliferação de células de Müller<sup>(Milenkovic et al., 2004)</sup>, neuroblastos do epitélio olfactivo<sup>(Hansel, 2001)</sup>, células endoteliais<sup>(Movafagh et al., 2006)</sup> e células precursoras do hipocampo de rato<sup>(Howell et al., 2003; Howell et al., 2005; Howell et al., 2007)</sup>. A retina contém células precursoras, detectadas por marcação para a nestina, que continuam a dividir-se e a produzir novos neurónios, durante o desenvolvimento pós-natal e na vida adulta<sup>(Johns, 1977; Turner and Cepko, 1987; Perron and Harris, 2000; Mayer et al., 2005)</sup>. Contudo, o papel do NPY na proliferação de células da retina de rato não é conhecido.

O NO desempenha um papel estimulador ou inibidor da proliferação celular, dependendo da concentração<sup>(Matarredona et al., 2005; Meini et al., 2006)</sup>. O NO activa a GCs, promovendo o aumento dos níveis intracelulares de GMPc<sup>(Southam and Garthwaite, 1993)</sup>. Na retina interna, a GCs está presente em níveis elevados, sugerindo que a via do NO-GMPc está implicada na modulação do processamento da informação visual<sup>(Gotzes et al., 1998; Ding and Weinberg, 2007)</sup>.

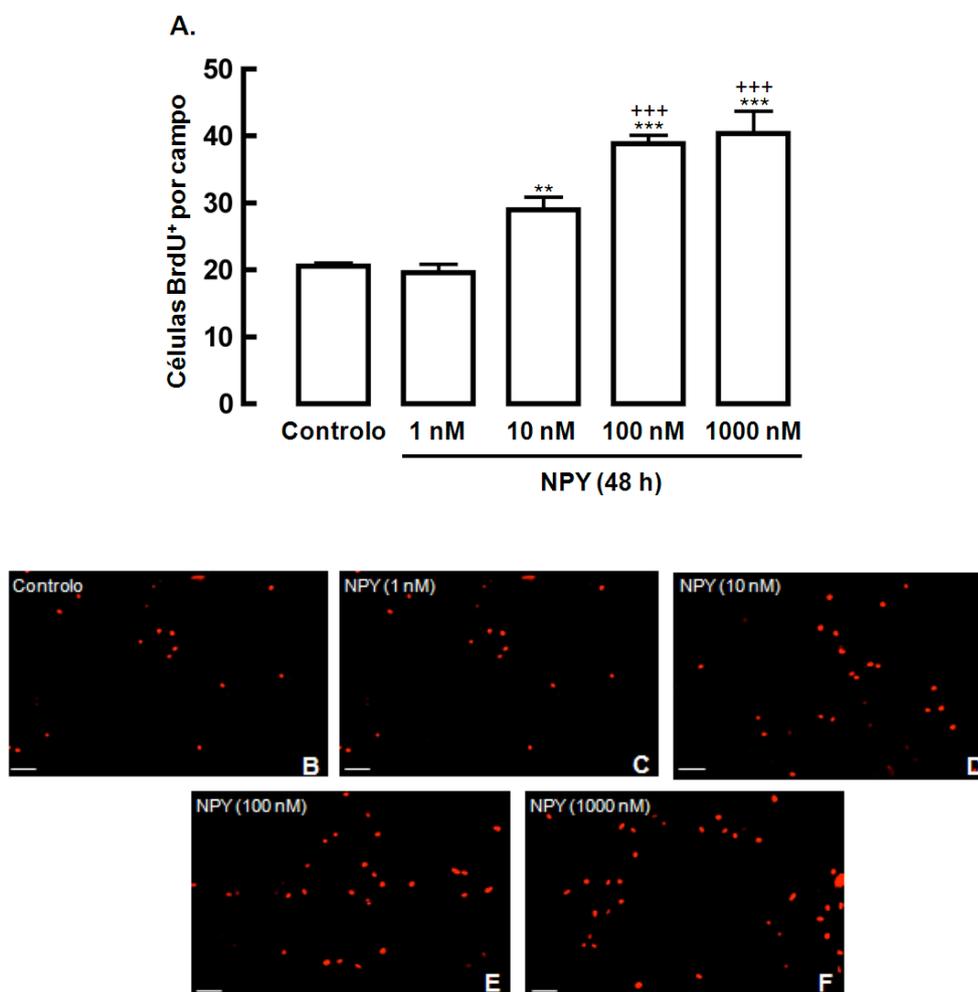
Por outro lado, a ERK 1/2 é capaz de converter estímulos extracelulares em sinais intracelulares, que controlam a expressão de genes reguladores da proliferação e da diferenciação celulares, os quais actuam ao nível do bloqueio do ciclo celular entre as fases G1 e S<sup>(Cano and Mahadevan, 1995; Sherr, 1996; English et al., 1999)</sup>. Na retina, a proliferação e migração celulares são também reguladas pela ERK 1/2<sup>(Grant et al., 2001; Hecquet et al., 2002)</sup>. Outros estudos demonstraram que a activação dos receptores do NPY induz a fosforilação da ERK 1/2<sup>(Hansel, 2001; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005)</sup>.

A proliferação e diferenciação de células progenitoras na retina podem constituir uma possível estratégia para a regeneração da retina em situações fisiopatológicas. Deste modo, os objectivos deste capítulo foram: 1) investigar o papel do NPY e dos seus receptores, na proliferação das células da retina de rato; 2) investigar o envolvimento das vias de sinalização do NO-GMPc e da ERK 1/2, no efeito proliferativo induzido pelo NPY nas células da retina de rato.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 O NPY estimula a proliferação de células da retina de rato em cultura

A proliferação de células da retina de rato foi avaliada pela incorporação de BrdU. Na situação controlo, detectaram-se  $21 \pm 1$  células positivas para o BrdU (células BrdU<sup>+</sup>) por campo (Figuras 5.1 A e B).



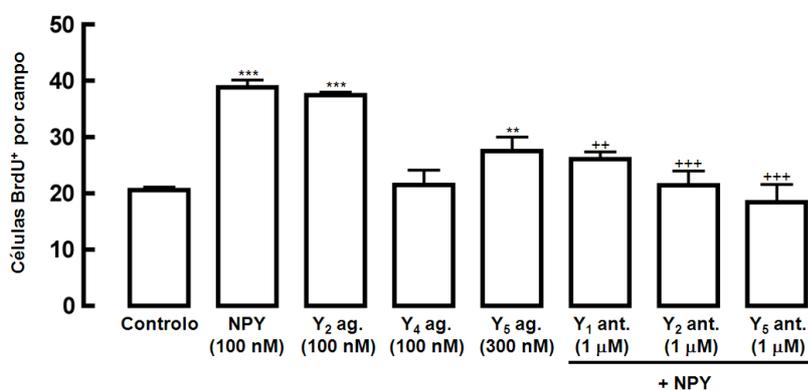
**Figura 5.1 – O NPY aumenta a proliferação de células da retina.**

A proliferação celular foi quantificada através da incorporação de BrdU ao longo de 16 h. (A) Quantificação de células BrdU<sup>+</sup> por campo. As células da retina foram expostas a NPY (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1000 nM) durante 48 h. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos 4 experiências independentes. (B-D) Imagens representativas de células em cultura na situação controlo e incubadas com NPY, onde se pode observar as células BrdU<sup>+</sup> (marcação a vermelho). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente ao controlo; ANOVA de uma via e teste à posteriori de Dunnet; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparativamente ao NPY (10 nM); ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori. Escala: 50  $\mu$ m.

No entanto, a incubação com NPY, durante 48 h, provocou um aumento do número de células BrdU<sup>+</sup> de um modo dependente da concentração. A concentração mais baixa de NPY (1 nM) testada não induziu qualquer alteração no número de células BrdU<sup>+</sup> por campo (Figuras 5.1 A e C), comparativamente ao controlo. Contudo, quando as células foram expostas a 10 nM de NPY, o número de células BrdU<sup>+</sup> por campo (29 ± 2 células BrdU<sup>+</sup>) aumentou 40,5%, em comparação com o controlo, e concentrações mais elevadas de NPY (100 e 1000 nM) duplicaram o número de células BrdU<sup>+</sup> (39 ± 1 e 40 ± 3 células BrdU<sup>+</sup>, respectivamente), em comparação com a situação controlo (Figuras 5.1 A, D, E e F). O NPY não causou morte celular, conforme verificado pelo ensaio de incorporação de PI (ver Figura 6.4).

### **5.2.2 O NPY promove a proliferação das células da retina através da activação dos receptores do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub>**

No sentido de se determinar quais os receptores do NPY que poderiam estar envolvidos no efeito estimulador da proliferação celular induzido pelo NPY, recorreu-se a ferramentas farmacológicas, designadamente a agonistas e antagonistas dos receptores do NPY (Figura 5.2).



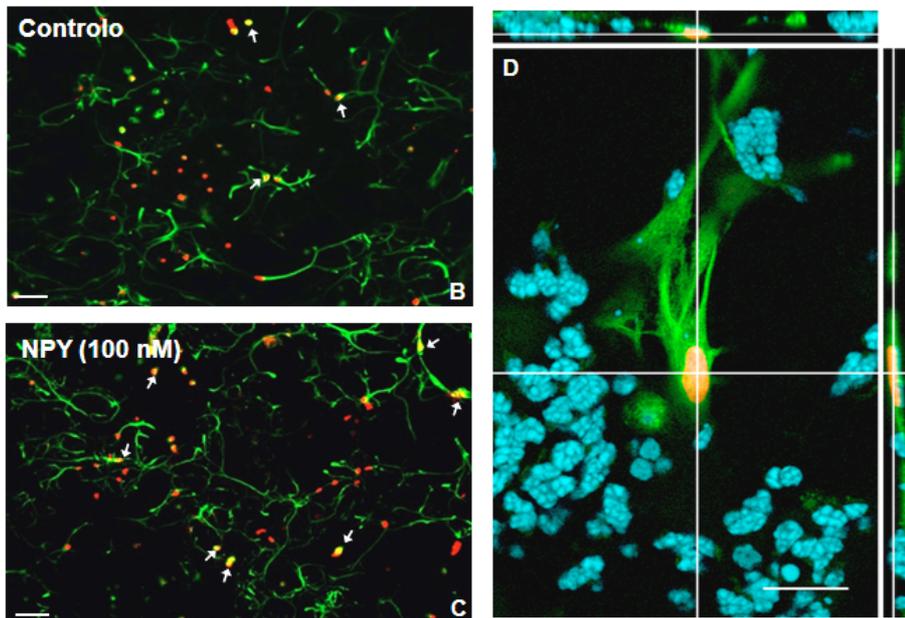
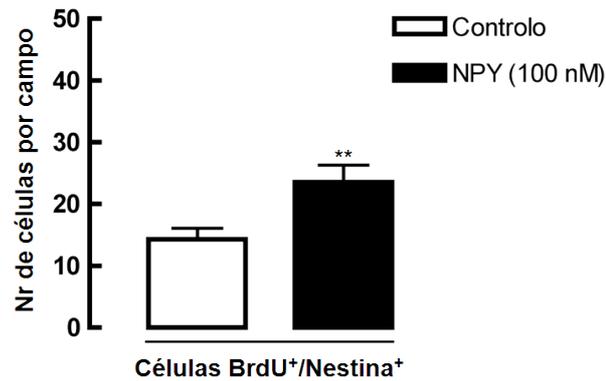
**Figura 5.2 – O efeito proliferativo do NPY nas células da retina é mediado pelos receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub>.**

Quantificação das células BrdU<sup>+</sup> por campo em culturas da retina tratadas com agonistas e antagonistas dos receptores do NPY, durante 48 h, indicados por baixo de cada barra: agonista do receptor Y<sub>2</sub> (Y<sub>2</sub> ag., NPY<sub>13-36</sub>, 100 nM), agonista do receptor Y<sub>4</sub> (Y<sub>4</sub> ag., r-PP, 100 nM), agonista do receptor Y<sub>5</sub> (Y<sub>5</sub> ag., NPY<sub>19-23</sub>(Gly<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Gln<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Ala<sup>31</sup>, Aib<sup>32</sup>, Gln<sup>34</sup>), 300 nM), antagonista do receptor Y<sub>1</sub> (Y<sub>1</sub> ant., BIBP3226, 1 μM), antagonista do receptor Y<sub>2</sub> (Y<sub>2</sub> ant., BIIE0246, 1 μM) e antagonista do receptor Y<sub>5</sub> (Y<sub>5</sub> ant., L-152,804, 1 μM). Os resultados representam a média ± SEM de pelo menos 3 experiências independentes. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, comparativamente ao controlo; ANOVA de uma via com teste de Dunnet à posteriori; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, comparativamente ao NPY, ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.

O agonista do receptor  $Y_2$  (NPY<sub>13-36</sub> 100 nM, 48 h) induziu um efeito semelhante ao observado com o NPY (100 nM), uma vez que aumentou duas vezes o número de células BrdU<sup>+</sup> por campo ( $38 \pm 1$  células BrdU<sup>+</sup>). O antagonista do receptor  $Y_2$ , BIIE0246 (1  $\mu$ M) inibiu completamente o efeito proliferativo do NPY ( $21 \pm 3$  células BrdU<sup>+</sup>). O agonista do receptor  $Y_5$  [(NPY<sub>19-23</sub>(Gli<sup>1</sup>, Ser<sup>3</sup>, Gln<sup>4</sup>, Thr<sup>6</sup>, Ala<sup>31</sup>, Aib<sup>32</sup>, Gln<sup>34</sup>)PP, 300 nM] aumentou 36% o número das células BrdU<sup>+</sup>, em comparação com a situação controlo, e o antagonista do receptor  $Y_5$ , L-152,804, inibiu por completo a proliferação celular promovida pelo NPY ( $18 \pm 3$  células BrdU<sup>+</sup>), comparativamente à situação controlo. O agonista do receptor  $Y_4$  (r-PP, 100 nM) não alterou o número de células BrdU<sup>+</sup> por campo. Além disso, o antagonista do receptor  $Y_1$ , BIBP3226 (1  $\mu$ M) também inibiu a proliferação celular induzida pelo NPY. Os antagonistas dos receptores do NPY, por si só, não causaram efeito na proliferação celular.

### **5.2.3 O NPY aumenta a proliferação de células precursoras da retina**

O efeito do NPY, na proliferação das células progenitoras da retina presentes na cultura, também foi avaliado. A nestina é um filamento intermédio marcador de células progenitoras neuronais<sup>(Mayer et al., 2003)</sup>. Nesta cultura, detectaram-se diversas células, por imunocitoquímica, que expressavam nestina, e que também eram positivas para BrdU (células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>) (Figura 5.3). Na situação controlo, o número de células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup> por campo foi de  $14 \pm 2$ . No entanto, quando as células foram expostas a NPY (100 nM), durante 48 h, observou-se um aumento de 65% no número de células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup> ( $24 \pm 3$  células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>).

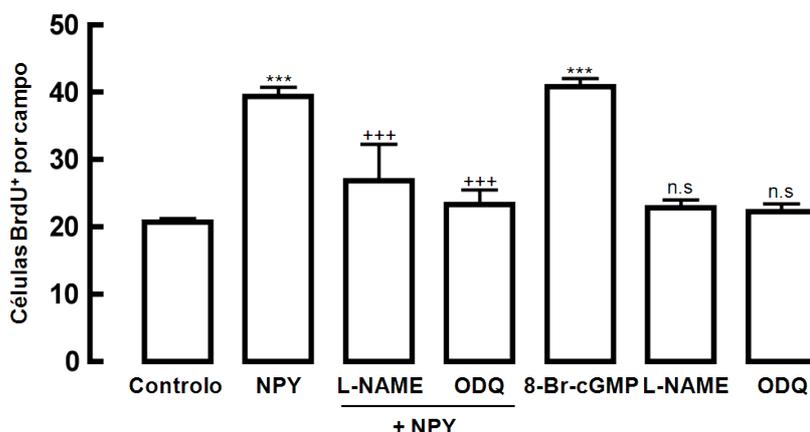


**Figura 5.3 – O NPY aumenta a proliferação das células progenitoras da retina.**

(A) Quantificação do número de células positivas para BrdU e nestina (BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>) por campo. As culturas de células da retina foram expostas a NPY (100 nM) durante 48 h. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos 4 experiências independentes. \*\* $p < 0,01$ , comparativamente ao controlo, teste t de *Student*; (B, C) Imagens representativas de culturas de células da retina mostrando células positivas para nestina (verde) e BrdU (vermelho). A co-localização (amarelo) de nestina e BrdU na situação controlo (B) e nas células incubadas com NPY (C) está indicada por setas. Escala: 50  $\mu$ m. (D) Imagem de maior ampliação da co-localização de nestina e BrdU nas células em proliferação (projectção ortogonal utilizando secções ópticas com 0,2  $\mu$ m de espessura). Escala: 20  $\mu$ m.

### 5.2.4 O efeito proliferativo do NPY é mediado pela via do NO-GMPc

A função do NO na proliferação das células da retina induzida pelo NPY foi investigada. Para tal, as células da retina em cultura foram incubadas simultaneamente com NPY e com um inibidor da NOS (L-NAME, 500  $\mu$ M), durante 48 h. Este inibidor reduziu significativamente o efeito estimulador do NPY na proliferação celular, como se pode verificar pelo decréscimo do número de células BrdU<sup>+</sup> por campo ( $27 \pm 5$  células BrdU<sup>+</sup>) (Figura 5.4). Na presença do inibidor da GCs (ODQ, 50  $\mu$ M), ocorreu uma inibição completa da proliferação celular induzida pelo NPY ( $23 \pm 3$  células BrdU<sup>+</sup>). De forma a confirmar o envolvimento do GMPc na proliferação celular, as células da retina foram incubadas com um composto análogo do GMPc, o 8-Br-GMPc (20  $\mu$ M, 48 h), tendo ocorrido uma duplicação no número de células BrdU<sup>+</sup> por campo ( $41 \pm 1$  células BrdU<sup>+</sup>), em comparação com a situação controlo ( $21 \pm 1$  células BrdU<sup>+</sup>). O efeito do 8-Br-GMPc foi semelhante ao efeito do NPY ( $39 \pm 1$  células BrdU<sup>+</sup>). Os compostos L-NAME e ODQ não alteraram o número de células BrdU<sup>+</sup> comparativamente ao controlo.

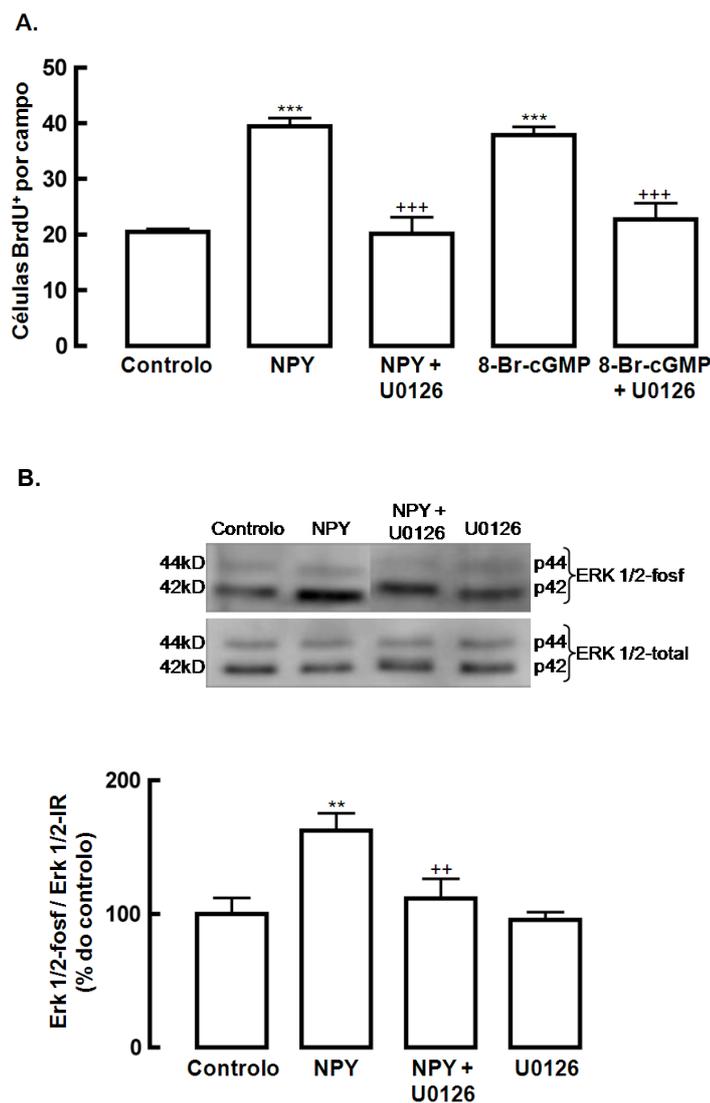


**Figura 5.4 – A via do NO-GMPc medeia a proliferação das células da retina induzida pelo NPY.** Quantificação das células BrdU<sup>+</sup> por campo. As células foram incubadas com NPY (100 nM), ou co-incubadas com NPY e com o inibidor da NOS (L-NAME, 500  $\mu$ M, 48 h) ou com o inibidor da GCs (ODQ, 50  $\mu$ M, 48 h). As células foram também incubadas com o composto análogo do GMPc (8-Br-GMPc, 20  $\mu$ M, 48 h). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes. n.s -  $p > 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparativamente ao controlo; +++ $p < 0,001$  comparativamente ao NPY 100 nM; ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.

### **5.2.5 O efeito proliferativo do NPY é mediado pela activação da ERK 1/2**

No sentido de esclarecer melhor os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito proliferativo do NPY, investigou-se também o envolvimento da ERK 1/2. O inibidor da MEK 1/2 (U0126, 1  $\mu$ M) inibiu o efeito estimulador do NPY e do 8-Br-GMPc (análogo activo do GMPc) (Figura 5.5 A).

Além disso, por “*western blot*”, o NPY causou um aumento de  $62,3 \pm 13,0\%$  na razão entre a imunoreactividade da ERK 1/2 fosforilada e a da ERK 1/2 total (ERK 1/2-fosf / ERK 1/2-total), após uma incubação com NPY, durante 10 minutos, em comparação com a situação controlo (Figura 5.5 B). Do mesmo modo, demonstrou-se que o inibidor da MEK 1/2, U0126, aboliu o aumento na fosforilação da ERK 1/2 induzida pelo NPY. Por si só, o inibidor U0126 não causou qualquer efeito na fosforilação da ERK 1/2 (Figura 5.5 B) e também não alterou a proliferação ou a viabilidade celular, avaliadas pelo ensaio do MTT.



**Figura 5.5 – A activação da via de sinalização da ERK 1/2 medeia o efeito proliferativo do NPY nas células da retina.**

**(A)** Quantificação das células BrdU<sup>+</sup> por campo. As culturas da retina foram expostas a NPY (100 nM) ou a 8-Br-GMPc (20  $\mu$ M) durante 48 h, na ausência ou na presença do inibidor da ERK 1/2 (U0126, 1  $\mu$ M, 48 h). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes.

**(B)** Efeito do NPY nos níveis de fosforilação da ERK 1/2. As culturas foram incubadas com NPY durante 10 minutos, na ausência ou na presença do inibidor da ERK 1/2 (U0126). Os níveis de fosforilação da ERK 1/2 foram detectados por “western blot”. Os valores estão expressos como percentagem da razão entre a imunoreactividade da ERK 1/2 fosforilada (ERK 1/2-fosf) e a imunoreactividade da ERK 1/2 total (ERK 1/2-total-IR) na situação controlo. As imagens representativas dos “western blot” relativos à ERK 1/2 fosforilada e à ERK 1/2 total encontram-se por cima das respectivas barras do gráfico. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , comparativamente ao controlo, ANOVA de uma via com teste de Dunnet à posteriori; ++ $p < 0,01$  comparativamente ao NPY; +++ $p < 0,001$  comparativamente ao NPY ou 8-Br-GMPc, ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.

### **5.3 Discussão**

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão do NPY ocorre em fases precoces do desenvolvimento da retina, sugerindo que o NPY poderá ter uma função na modulação do desenvolvimento dos circuitos retinianos<sup>(Ferriero and Sagar, 1989; Jen et al., 1994; Jotwani et al., 1994; Bagnoli et al., 2003)</sup>.

No presente capítulo, demonstra-se que o NPY duplicou a proliferação das células da retina. Além disso, o NPY estimulou a proliferação de células progenitoras neuronais (células BrdU<sup>+</sup>/nestina<sup>+</sup>) da retina. Estes resultados sugerem que o NPY promove a proliferação de células diferenciadas e de células imaturas neuronais da retina. Estudos anteriores demonstraram que o NPY está também envolvido na proliferação de neuroblastos do epitélio olfactivo, células precursoras do hipocampo e neurónios entéricos de rato<sup>(Hansel, 2001; Howell et al., 2003; Howell et al., 2005; Anitha et al., 2006; Howell et al., 2007)</sup>.

Farmacologicamente, demonstrou-se que o aumento da proliferação celular promovido pelo NPY ocorreu por intermédio da activação dos receptores do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub>. No entanto, o subtipo de receptores do NPY envolvidos no efeito proliferativo induzido pelo NPY noutro tipo de células é, ainda, um assunto controverso. Na maioria dos estudos, o receptor Y<sub>1</sub> parece ser aquele que desempenha um papel principal no efeito proliferativo do NPY<sup>(Hansel, 2001; Howell et al., 2003; Cho and Kim, 2004; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005; Anitha et al., 2006; Howell et al., 2007)</sup>. Por outro lado, nas células do músculo liso vasculares e nas células endoteliais, o efeito mitogénico do NPY é mediado pelos receptores do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub><sup>(Zukowska-Grojec et al., 1998a; Lee et al., 2003b; Kitlinska et al., 2005; Movafagh et al., 2006)</sup>. O envolvimento de mais do que um receptor para o mesmo efeito ou função poderá sugerir a formação de dímeros<sup>(Gomes et al., 2000; Overton and Blumer, 2000; Dean et al., 2001; Devi, 2001; Angers et al., 2002)</sup>. De facto, a dimerização é um mecanismo adicional, na modulação da função de receptores, e uma forma de comunicação recíproca entre receptores acoplados a proteínas G<sup>(Gomes et al., 2001)</sup>. Em relação aos receptores do NPY, alguns estudos funcionais e moleculares sugerem ou demonstram que os homo- e heterodímeros são funcionais<sup>(Berglund et al., 2003b; Dinger et al., 2003; Silva et al., 2003a; Movafagh et al., 2006)</sup>.

No sentido de compreender melhor os mecanismos intracelulares subjacentes à estimulação da proliferação das células da retina pelo NPY, investigou-se também o envolvimento do NO e das proteínas MAPK. Sabe-se que todas as isoformas da NOS estão presentes na retina<sup>(Lopez-Costa et al., 1997; Leal et al., 2007; Piehl et al., 2007)</sup>. A nNOS foi detectada, maioritariamente, nas células amácrinas da camada nuclear interna e nos prolongamentos celulares existentes nas camadas plexiformes interna e externa, enquanto que a iNOS está

presente nos corpos celulares localizados na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares e, também, nos prolongamentos das células de Müller localizados nas camadas plexiforme interna e de células ganglionares<sup>(Lopez-Costa et al., 1997)</sup>.

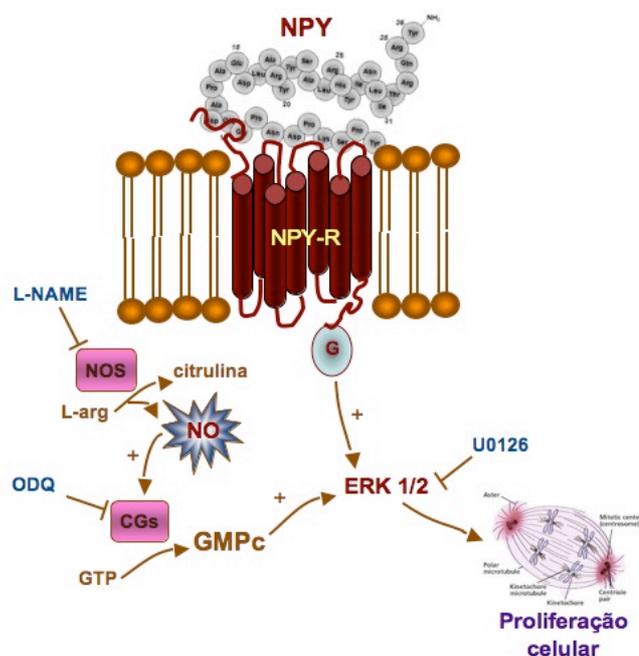
Tem sido demonstrado que o NO tem acções quer anti-, quer pró-proliferativas, dependendo do tipo celular e da concentração de NO<sup>(Du et al., 1997; Hajri et al., 1998; Krischel et al., 1998; Ulibarri et al., 1999; Frank et al., 2000; Kim et al., 2002; Packer et al., 2003; Luczak et al., 2004; Cayre et al., 2005; Matarredona et al., 2005; Bal-Price et al., 2006; Magalhaes et al., 2006; Tao et al., 2006; Villalobo, 2006; Zhu et al., 2006; Mejia-Garcia and Paes-de-Carvalho, 2007)</sup>. Neste trabalho, demonstrou-se que o aumento da proliferação das células da retina induzido pelo NPY foi abolido na presença do inibidor da NOS, L-NAME, e também pelo inibidor da GCs, ODQ, sugerindo que a via NO-GC medeia a proliferação das células da retina estimulada pelo NPY. O efeito proliferativo do NO já tinha sido previamente demonstrado em retinas de ratos recém-nascidos, tratados com um substrato da NOS, a L-arginina<sup>(Kim et al., 2002)</sup>. Não obstante, recentemente, outro estudo refere que um dador externo de NO, o SNAP (“S-nitroso-acetyl-d-l-penicillamine”), inibe a proliferação celular em retinas embrionárias de pinto<sup>(Mejia-Garcia and Paes-de-Carvalho, 2007)</sup>. A intercomunicação entre o NPY e o NO também foi detectada em outros sistemas, onde a produção de NO é estimulada pela activação do receptor do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, nomeadamente em culturas de granulócitos de rato e nas células cromafins de murganhos<sup>(Dimitrijevic et al., 2006; Rosmaninho-Salgado et al., 2007)</sup>.

Como foi referido anteriormente, o efeito proliferativo do NPY envolve a activação da GCs, uma vez que o ODQ inibiu o efeito proliferativo do NPY. Além disso, o análogo do GMPc, o 8-Br-GMPc, produziu um efeito idêntico ao NPY. Em neurónios motores e em células endoteliais humanas, o GMPc está também envolvido no aumento da proliferação celular<sup>(Hood and Granger, 1998; Zhang et al., 2003)</sup>. Deste modo, os resultados obtidos sugerem, consistentemente, que o efeito do NPY na proliferação celular das células da retina de rato em cultura está relacionado com a activação da via NO-GMPc.

O possível envolvimento da ERK 1/2 na proliferação de células da retina induzida pelo NPY foi, também, investigado. O inibidor da MEK 1/2, U0126, bloqueou o efeito proliferativo do NPY e o aumento de fosforilação da ERK 1/2 induzida pelo NPY. Estes resultados indicam que o efeito pró-proliferativo do NPY nas células da retina de rato é mediado pela activação da ERK 1/2. O efeito proliferativo do NPY mediado pela via da ERK 1/2 foi também encontrado nas células precursoras do hipocampo de rato e da retina de pinto e em neurónios entéricos de rato, células de Müller de cobaias e células do epitélio pigmentado da retina<sup>(Cobb, 1999; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005; Anitha et al., 2006; Hashimoto et al., 2006; Spence et al., 2007)</sup>. Além disso, tem vindo a ser demonstrado que a activação dos receptores do NPY do

subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$  pode desencadear a fosforilação da ERK 1/2<sup>(Mullins et al., 2002)</sup>, embora a maioria dos estudos proponha que o efeito proliferativo do NPY esteja relacionado com a activação do receptor do NPY do subtipo  $Y_1$  acoplado à fosforilação da ERK 1/2<sup>(Hansel, 2001; Cho and Kim, 2004; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005)</sup>. Neste estudo, o efeito proliferativo do NPY foi mediado pela activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$  e, provavelmente, com base em estudos anteriores, todos estes receptores activam a ERK 1/2.

Em conclusão, O NPY pode actuar como agente proliferativo nas células da retina, incluindo as células progenitoras, através da activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ . O efeito do NPY é mediado pela activação da via da NOS-GCs que, por sua vez, activa a via de sinalização da ERK 1/2 (Figura 5.6). A capacidade do NPY para estimular a proliferação de células progenitoras da retina e a compreensão dos mecanismos intracelulares neste processo poderão permitir desenvolver novas estratégias para o tratamento de doenças degenerativas da retina, tais como glaucoma e retinopatia diabética.



**Figura 5.6 – Esquema descritivo dos mecanismos intracelulares envolvidos na proliferação de células da retina em cultura estimulada pelo NPY.**

O NPY activa os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$  do NPY (NPY-R) que, por sua vez, vão estimular a sintase do monóxido de azoto (NOS). O monóxido de azoto (NO) produzido activa a guanilil ciclase solúvel (GCs) e, conseqüentemente, a síntese de GMPc a partir de GTP, que irá induzir a proliferação celular através da activação da cinase reguladora do sinal extracelular (ERK) 1/2. A activação dos NPY-R também poderá estimular a fosforilação da ERK 1/2, através de outras vias e, conseqüentemente, estimular a proliferação celular. Os inibidores da NOS (L-NAME), GCs (ODQ) e ERK 1/2 (U0126) previnem o efeito do NPY.







## **Capítulo 6**

***O efeito protector do NPY na toxicidade induzida pela  
MDMA nas células da retina em cultura***



## 6.1 Introdução

A MDMA é um derivado da anfetamina, que é usualmente consumida em bares e discotecas, e cujos efeitos são, em parte, mediados pela libertação de 5-HT e, consequentemente, pela estimulação excessiva dos seus receptores<sup>(Ricaurte et al., 2000; Parrott, 2005; Cadet et al., 2007)</sup>, o que poderá levar à degeneração dos terminais serotoninérgicos<sup>(Stone et al., 1986; Schmidt, 1987; Ricaurte et al., 1988b)</sup>. Neste contexto, existem estudos em animais, nos quais se utilizaram diversos marcadores serotoninérgicos, que demonstram a ocorrência desta degeneração<sup>(Commins et al., 1987; Ricaurte et al., 1988a; Ricaurte et al., 1988b; Ricaurte et al., 1992; Green et al., 2003; Xie et al., 2006)</sup>. Outros estudos relatam o envolvimento dos receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>2A</sub>, no mecanismo de toxicidade induzida pela MDMA<sup>(Schmidt et al., 1990; Johnson et al., 1993; Malberg et al., 1996; Capela et al., 2006b; Capela et al., 2007)</sup>. A morte celular ocorre principalmente por apoptose, através da activação da caspase-3<sup>(Montiel-Duarte et al., 2002; Jimenez et al., 2004; Meyer et al., 2004; Cunha-Oliveira et al., 2006; Tamburini et al., 2006; Warren et al., 2007)</sup>.

Além do envolvimento da 5-HT, e principalmente do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, na toxicidade causada pela MDMA em células neuronais, sabe-se ainda que existe uma forte correlação entre a toxicidade da MDMA e a hipertermia<sup>(Henry, 1992; Malberg and Seiden, 1998; Carvalho et al., 2002; Green et al., 2003)</sup>. Após o consumo de MDMA, a temperatura corporal pode atingir os 43 °C, podendo, nestas circunstâncias, ser fatal<sup>(Henry, 1992; Green et al., 2003)</sup>. Esta evidência é importante, na medida em que a MDMA é consumida em festas cujos ambientes atingem temperaturas elevadas, o que poderá intensificar o efeito da MDMA na termorregulação. O efeito da hipertermia foi analisado também em estudos animais, verificando-se que a administração de MDMA em ratos provoca um aumento da temperatura corporal e, consequentemente, um aumento da neurotoxicidade<sup>(Malberg and Seiden, 1998; Carvalho et al., 2002)</sup>.

Apesar de já terem sido detectadas quantidades significativas de MDMA no globo ocular e, mais particularmente, no humor vítreo<sup>(Clauwaert et al., 2000; De Letter et al., 2000; De Letter et al., 2002b)</sup>, e de terem sido descritas algumas consequências visuais sérias em consumidores de MDMA<sup>(Jacks and Hykin, 1998; Michael et al., 2003; Firth, 2006)</sup>, apenas existe um estudo, muito recente, relativo ao efeito da MDMA na retina<sup>(Miranda et al., 2007)</sup>.

O NPY é um dos neuropeptídeos mais abundantes e amplamente distribuídos no SNC dos mamíferos, estando envolvido em várias funções fisiológicas<sup>(Wettstein et al., 1995; Silva et al., 2005a)</sup>, sendo também um agente neuroprotector<sup>(Silva et al., 2003a; Silva et al., 2003c; Silva et al., 2005c)</sup>. De facto, foi recentemente descrito que o NPY inibe a apoptose neuronal, induzida por metanfetaminas (METH), no estriado de murganhos<sup>(Thiriet et al., 2005)</sup>. Considerando que o NPY

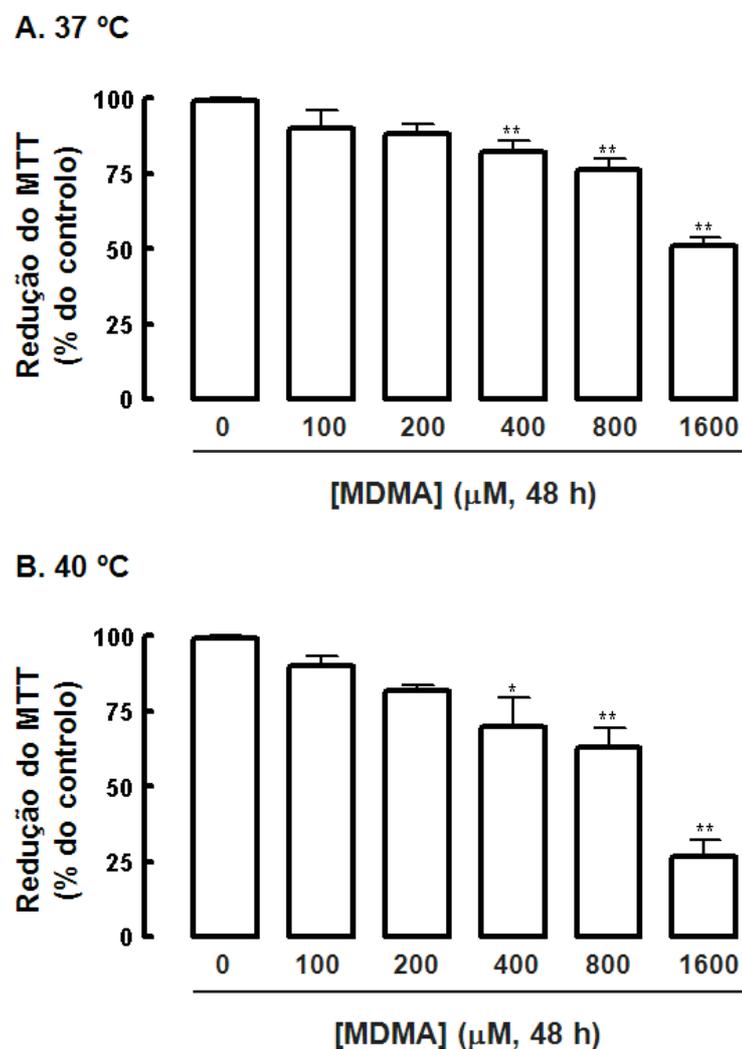
e os seus receptores estão presentes na retina de diversas espécies<sup>(Bruun et al., 1986; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Oh et al., 2002; D'Angelo and Brecha, 2004; Álvaro et al., 2007b)</sup> e, particularmente, no nosso modelo de estudo<sup>(Bruun et al., 1986; Jen et al., 1994; Hutsler and Chalupa, 1995; Oh et al., 2002; D'Angelo and Brecha, 2004; Álvaro et al., 2007b)</sup>, os objectivos deste trabalho foram: 1) avaliar a toxicidade induzida pela exposição a MDMA durante 48 h, em condições de normotermia (37°C) e hipertermia (40°C), nas células da retina de rato em cultura; 2) identificar o tipo de morte celular (necrose/apoptose) associada à exposição a MDMA e o tipo de células da retina que são afectadas pela MDMA; 3) estudar o possível papel protector do NPY, na toxicidade induzida pela MDMA a 37°C.

## **6.2 Resultados**

### **6.2.1 A MDMA induz morte celular nas células da retina em cultura: efeito dependente da concentração e da temperatura**

O efeito da MDMA na viabilidade das células da retina de rato em cultura foi avaliado pelo ensaio de redução do MTT. As células foram expostas a MDMA (100  $\mu$ M a 1600  $\mu$ M), durante 48 h, em condições de normotermia (37°C) e hipertermia (40°C) (Figuras 6.1 A, B). A 37°C e 40°C, ocorreu uma diminuição significativa na viabilidade celular, quando as células da retina foram expostas a 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M e 1600  $\mu$ M de MDMA. A concentração mais elevada de MDMA utilizada (1600  $\mu$ M) causou uma diminuição mais pronunciada da viabilidade celular em condições de hipertermia (40°C) ( $26,8 \pm 5,4\%$  do controlo;  $p < 0,01$ ) comparativamente à situação de normotermia (37 °C) ( $51,2 \pm 2,8\%$  do controlo; Figura 6.1 A e B).

A incorporação de iodeto de propídio (PI) - indicador de morte celular - pelas células da retina foi também utilizada, para investigar o efeito da MDMA na viabilidade celular (Figura 6.2). Concentrações crescentes de MDMA (400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M e 1600  $\mu$ M) aumentaram o número de células positivas para o PI ( $318,7 \pm 67,0\%$ ,  $348,5 \pm 30,7\%$ ,  $796,5 \pm 100,0\%$  comparativamente ao controlo, respectivamente).

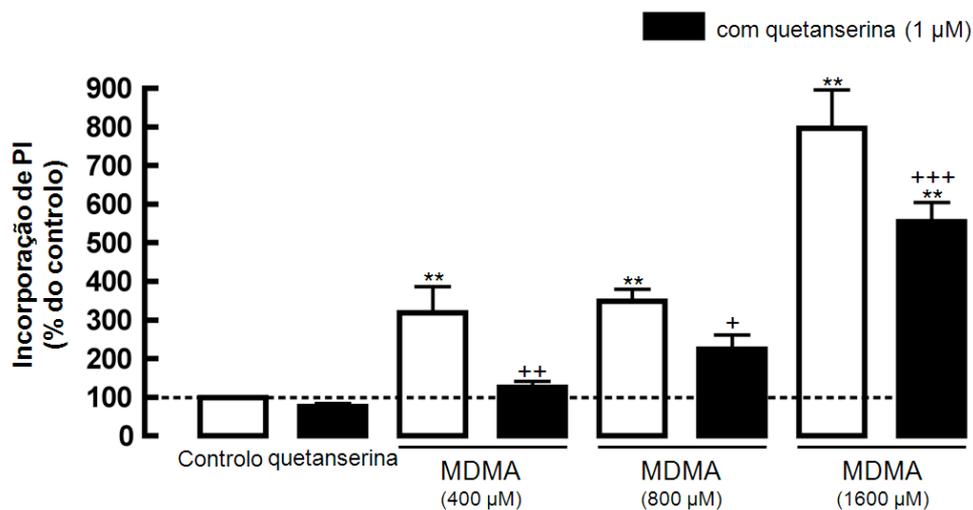


**Figura 6.1 - A MDMA diminui a viabilidade das células da retina de forma dependente da concentração e da temperatura.**

As células da retina em cultura foram expostas a diferentes concentrações de MDMA (100, 200, 400, 800 e 1600 µM) durante 48 h, a 37°C (A) e a 40°C (B). (A,B) Os resultados são expressos como percentagem da redução de MTT na situação controlo (sem droga) e representam a média ± SEM de pelo menos 3 experiências independentes realizadas em triplicado. \*p<0,05, \*\*p<0,01, comparativamente ao controlo; ANOVA de uma via com teste de Dunnet à posteriori.

### 6.2.2 Efeito protector do antagonista selectivo do receptor 5-HT<sub>2A</sub> na toxicidade causada pela MDMA

O potencial efeito protector resultante do bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> relativamente à toxicidade induzida pela MDMA foi investigado, pré-incubando as células da retina em cultura com quetanserina (1 µM), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 1 h antes e durante a incubação com MDMA. O aumento do número de células positivas para o PI provocado pela MDMA foi significativamente inibido, na presença de quetanserina (Figura 6.2). Este composto, quando incubado sozinho, não provocou qualquer alteração na incorporação de PI em comparação com a situação controlo (Figura 6.2).

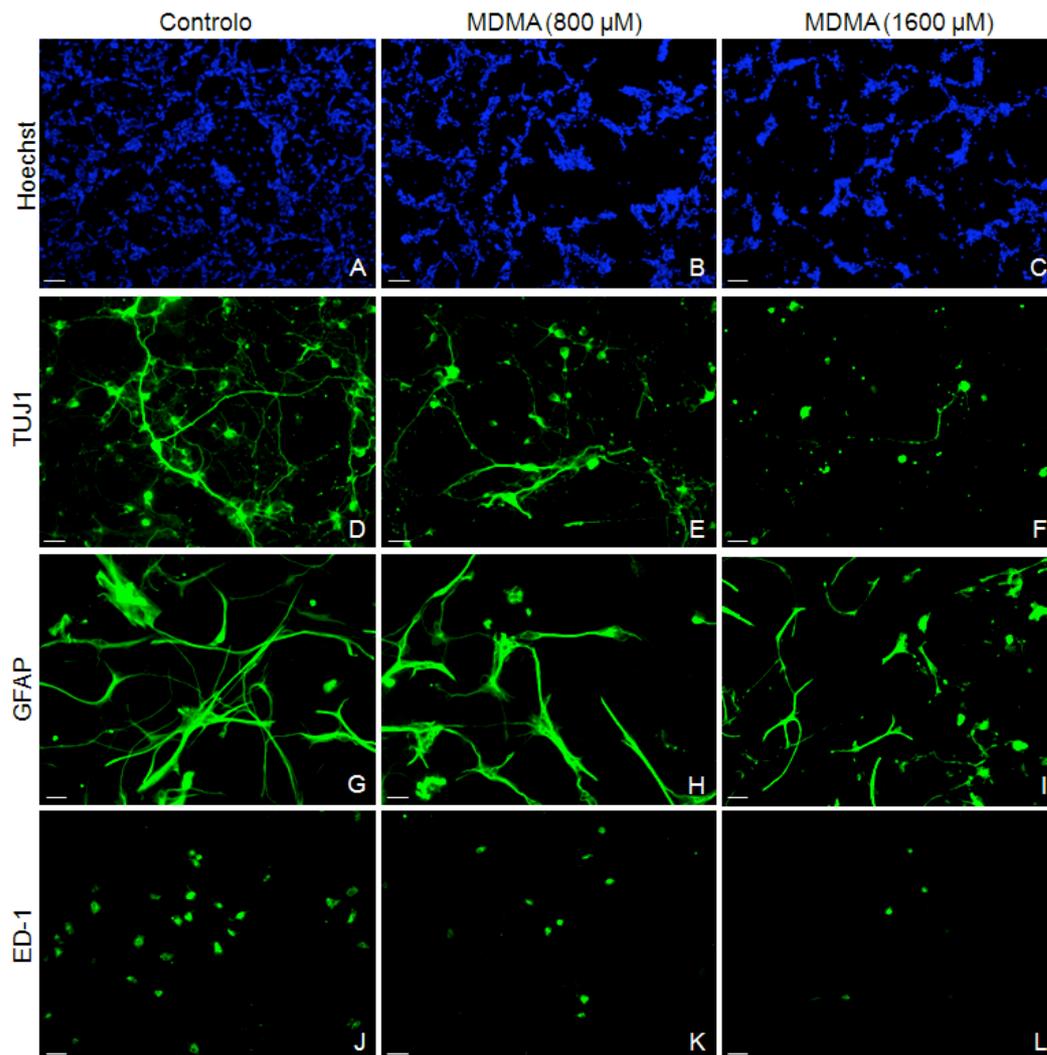


**Figura 6.2 – A inibição dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> protege as células da retina contra a morte celular induzida pela MDMA.**

Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> foram inibidos pela quetanserina (1 µM), tendo esta sido adicionada às culturas 1 h antes da incubação com MDMA. A morte celular foi avaliada pela incorporação de PI, tal como descrito na secção de Materiais e Métodos, tendo sido comparada com a situação controlo (sem droga). Os resultados são expressos como percentagem das células positivas para o PI, na situação controlo e representam a média ± SEM de pelo menos 3 experiências independentes. \*\*p<0,01, comparativamente ao controlo, ANOVA de uma via com teste à posteriori de Dunnet; +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 comparativamente à MDMA, ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.

### **6.2.3 Efeito tóxico da MDMA nos diferentes tipos de células da retina: neurónios, células da macroglia e da microglia**

O efeito tóxico da MDMA nos diferentes tipos de células da retina foi avaliado através de experiências de imunocitoquímica que permitiram avaliar alterações na morfologia e no número de cada tipo de células. Na Figura 6.3, pode observar-se o efeito tóxico da MDMA nos neurónios (células positivas para TUJ1), nas células da macroglia (células positivas para GFAP) e da microglia (células positivas para ED1). Na presença de MDMA (800  $\mu$ M e 1600  $\mu$ M, 48 h, 37°C), detectou-se uma redução do número de núcleos celulares (marcação para Hoechst 33342; Figuras 6.3 A, B e C). O número de neurónios (células positivas para TUJ1) também diminuiu, observando-se também uma redução dos prolongamentos celulares (Figuras 6.3 D, E e F). Além disso, registou-se, também, uma redução do número de células positivas para GFAP (células de Müller e astrócitos; Figuras 6.3 G, H e I), que foi particularmente evidente, quando as células foram expostas à concentração mais elevada de MDMA utilizada (1600  $\mu$ M). O número de células da microglia também diminuiu na presença de MDMA, comparativamente à situação controlo (células positivas para ED1; Figuras 6.3 J, K e L).



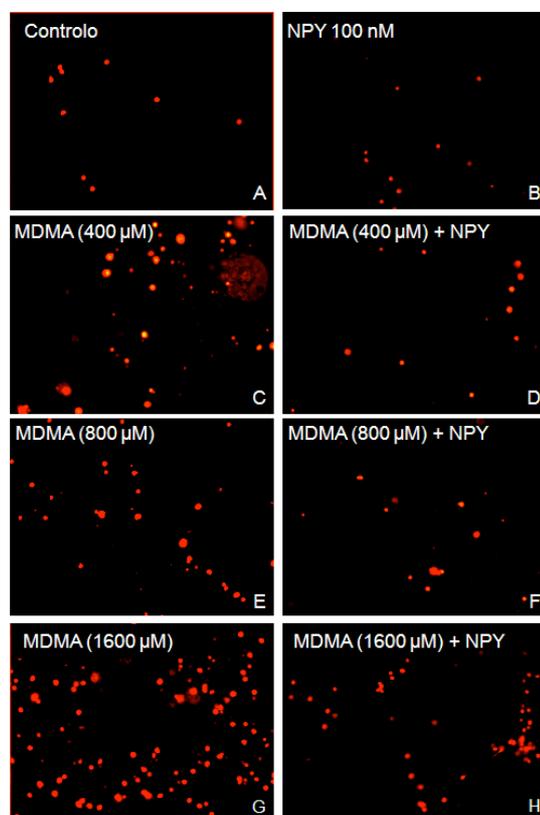
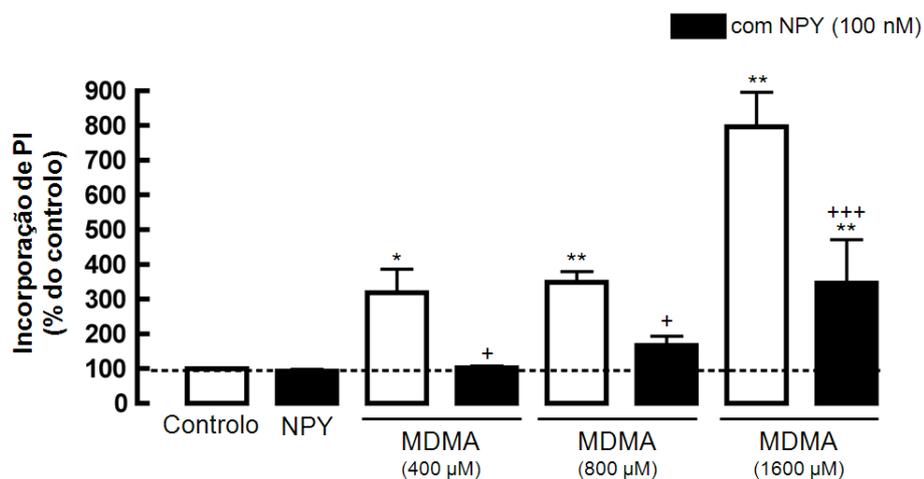
**Figura 6.3 – Efeito tóxico da MDMA nos diferentes tipos de células da retina.**

Os neurónios, as células da macroglia (astrócitos e células de Müller) e as células da microglia foram identificados por imunocitoquímica, através da utilização de anticorpos específicos contra TUJ1 (D, E, F), GFAP (G, H, I) e ED1 (J, K, L), respectivamente. As culturas de células da retina foram expostas a MDMA (800 e 1600  $\mu$ M) durante 48 h. Os núcleos das células foram identificados pela marcação com Hoechst 33342. As imagens são representativas de 3 culturas independentes. Escala: 20  $\mu$ m.

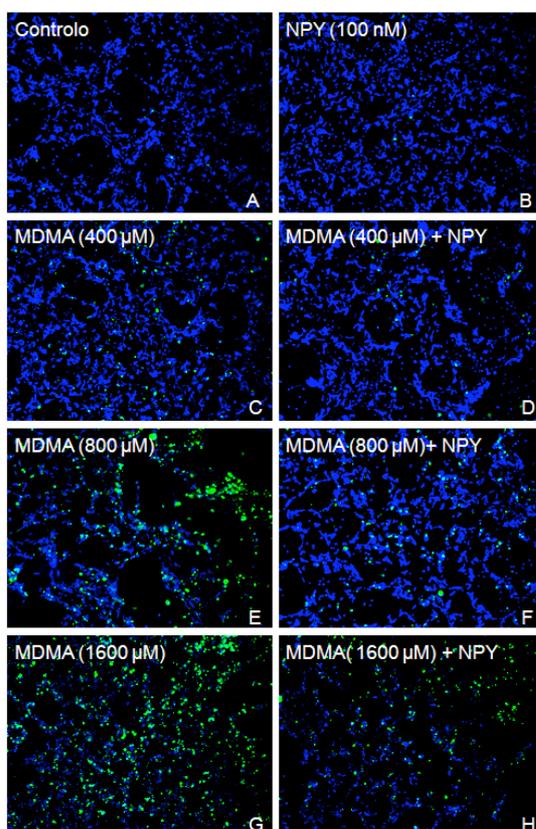
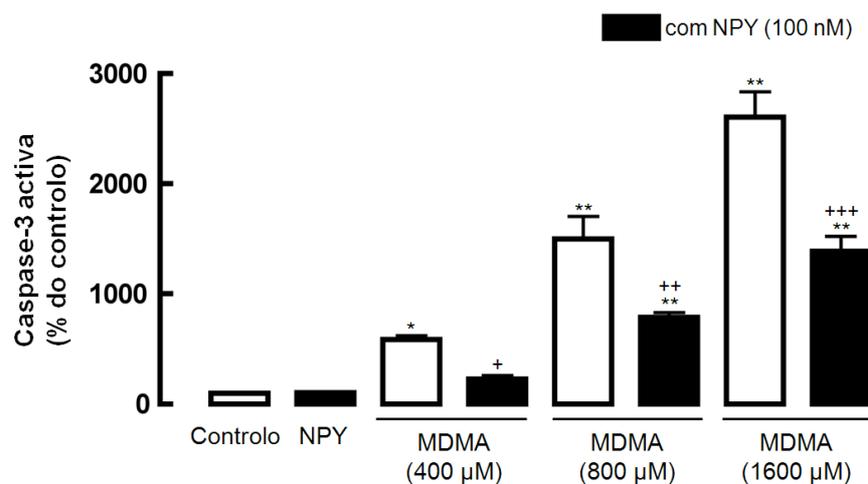
#### 6.2.4 Efeito protector do NPY na toxicidade induzida pela MDMA nas células da retina em cultura

Neste estudo, investigou-se o potencial efeito protector do NPY contra a toxicidade induzida pela MDMA. A presença de NPY (100 nM) inibiu o aumento do número de células da retina positivas para o PI causado pela exposição a MDMA (Figura 6.4). Além disso, também se detectou um aumento do número de células positivas para PI, quando as células da retina foram expostas a glutamato (500  $\mu$ M) durante 48 h ( $279,9 \pm 31,0\%$  comparativamente ao controlo), e uma inibição deste efeito na presença de NPY ( $121,1 \pm 13,3\%$  comparativamente ao controlo;  $p < 0,001$  comparativamente ao glutamato,  $n=6$ ). A exposição a NPY, por si só, não provocou nenhuma alteração na incorporação de PI comparativamente ao controlo (Figuras 6.4 A, B e C).

Para avaliar o efeito protector do NPY (100 nM) contra a morte por apoptose das células da retina em cultura, causada pela exposição a MDMA, analisou-se a imunorreactividade da caspase-3 activa, como marcador de apoptose. O anticorpo utilizado detecta o fragmento maior (17/19 kDa) da caspase-3 activa, resultante da clivagem da pró-caspase-3 no resíduo de Asp<sup>175</sup>. O anticorpo não reconhece a pró-caspase-3 ou outras caspases activas. Na situação controlo, e também quando as células da retina em cultura foram expostas a NPY, o número de células positivas para a caspase-3 activa foi muito reduzido (Figuras 6.5 B e C). Quando as células foram expostas a MDMA (400, 800 e 1600  $\mu$ M), o número de células positivas para a caspase-3 activa aumentou significativamente (Figura 6.5). No entanto, quando as células foram expostas a MDMA na presença de NPY (100 nM), ocorreu uma inibição significativa do aumento do número de células positivas para a caspase-3 activa induzido pela MDMA (Figura 6.5).



**Figura 6.4 – O NPY protege as células da retina contra a morte celular induzida pela MDMA.** O NPY (100 nM) foi adicionado às culturas 1 h antes da incubação com MDMA (400, 800, 1600  $\mu$ M, 48 h, 37°C). Os resultados são expressos como percentagem de células positivas para PI comparativamente à situação controlo (sem droga), e representam a média  $\pm$  SEM de pelo menos 3 experiências independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; comparativamente ao controlo, ANOVA de uma via com teste de Dunnett à posteriori. + $p < 0,05$ , +++ $p < 0,001$ ; comparativamente à MDMA, ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.



**Figura 6.5 – O NPY inibe o aumento da activação da caspase-3 induzido pela MDMA.**

O NPY (100 nM) foi adicionado às culturas 1 h antes das incubações com MDMA (400, 800 e 1600 µM, 48 h, 37°C). Os resultados são expressos em percentagem de células positivas para a caspase-3 activa (verde) comparativamente à situação controlo (sem droga), e representam a média ± SEM de pelo menos 3 experiências independentes. \*p<0,05, \*\*p<0,01; comparativamente ao controlo, ANOVA de uma via com teste à posteriori de Dunnet; +p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; comparativamente à MDMA, ANOVA de uma via com teste de Bonferroni à posteriori.

### 6.3 Discussão

Os efeitos nocivos da MDMA em diversas áreas do cérebro, incluindo o córtex, estriado e tálamo, estão bem documentados<sup>(Commins et al., 1987; Schmued, 2003)</sup>. A neurotoxicidade causada pela MDMA foi também demonstrada em culturas de neurónios corticais de rato<sup>(Capela et al., 2006b; Warren et al., 2006)</sup>, células hepáticas<sup>(Montiel-Duarte et al., 2002)</sup>, células do cerebelo<sup>(Jimenez et al., 2004)</sup> e células PC12<sup>(Milhazes et al., 2006)</sup>. Apesar de existirem evidências da presença de quantidades relativamente elevadas de MDMA no globo ocular e no humor vítreo em consumidores de ecstasy<sup>(Clauwaert et al., 2000; De Letter et al., 2000; De Letter et al., 2002b)</sup>, os efeitos tóxicos da MDMA na retina estão muito pouco elucidados. No entanto, sabe-se que o consumo de MDMA pode causar hemorragia retiniana<sup>(Jacks and Hykin, 1998)</sup>, desregulação da função da retina<sup>(Firth, 2006)</sup> e coriorretinopatia central<sup>(Michael et al., 2003)</sup>.

No presente trabalho, demonstrou-se que a MDMA causa toxicidade nas células da retina de rato em cultura, de forma dependente da concentração e da temperatura. Estes resultados poder-se-ão correlacionar com resultados obtidos em estudos *in vivo*, publicados recentemente, onde se detectou um efeito neurotóxico causado pela MDMA na retina de rato<sup>(Miranda et al., 2007)</sup>. Nesse estudo, demonstrou-se que a administração de MDMA induz um aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio e de azoto e, conseqüentemente, conduz à degeneração celular da retina.

A hipertermia causada pela MDMA em humanos e ratos é outro factor fulcral para o efeito neurotóxico desta droga, podendo mesmo ser fatal<sup>(Henry, 1992; Green et al., 2003)</sup>. Estudos prévios demonstraram que a hipertermia associada ao consumo de MDMA potencia a morte neuronal<sup>(Broening et al., 1995; Farfel and Seiden, 1995)</sup>. Nas células da retina de rato, o modelo experimental utilizado neste trabalho, o efeito tóxico da MDMA foi potenciado quando a temperatura de incubação foi elevada para 40°C. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, utilizando culturas de neurónios corticais de rato<sup>(Capela et al., 2006b)</sup>. Contudo, apesar da neurodegeneração induzida por MDMA ocorrer também em animais mantidos sob condições de normotermia<sup>(Broening et al., 1995; Farfel and Seiden, 1995)</sup>, os efeitos neurotóxicos, a longo prazo após a administração de MDMA, estão também relacionados com a hipertermia produzida pela droga<sup>(Broening et al., 1995)</sup>. A reforçar estes argumentos, tem sido revelado que a prevenção da hipertermia induzida pela MDMA reduz a neurotoxicidade. Além disso, verificou-se que alguns fármacos que reduzem a neurotoxicidade causada pela MDMA também diminuem a temperatura corporal dos animais<sup>(Farfel and Seiden, 1995; Malberg et al., 1996)</sup>. Adicionalmente, apesar das vias patológicas envolvidas no agravamento, associado à hipertermia, da toxicidade causada pela MDMA não estarem completamente esclarecidas,

algumas evidências sugerem que o stresse oxidativo<sup>(Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2002)</sup> e a activação de processos inflamatórios<sup>(Roth et al., 2006)</sup> parecem desempenhar um papel importante nesta interacção.

O modelo utilizado, cultura primária de células da retina, é constituído por diferentes tipos de células<sup>(Álvaro et al., 2007b)</sup>. Neste sentido, verificou-se que a MDMA é tóxica para os neurónios, astrócitos e células de Müller (células positivas para GFAP) e células da microglia. Além disso, verificou-se que os neurónios e as células da microglia são menos resistentes à exposição a MDMA do que as células positivas para GFAP, uma vez que o efeito tóxico da MDMA nos neurónios e nas células da microglia é mais evidente para as concentrações mais baixas de MDMA utilizadas. Estudos *in vitro* anteriores não referem, no entanto, o efeito tóxico da MDMA nas células da glia. Contudo, nestes estudos *in vitro*, apesar das células da glia também poderem ter sido afectadas, os métodos utilizados para avaliar a toxicidade da MDMA não permitem distinguir a morte celular entre neurónios e astrócitos<sup>(Stumm et al., 1999; Capela et al., 2006b; Cunha-Oliveira et al., 2006)</sup>. Por outro lado, na retina, a morte das células da glia induzida por MDMA poderá sugerir uma maior susceptibilidade deste tipo de células, comparativamente às células da glia do cérebro. Além disso, no cérebro, os estudos *in vivo* têm avaliado a reactividade das células da glia e não a sua degeneração. Na verdade, existem alguns resultados contraditórios, demonstrando que a administração de MDMA no cérebro de rato não altera a expressão de GFAP<sup>(Wang et al., 2004)</sup> ou aumenta a expressão de GFAP e a activação das microglias<sup>(Orío et al., 2004)</sup>. Assim, é necessário realizar estudos adicionais, no sentido de clarificar se a MDMA apenas provoca reactividade das células da glia ou se poderá ocorrer morte das células da glia em paralelo com a morte neuronal.

Neste estudo, observou-se que a exposição a MDMA causou, além da diminuição no número de neurónios, uma redução no comprimento dos prolongamentos citoplasmáticos dos neurónios, em comparação com as condições controlo. Existem evidências, obtidas em estudos *in vivo*, de que a MDMA causa danos crónicos em diferentes terminais nervosos, nomeadamente em terminais nervosos de neurónios dopaminérgicos e serotoninérgicos<sup>(Quinton and Yamamoto, 2006)</sup>. O conjunto destes resultados sugere que a morte neuronal pode ser precedida de processos de toxicidade sináptica e de regressão dendrítica.

Sabendo-se que a toxicidade da MDMA poderá estar associada com a activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub><sup>(Schmidt et al., 1990; Johnson et al., 1993; Malberg et al., 1996; Capela et al., 2006b; Capela et al., 2007)</sup>, e uma vez que estes receptores estão presentes na retina<sup>(Pootanakit et al., 1999)</sup>, investigou-se o seu

envolvimento na toxicidade causada pela MDMA nas células da retina em cultura. De facto, os resultados indicam que a toxicidade causada pela MDMA nas células da retina é, em parte, dependente da activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, uma vez que a incubação das células com quetanserina reduziu significativamente a morte celular induzida pela MDMA. Neste contexto, foram obtidos resultados equivalentes em neurónios corticais de rato<sup>(Capela et al., 2006b; Capela et al., 2007)</sup>. Estudos *in vivo* realizados em ratos demonstraram que a quetanserina e outros antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> são eficazes na prevenção das lesões neuronais<sup>(Schmidt et al., 1990; Johnson et al., 1993; Malberg et al., 1996)</sup>. Contudo, este efeito foi correlacionado com a diminuição de temperatura induzida pelos antagonistas<sup>(Schmidt et al., 1990; Johnson et al., 1993; Malberg et al., 1996)</sup>. Além disso, estudos em humanos e em ratos também demonstraram que administrações agudas e crónicas de MDMA diminuem a densidade dos receptores 5-HT<sub>2A</sub><sup>(Reneman et al., 2002)</sup>.

No presente estudo, e pela primeira vez, descreve-se o efeito protector do NPY contra a toxicidade da MDMA na retina. A função neuroprotectora do NPY no SNC está bem documentada. O NPY protege os neurónios do hipocampo e do córtex, quando estes são expostos a condições de excitotoxicidade<sup>(Silva et al., 2003c; Silva et al., 2005a; Wu and Li, 2005; Domin et al., 2006; Xapelli et al., 2007)</sup>, e tem também um papel protector na apoptose neuronal induzida por METH em estriado de murganhos<sup>(Thiriet et al., 2005)</sup>. Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstram o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> na toxicidade causada pela MDMA e o papel protector do NPY na morte das células da retina.

A activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> promove a excitação neuronal, em consequência do aumento da sensibilidade dos receptores do glutamato do tipo AMPA e também devido ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>(Azmitia, 2001)</sup>. De facto, tem sido sugerido que o glutamato poderá estar envolvido na toxicidade causada pela MDMA, uma vez que o antagonista dos receptores NMDA, MK-801, protege contra a toxicidade causada por MDMA<sup>(Battaglia et al., 2002; Capela et al., 2006b)</sup>. Assim, tal como previamente descrito no hipocampo de rato, a neuroprotecção conferida pelo NPY poderá estar associada com o seu efeito inibitório na libertação de glutamato<sup>(Silva et al., 2003a; Silva et al., 2005c)</sup>. Neste estudo, demonstrou-se que o NPY previne a morte celular induzida por glutamato. Também se verificou que o NPY inibe o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  (ver Capítulo 4) e a libertação de glutamato (dados preliminares não incluídos nesta tese). Assim, o possível mecanismo da toxicidade causada pela MDMA poderá implicar uma libertação excessiva de glutamato induzida pela activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e, conseqüentemente, um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , que está normalmente

associado a processos de degeneração celular, e que poderá ser prevenido ou inibido na presença de NPY.

Além da morte por necrose, existem evidências que sugerem que a apoptose, que é um tipo de morte celular frequentemente associada à activação de caspases, também poderá ocorrer no processo de neurotoxicidade causado por drogas de abuso. Na realidade, os resultados apresentados neste Capítulo revelam que as células da retina, quando expostas a MDMA, também morrem por uma via apoptótica dependente de caspases, o que está de acordo com estudos *in vivo* e *in vitro*, onde se demonstrou que a morte celular por apoptose, devido à MDMA, ocorre através da activação de caspase-3 em neurónios corticais e cerebrocorticais de rato<sup>(Stumm et al., 1999; Meyer et al., 2004; Capela et al., 2006b; Cunha-Oliveira et al., 2006; Capela et al., 2007)</sup>, células PC12<sup>(Milhazes et al., 2006)</sup>, células serotoninérgicas humanas<sup>(Simantov and Tauber, 1997)</sup> e no sistema límbico de ratos<sup>(Tamburini et al., 2006)</sup>. A aplicação exógena de NPY diminuiu a imunoreactividade para a caspase-3 activa nas células da retina. O NPY também inibiu a activação de caspase-3, induzida por cainato, em culturas primárias de células do neocórtex e do hipocampo<sup>(Domin et al., 2006)</sup>.

Em conclusão, neste trabalho, demonstrou-se que a MDMA causa morte celular por necrose e apoptose nas células da retina, de forma dependente da concentração, sendo este efeito potenciado pela elevação da temperatura. A toxicidade causada pela MDMA é, parcialmente, dependente da activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e é significativamente reduzida pelo NPY.





## **Capítulo 7**

### **Discussão e conclusão geral**



O NPY está presente na retina de diversas espécies, incluindo a espécie humana, tendo sido detectado, principalmente, em células amácrinas e células ganglionares<sup>(Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002)</sup>. Os receptores do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub> estão também expressos na retina de diferentes espécies. Apesar de estar descrito que o NPY poderá modular alguns circuitos visuais<sup>(Oh et al., 2002)</sup>, as funções do NPY na retina ainda são muito pouco conhecidas. De facto, foi demonstrado que, após determinados estímulos, nomeadamente após despolarização ou estimulação com luz de alta frequência, a retina de rã liberta NPY<sup>(Bruun et al., 1991)</sup>. Além disso, o NPY também poderá modular a libertação de vários neurotransmissores na retina<sup>(Bruun and Ehinger, 1993; Sinclair and Nirenberg, 2001; Oh et al., 2002)</sup>.

Atendendo à vasta distribuição do NPY no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico e às inúmeras funções associadas a este peptídeo, neste trabalho pretendeu-se investigar e aprofundar o conhecimento sobre o papel do NPY, na retina. Para tal, como modelo experimental, utilizaram-se retinas de rato, culturas primárias de células da retina de rato, culturas primárias de células da microglia da retina de rato, e linhas celulares de células de Müller e de células endoteliais da retina de rato. Nas culturas primárias de retina, quantificou-se o conteúdo intracelular de NPY, bem como a quantidade de NPY libertado após despolarização das células da retina. A cultura de células utilizada contém diferentes tipos de células, nomeadamente neurónios, células da macroglia (astrócitos e células de Müller) e células da microglia, e o NPY está presente nos diferentes tipos de células. De facto, por imunocitoquímica, observou-se uma co-localização na imunoreactividade para o NPY e para vários marcadores dos diferentes tipos de células referidos anteriormente. Além disso, verificou-se que o NPY se localiza também em células endoteliais da retina. Anteriormente, tinha sido demonstrada a expressão de NPY em células endoteliais da veia do cordão umbilical humano<sup>(Cai et al., 1993; Silva et al., 2005b)</sup> e em células endoteliais cardíacas humanas<sup>(Cai et al., 1993)</sup>. Relativamente aos receptores do NPY, detectou-se o ARN mensageiro dos receptores do NPY do subtipo Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub>, quer na retina, quer na cultura primária de células da retina. Nas células endoteliais da retina, detectou-se o ARN mensageiro dos receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> e Y<sub>4</sub>, mas não do receptor Y<sub>5</sub>. Em alguns estudos anteriores, sugere-se que a expressão do NPY e dos seus receptores poderá não estar confinada aos neurónios, podendo ocorrer também nas células da glia, nomeadamente nos astrócitos<sup>(Gimpl et al., 1993; Barnea et al., 1998; St-Pierre et al., 2000)</sup>. Neste estudo demonstrou-se, pela primeira vez, que o NPY não se localiza apenas nos neurónios, mas que está também presente nas células da glia da retina, nomeadamente nas células de Müller e/ou astrócitos e nas células

da microglia. A detecção do NPY nas células da microglia poderá ainda sugerir um possível papel do NPY em processos inflamatórios que ocorrem em diversas patologias da retina, tais como a retinopatia diabética, *retinitis pigmentosa* e degenerescência macular relacionada com a idade<sup>(Leal et al., 2005; Meleth et al., 2005; Zhou et al., 2005)</sup>. Além disso, a presença do NPY nos astrócitos da retina sugere que o mesmo poderá modular as propriedades da barreira hemato-retiniana.

No seguimento dos resultados obtidos, pretendeu-se estudar a função dos receptores do NPY presentes na cultura primária de células da retina. Sabendo-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  é um mediador de inúmeros processos celulares, investigou-se o efeito do NPY nas alterações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por imagiologia de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando a sonda Fura-2. As variações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nos neurónios da retina induzidas por 30 mM de KCl foram inibidas na presença de NPY (100 nM), mas apenas em aproximadamente 50% de neurónios. A inibição do aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pelo NPY já foi demonstrada noutros sistemas, designadamente em culturas de neurónios e sinaptossomas de hipocampo<sup>(Bleakman et al., 1992; Silva et al., 2001, 2003a)</sup> e em neurónios do córtex cerebral de rato<sup>(Wang, 2005)</sup>. Além disso, recorrendo a agonistas e antagonistas dos receptores do NPY, foi possível demonstrar que o efeito inibitório do NPY nas variações da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nos neurónios da retina em cultura é mediado pela activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$  (Figura 7.1). No córtex cerebral, foi demonstrado que o efeito do NPY na inibição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é mediado pelo receptor do NPY do subtipo  $Y_1$ <sup>(Wang, 2005)</sup>, enquanto que outros estudos efectuados em neurónios, sinaptossomas e fatias de hipocampo, revelaram que, além do receptor  $Y_1$ , o receptor  $Y_2$  participa também na modulação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>(Silva et al., 2001, 2003a; Xapelli et al., 2007)</sup>. No caso dos neurónios do “*arcuate nucleus*”, a modulação das condutâncias de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{K}^+$  é mediada pela activação de múltiplos receptores do NPY, nomeadamente  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ . Deste modo, várias evidências sugerem que diferentes receptores do NPY podem modular a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e que os receptores envolvidos dependerão do tipo de células. A desregulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  pode causar morte celular<sup>(Sattler and Tymianski, 2000)</sup> e, assim, o NPY poderá ter uma acção neuroprotectora, particularmente na inibição da excitotoxicidade. Este processo de excitotoxicidade compreende a activação excessiva dos receptores ionotrópicos do glutamato, que poderá promover um aumento excessivo da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , causando danos celulares. De facto, nas células da retina, a morte celular induzida pela exposição a uma concentração elevada de glutamato foi inibida pelo NPY (100 nM). Do mesmo modo, em estudos anteriores realizados em hipocampo e córtex de rato, o NPY inibe a morte celular de neurónios induzida por excitotoxicidade e inibe a libertação de glutamato<sup>(Silva et al., 2003c; Silva</sup>

et al., 2005c; Wu and Li, 2005; Domin et al., 2006; Xapelli et al., 2007). Assim, na retina de rato, o NPY poderá exercer um papel neuroprotector, diminuindo a libertação de glutamato e inibindo o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , através da activação dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_4$  e  $Y_5$ .

No âmbito do nosso objectivo, pretendeu-se, ainda, estudar o papel do NPY na proliferação de células da retina de rato. A exposição a NPY, durante 48 h, aumentou significativamente a proliferação de células da retina, avaliada pelo número de células positivas para BrdU. No que diz respeito aos receptores do NPY envolvidos neste processo, verificou-se que o efeito proliferativo do NPY foi mediado pelos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ . Além disso, o NPY também estimulou a proliferação de células progenitoras da retina de rato (células nestina<sup>+</sup>). Seguidamente, pretendeu-se identificar a(s) via(s) intracelular(es) associada(s) ao efeito proliferativo do NPY, dando-se uma atenção particular ao potencial envolvimento do monóxido de azoto e das proteínas cinases Erk 1 e 2. De facto, verificou-se que a proliferação das células da retina induzida pelo NPY é mediada pela activação de ambas as vias, ou seja, o NPY activa os receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$  que, por sua vez, promovem a formação de NO, o qual activa a enzima GCs, aumentando dessa forma a síntese de GMPc que, por sua vez, promove a estimulação da Erk 1/2 e, conseqüentemente, a proliferação celular (Figura 7.1).

Neste trabalho, verificou-se que, quer o efeito modulador nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$ , quer o efeito proliferativo do NPY, nas células da retina em cultura, são mediados pela activação de múltiplos receptores do NPY. Interessantemente, é de realçar que, em ambos os estudos, a activação de diferentes subtipos de receptores do NPY resulta no mesmo efeito. Este facto poderá ser devido à expressão heterogénea de cada tipo de receptor em diferentes tipos de células presentes no modelo celular usado. Outros estudos revelaram também que o mesmo efeito pode ser mediado por vários subtipos do NPY. Por exemplo, a  $[Ca^{2+}]_i$  é regulada pela activação dos receptores  $Y_1$  e/ou  $Y_2$  (Silva et al., 2001; Sun et al., 2001; Silva et al., 2003a; Wang, 2005; Xapelli et al., 2007) enquanto que, nos neurónios do “*arcuate nucleus*” este mesmo efeito é também regulado pelos receptores  $Y_4$  e  $Y_5$  (Sun and Miller, 1999). Do mesmo modo, apesar da maioria dos estudos realizados mostrar que é o receptor  $Y_1$  que está envolvido na proliferação celular (Hansel, 2001; Howell et al., 2003; Cho and Kim, 2004; Milenkovic et al., 2004; Howell et al., 2005; Anitha et al., 2006; Howell et al., 2007), a presente tese e outros trabalhos (Zukowska-Grojec et al., 1998a; Lee et al., 2003b; Kitlinska et al., 2005; Movafagh et al., 2006) demonstram que a proliferação celular estimulada pelo NPY é mediada pela activação de múltiplos receptores do NPY, nomeadamente os subtipos  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ . Este facto poderá ser explicado pela possível formação de oligómeros funcionais entre os receptores do NPY (Berglund et al., 2003b; Dinger et al., 2003; Movafagh et al., 2006). Por este motivo, quando

incubamos as células da retina com cada um dos antagonistas dos receptores do NPY, o efeito proliferativo mediado pelo NPY neste oligómero é completamente bloqueado. Por outro lado, devido à provável distribuição heterogénea dos receptores do NPY nas células da retina em cultura, o efeito proliferativo menos significativo mediado pelo receptor  $Y_5$  poderá ser entendido com base na menor presença de células da retina que expressem exclusivamente receptores do  $Y_5$  ou, ainda, porque a proliferação celular apenas poderá ocorrer após a formação do oligómero com os receptores  $Y_1$  e/ou  $Y_2$ .

Resumindo, os receptores do NPY presentes nas células da retina são funcionais, inibem os aumentos da  $[Ca^{2+}]_i$  e estimulam a proliferação celular. A capacidade proliferativa do NPY e o seu envolvimento na neurogénese poderá constituir um papel importante do NPY na regeneração da retina em situações patológicas, como é o caso do glaucoma ou da degenerescência macular associada à idade (Figura 7.1).

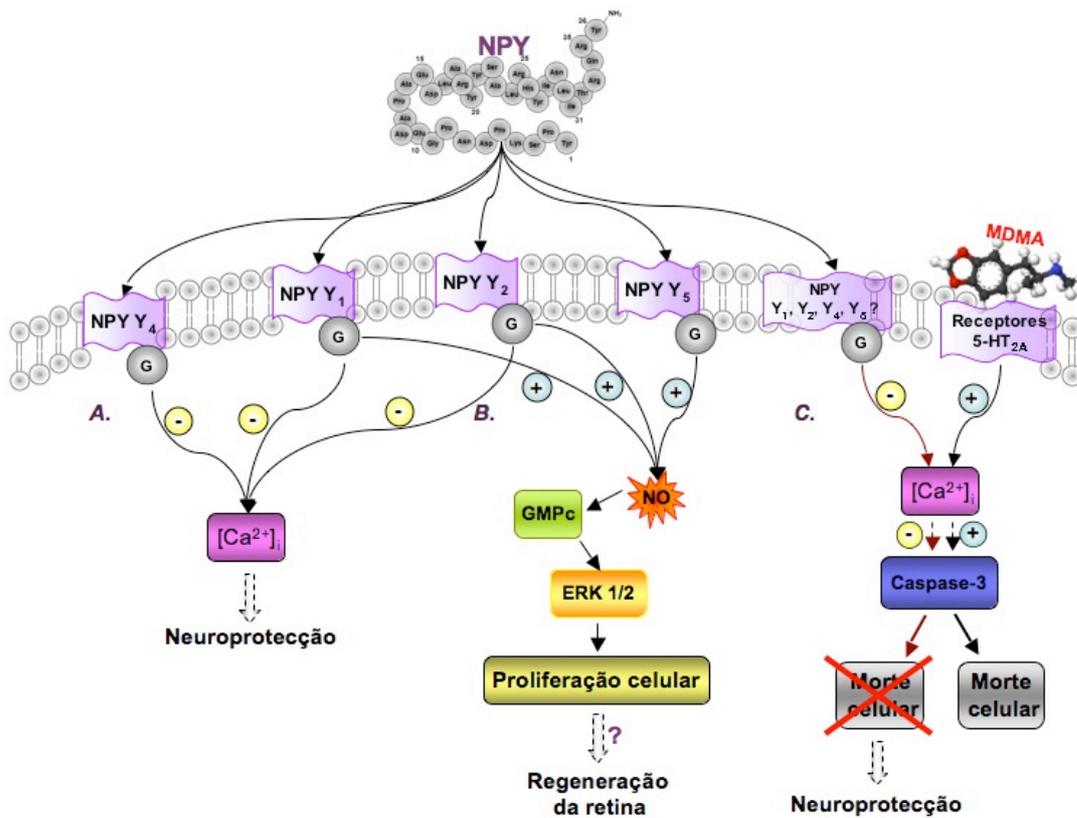
O papel protector do NPY na retina foi avaliado num modelo de toxicidade induzida pela MDMA. Assim, foram avaliados os efeitos tóxicos da MDMA nas células da retina em cultura e também o potencial papel neuroprotector do NPY. Os resultados demonstram que a MDMA causa toxicidade nas células da retina e que o aumento da temperatura (de 37°C para 40°C) potencia o efeito tóxico da MDMA. Este efeito potenciador da temperatura na toxicidade da MDMA já tinha sido detectado noutros modelos celulares <sup>(Henry, 1992; Green et al., 2003)</sup>. Por outro lado, como o modelo experimental utilizado na presente tese é constituído por diferentes tipos de células, avaliou-se o efeito tóxico da MDMA nos neurónios, células de Müller e astrócitos, e células da microglia e concluiu-se que os neurónios e as células da microglia são mais susceptíveis à acção tóxica da MDMA. Pelo contrário, as células de Müller e os astrócitos parecem ser mais resistentes à toxicidade causada pela MDMA, embora se observem igualmente alterações de morfologia e uma diminuição do número de células presentes na cultura. Em suma, neste trabalho demonstrou-se, pela primeira vez, que a toxicidade da MDMA não afecta exclusivamente os neurónios, afectando também células de Müller, astrócitos e células da microglia. No entanto, estudos anteriores realizados no cérebro não demonstraram efeitos da MDMA nas células da glia <sup>(Stumm et al., 1999; Capela et al., 2006b; Cunha-Oliveira et al., 2006)</sup>. Esta aparente contradição com os resultados desta tese poderá ser explicada pelo facto das células da retina poderem ter uma maior sensibilidade comparativamente às do cérebro. Além disso, a ausência de referência ao efeito da MDMA nas células da glia também pode ser devido ao facto de os autores não terem distinguido o tipo de células que são afectadas pela MDMA <sup>(Stumm et al., 1999; Capela et al., 2006b; Cunha-Oliveira et al., 2006)</sup>, embora as células da glia possam ser igualmente afectadas.

Estudos anteriores demonstraram que a morte celular por apoptose, através da activação da caspase-3, é característica da toxicidade causada pela MDMA<sup>(Montiel-Duarte et al., 2002; Jimenez et al., 2004; Meyer et al., 2004; Cunha-Oliveira et al., 2006; Tamburini et al., 2006; Warren et al., 2007)</sup>. No modelo experimental utilizado, a morte das células da retina também ocorreu por apoptose, através da activação da caspase-3, mas também por necrose. A morte celular induzida pela MDMA foi significativamente diminuída pelo NPY, embora não se conheçam, até ao momento, quais os receptores do NPY envolvidos neste processo. Sabendo-se que a MDMA provoca um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>(Tiangco et al., 2005)</sup>, poder-se-á relacionar este facto com um possível mecanismo de activação de apoptose dependente de caspases. Por outro lado, sabe-se que o efeito da MDMA é, em parte, devido à activação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, e a activação destes receptores induz um aumento da libertação de glutamato<sup>(Azmitia et al., 1990)</sup>, que, numa concentração elevada, poderá induzir excitotoxicidade. Tendo em consideração todos estes factos, poder-se-á sugerir que as células da retina em cultura, após uma exposição a MDMA, estarão sujeitas a concentrações excessivas de glutamato que irão induzir um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e, conseqüentemente, activar processos apoptóticos dependentes de caspases. No entanto, a morte celular induzida pela MDMA é inibida na presença de NPY. Assim, o efeito neuroprotector do NPY poderá ser devido, pelo menos em parte, aos efeitos inibitórios do NPY na libertação de glutamato e nas alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  nas células da retina, prevenindo a activação de caspases e, conseqüentemente, a morte celular por apoptose. Por outro lado, sabe-se que a toxicidade da MDMA também se deve ao stresse oxidativo causado pela formação de espécies reactivas de oxigénio em resultado do metabolismo da MDMA<sup>(de la Torre and Farre, 2004; Jones et al., 2005)</sup>. Um estudo recente demonstrou que, após a administração de um agente antioxidante, ocorre um aumento dos níveis de NPY na artéria mesentérica de ratos<sup>(Macarthur et al., 2008)</sup>, o que sugere que o NPY poderá também exercer protecção nas células da retina em condições de stresse oxidativo. O efeito neuroprotector do NPY já tinha sido demonstrado na morte neuronal por apoptose induzida por metanfetamina no estriado de murganho<sup>(Thiriet et al., 2005)</sup>, bem como contra a excitotoxicidade no hipocampo<sup>(Silva et al., 2003a; Silva et al., 2003c; Silva et al., 2005c)</sup>.

Em conclusão, neste trabalho, demonstrou-se que o NPY e os receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub> estão presentes nas células da retina, nomeadamente em neurónios, astrócitos e células de Müller, e células da microglia. Os resultados obtidos sugerem que os receptores do NPY se distribuem, de forma heterogénea, nas células da retina. De facto, o NPY inibe de uma forma heterogénea as variações da  $[Ca^{2+}]_i$  nos neurónios da retina, através da activação dos receptores Y<sub>1</sub>, Y<sub>4</sub> e Y<sub>5</sub>. Por outro lado, a estimulação da proliferação de

células da retina, incluindo células progenitoras, induzida pelo NPY, ocorre através da activação dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ , e, neste caso em particular, o efeito do NPY é mediado pela activação da via da NOS-GCs que, por sua vez, activa a via de sinalização da ERK 1/2. Os resultados também permitem concluir que o NPY pode actuar como neuroprotector nas células da retina. Na verdade, o NPY diminuiu a morte celular induzida pelo glutamato e pela MDMA. Na Figura 7.1 esquematizam-se as principais acções do NPY, nas células da retina de rato, investigadas neste trabalho, e os respectivos receptores envolvidos, podendo-se concluir que o NPY participa na modulação da  $[Ca^{2+}]_i$ , estimula a proliferação celular e protege as células da retina da morte causada pela MDMA.

Por último, os resultados apresentados nesta tese contribuem para elucidar o papel do NPY na retina e, fundamentalmente, para esclarecer o porquê do NPY estar presente na retina. Contudo, apesar de haver ainda muito por conhecer e esclarecer, este trabalho abriu novas perspectivas sobre a importância do NPY na retina e, particularmente no potencial terapêutico do NPY, ou de agonistas dos seus receptores, em doenças neurodegenerativas da retina.



**Figura 7.1 – Representação esquemática das funções do NPY nas células da retina.**

**A** - O NPY inibe o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  através da activação dos receptores do NPY do subtipo  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_4$ . **B** - Por outro lado, o NPY estimula a proliferação de células da retina. Este efeito é mediado através da activação dos receptores  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_5$ , que, por sua vez, irão desencadear processos de sinalização intracelular. A activação destes receptores induz um aumento da produção de NO e, conseqüentemente, um aumento da síntese de GMPc, ocorrendo posteriormente a estimulação da ERK 1/2 e, desta forma, um aumento da proliferação celular. **C** - Na retina, a MDMA activa os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, induzindo desta forma a activação da caspase-3 e a morte celular por apoptose. Paralelamente, o NPY é capaz de inibir a activação da caspase-3 inibindo a morte das células da retina, embora, até ao momento, não estejam identificados os receptores do NPY que participam neste processo. Em suma, nas células da retina, o NPY pode exercer efeitos neuroprotectores, que, em parte, poderão ser devidos à inibição das alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  e da redução da libertação de glutamato. Além disso, o NPY estimula a proliferação de células da retina, num mecanismo dependente do NO e da ERK 1/2. Esta propriedade do NPY poderá ser eventualmente utilizada no desenvolvimento de estratégias para promover a regeneração celular em doenças degenerativas da retina.







## **Bibliografia**



- A. Jonas Ekstrand R. C., Meit Bjorndahl...Yihai Cao (2003) Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. *M. Judah Folkman, Harvard Medical School, Boston, Ma(PNAS)* **100**, 6033-6038.
- Abbott C. A., Yu D. M., Woollatt E., Sutherland G. R., McCaughan G. W. and Gorrell M. D. (2000) Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* **267**, 6140-6150.
- Abbott N. J., Ronnback L. and Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53.
- Addition E. M. C. f. D. a. D. (2006).
- Adeghate E., Ponery A. S., Pallot D. J. and Singh J. (2001) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide-Y and substance P and their effects on insulin secretion from the in vitro pancreas of normal and diabetic rats. *Peptides* **22**, 99-107.
- Adori C., Ando R. D., Kovacs G. G. and Bagdy G. (2006) Damage of serotonergic axons and immunolocalization of Hsp27, Hsp72, and Hsp90 molecular chaperones after a single dose of MDMA administration in Dark Agouti rat: temporal, spatial, and cellular patterns. *J Comp Neurol* **497**, 251-269.
- Adrian T. E., Allen J. M., Bloom S. R., Ghatei M. A., Rossor M. N., Roberts G. W., Crow T. J., Tatemoto K. and Polak J. M. (1983) Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* **306**, 584-586.
- Ahmad I. (2001) Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2743-2748.
- Ahmad I., Tang L. and Pham H. (2000) Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 517-521.
- Ahmad I., Das A. V., James J., Bhattacharya S. and Zhao X. (2004) Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**, 53-62.
- Ahmed A., Johansson O. and Folan-Curran J. (1997) Distribution of PGP 9.5, TH, NPY, SP and CGRP immunoreactive nerves in the rat and guinea pig atrioventricular valves and chordae tendineae. *J Anat* **191 ( Pt 4)**, 547-560.
- Ajami K., Abbott C. A., McCaughan G. W. and Gorrell M. D. (2004) Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIP-like peptidase activity. *Biochim Biophys Acta* **1679**, 18-28.
- Alderton W. K., Cooper C. E. and Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**, 593-615.
- Alioua A., Huggins J. P. and Rousseau E. (1995) PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* **268**, L1057-1063.
- Allen Y. S., Adrian T. E., Allen J. M., Tatemoto K., Crow T. J., Bloom S. R. and Polak J. M. (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* **221**, 877-879.
- Álvaro A. R., Martins J., Costa A. C., Fernandes E., Carvalho F., Ambrósio A. F. and Cavadas C. (2007a) Neuropeptide Y protects retinal neural cells against cell death induced by ecstasy *Neuroscience In press*, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.10.12.1027.
- Álvaro A. R., Rosmaninho-Salgado J., Santiago A. R., Martins J., Aveleira C., Santos P. F., Pereira T., Gouveia D., Carvalho A. L., Grouzmann E., Ambrósio A. F. and Cavadas C. (2007b) NPY in rat retina is present in neurons, in endothelial cells and also in microglial and Müller cells. *Neurochem Int* **50**, 757-763.
- Alves E., Summavielle T., Alves C. J., Gomes-da-Silva J., Barata J. C., Fernandes E., Bastos Mde L., Tavares M. A. and Carvalho F. (2007) Monoamine oxidase-B mediates ecstasy-induced neurotoxic effects to adolescent rat brain mitochondria. *J Neurosci* **27**, 10203-10210.
- Amato J. L., Bankson M. G. and Yamamoto B. K. (2007) Prior exposure to chronic stress and MDMA potentiates mesoaccumbens dopamine release mediated by the 5-HT(1B) receptor. *Neuropsychopharmacology* **32**, 946-954.
- Ammar D. A., Hughes B. A. and Thompson D. A. (1998) Neuropeptide Y and the retinal pigment epithelium: receptor subtypes, signaling, and bioelectrical responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 1870-1878.
- Andersen D. K. (2007) Mechanisms and emerging treatments of the metabolic complications of chronic pancreatitis. *Pancreas* **35**, 1-15.
- Anderson D. J. (2001) Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* **30**, 19-35.
- Anderson N. G., Kilgour E. and Sturgill T. W. (1991) Activation of mitogen-activated protein kinase in BC3H1 myocytes by fluoroaluminate. *J Biol Chem* **266**, 10131-10135.

- Angers S., Salahpour A. and Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 409-435.
- Anitha M., Chandrasekharan B., Salgado J. R., Grouzmann E., Mwangi S., Sitaraman S. V. and Srinivasan S. (2006) Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology* **131**, 1164-1178.
- Aoki C. and Pickel V. M. (1989) Neuropeptide Y in the cerebral cortex and the caudate-putamen nuclei: ultrastructural basis for interactions with GABAergic and non-GABAergic neurons. *J Neurosci* **9**, 4333-4354.
- Aoki C. and Pickel V. M. (1990) Neuropeptide Y in cortex and striatum. Ultrastructural distribution and coexistence with classical neurotransmitters and neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci* **611**, 186-205.
- Archer S. L., Huang J. M., Hampf V., Nelson D. P., Shultz P. J. and Weir E. K. (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7583-7587.
- Armstrong B. D. and Noguchi K. K. (2004) The neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: an in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology* **25**, 905-914.
- Ashery-Padan R. and Gruss P. (2001) Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 706-714.
- Ault D. T. and Werling L. L. (1999) Phencyclidine and dizocilpine modulate dopamine release from rat nucleus accumbens via sigma receptors. *Eur J Pharmacol* **386**, 145-153.
- Azmitia E. C. (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* **56**, 413-424.
- Azmitia E. C., Murphy R. B. and Whitaker-Azmitia P. M. (1990) MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent toxicity linked to release. *Brain Res* **510**, 97-103.
- Bagnoli P., Dal Monte M. and Casini G. (2003) Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol* **18**, 1219-1242.
- Bai F., Lau S. S. and Monks T. J. (1999) Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyldopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* **12**, 1150-1157.
- Bal-Price A., Gartlon J. and Brown G. C. (2006) Nitric oxide stimulates PC12 cell proliferation via cGMP and inhibits at higher concentrations mainly via energy depletion. *Nitric Oxide* **14**, 238-246.
- Baraban S. C., Hollopeter G., Erickson J. C., Schwartzkroin P. A. and Palmiter R. D. (1997) Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *J Neurosci* **17**, 8927-8936.
- Barnea A., Aguila-Mansilla N., Bigio E. H., Worby C. and Roberts J. (1998) Evidence for regulated expression of neuropeptide Y gene by rat and human cultured astrocytes. *Regul Pept* **75-76**, 293-300.
- Barrios V. E., Sun J., Douglass J. and Toombs C. F. (1999) Evidence of a specific pancreatic polypeptide receptor in rat arterial smooth muscle. *Peptides* **20**, 1107-1113.
- Battaglia G., Brooks B. P., Kulsakdinun C. and De Souza E. B. (1988) Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur J Pharmacol* **149**, 159-163.
- Battaglia G., Fornai F., Busceti C. L., Aloisi G., Cerrito F., De Blasi A., Melchiorri D. and Nicoletti F. (2002) Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. *J Neurosci* **22**, 2135-2141.
- Batterham R. L., Cowley M. A., Small C. J., Herzog H., Cohen M. A., Dakin C. L., Wren A. M., Brynes A. E., Low M. J., Ghatei M. A., Cone R. D. and Bloom S. R. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**, 650-654.
- Baumann M. H., Clark R. D., Budzynski A. G., Partilla J. S., Blough B. E. and Rothman R. B. (2005) N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy'). *Neuropsychopharmacology* **30**, 550-560.
- Beal M. F., Mazurek M. F. and Martin J. B. (1987) A comparison of somatostatin and neuropeptide Y distribution in monkey brain. *Brain Res* **405**, 213-219.
- Beck B. (2006) Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1159-1185.

- Bellmann R., Widmann R., Olenik C., Meyer D. K., Maas D., Marksteiner J. and Sperk G. (1991) Enhanced rate of expression and biosynthesis of neuropeptide Y after kainic acid-induced seizures. *J Neurochem* **56**, 525-530.
- Berger U. V., Gu X. F. and Azmitia E. C. (1992) The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur J Pharmacol* **215**, 153-160.
- Berglund M. M., Hipskind P. A. and Gehlert D. R. (2003a) Recent Developments in Our Understanding of the Physiological Role of PP-Fold Peptide Receptor Subtypes. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 217-244.
- Berglund M. M., Schober D. A., Esterman M. A. and Gehlert D. R. (2003b) Neuropeptide Y Y4 Receptor Homodimers Dissociate upon Agonist Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 1120-1126.
- Bernschneider-Reif S., Oxler F. and Freudenmann R. W. (2006) The origin of MDMA ("ecstasy")--separating the facts from the myth. *Pharmazie* **61**, 966-972.
- Berridge M. J., Lipp P. and Bootman M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- Bhattacharya S., Jackson J. D., Das A. V., Thoreson W. B., Kuszynski C., James J., Joshi S. and Ahmad I. (2003) Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2764-2773.
- Biedermann B., Bringmann A., Franze K., Faude F., Wiedemann P. and Reichenbach A. (2004) GABA(A) receptors in Muller glial cells of the human retina. *Glia* **46**, 302-310.
- Bindokas V. P. and Miller R. J. (1995) Excitotoxic degeneration is initiated at non-random sites in cultured rat cerebellar neurons. *J Neurosci* **15**, 6999-7011.
- Bitran M., Tapia W., Eugenin E., Orio P. and Boric M. P. (1999) Neuropeptide Y induced inhibition of noradrenaline release in rat hypothalamus: role of receptor subtype and nitric oxide. *Brain Res* **851**, 87-93.
- Bleakman D., Colmers W. F., Fournier A. and Miller R. J. (1991) Neuropeptide Y inhibits Ca<sup>2+</sup> influx into cultured dorsal root ganglion neurones of the rat via a Y2 receptor. *Br J Pharmacol* **103**, 1781-1789.
- Bleakman D., Harrison N. L., Colmers W. F. and Miller R. J. (1992) Investigations into neuropeptide Y-mediated presynaptic inhibition in cultured hippocampal neurones of the rat. *Br J Pharmacol* **107**, 334-340.
- Blessing W. W. and Seaman B. (2003) 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience* **117**, 939-948.
- Blessing W. W., Seaman B., Pedersen N. P. and Ootsuka Y. (2003) Clozapine reverses hyperthermia and sympathetically mediated cutaneous vasoconstriction induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rabbits and rats. *J Neurosci* **23**, 6385-6391.
- Borowsky B., Walker M. W., Bard J., Weinshank R. L., Laz T. M., Vaysse P., Branchek T. A. and Gerald C. (1998) Molecular biology and pharmacology of multiple NPY Y5 receptor species homologs. *Regul Pept* **75-76**, 45-53.
- Braisted J. E., Essman T. F. and Raymond P. A. (1994) Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development* **120**, 2409-2419.
- Bredt D. S. and Snyder S. H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9030-9033.
- Bredt D. S. and Snyder S. H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**, 175-195.
- Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R. and Snyder S. H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718.
- Broening H. W., Bacon L. and Slikker W., Jr. (1994) Age modulates the long-term but not the acute effects of the serotonergic neurotoxicant 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 285-293.
- Broening H. W., Bowyer J. F. and Slikker W., Jr. (1995) Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 325-333.
- Brunken W. J. and Jin X. T. (1993) A role for 5HT<sub>3</sub> receptors in visual processing in the mammalian retina. *Vis Neurosci* **10**, 511-522.
- Bruun A. and Ehinger B. (1993) NPY-induced neurotransmitter release from the rabbit and chicken retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* **71**, 590-596.

- Bruun A., Tornqvist K. and Ehinger B. (1986) Neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the retina of different species. *Histochemistry* **86**, 135-140.
- Bruun A., Ehinger B. and Ekman R. (1991) Characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in vertebrate retina. *Exp Eye Res* **53**, 539-543.
- Bruun A., Edvinsson L. and Ehinger B. (1994) Neuropeptide Y inhibits adenylyl cyclase activity in rabbit retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* **72**, 326-331.
- Bruun A., Ehinger B., Sundler F., Tornqvist K. and Uddman R. (1984) Neuropeptide Y immunoreactive neurons in the guinea-pig uvea and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**, 1113-1123.
- Buchert R., Thomasius R., Wilke F., Petersen K., Nebeling B., Obrocki J., Schulze O., Schmidt U. and Clausen M. (2004) A voxel-based PET investigation of the long-term effects of "Ecstasy" consumption on brain serotonin transporters. *Am J Psychiatry* **161**, 1181-1189.
- Buchert R., Thomasius R., Nebeling B., Petersen K., Obrocki J., Jenicke L., Wilke F., Wartberg L., Zapletalova P. and Clausen M. (2003) Long-term effects of "ecstasy" use on serotonin transporters of the brain investigated by PET. *J Nucl Med* **44**, 375-384.
- Burgering B. M., Pronk G. J., van Weeren P. C., Chardin P. and Bos J. L. (1993a) cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *Embo J* **12**, 4211-4220.
- Burgering B. M., de Vries-Smits A. M., Medema R. H., van Weeren P. C., Tertoolen L. G. and Bos J. L. (1993b) Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol* **13**, 7248-7256.
- Caberlotto L., Fuxe K. and Hurd Y. L. (2000) Characterization of NPY mRNA-expressing cells in the human brain: co-localization with Y2 but not Y1 mRNA in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and striatum. *J Chem Neuroanat* **20**, 327-337.
- Cabrele C., Langer M., Bader R., Wieland H. A., Doods H. N., Zerbe O. and Beck-Sickingler A. G. (2000) The First Selective Agonist for the Neuropeptide YY5 Receptor Increases Food Intake in Rats. *J. Biol. Chem.* **275**, 36043-36048.
- Cadet J. L., Krasnova I. N., Jayanthi S. and Lyles J. (2007) Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotox Res* **11**, 183-202.
- Cai W. Q., Bodin P., Sexton A., Loesch A. and Burnstock G. (1993) Localization of neuropeptide Y and atrial natriuretic peptide in the endothelial cells of human umbilical blood vessels. *Cell Tissue Res* **272**, 175-181.
- Cano E. and Mahadevan L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* **20**, 117-122.
- Capela J. P., Fernandes E., Remiao F., Bastos M. L., Meisel A. and Carvalho F. (2007) Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology* **28**, 868-875.
- Capela J. P., Meisel A., Abreu A. R., Branco P. S., Ferreira L. M., Lobo A. M., Remiao F., Bastos M. L. and Carvalho F. (2006a) Neurotoxicity of Ecstasy Metabolites in Rat Cortical Neurons, and Influence of Hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 53-61.
- Capela J. P., Ruscher K., Lautenschlager M., Freyer D., Dirnagl U., Gaio A. R., Bastos M. L., Meisel A. and Carvalho F. (2006b) Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. *Neuroscience* **139**, 1069-1081.
- Capurro D. and Huidobro-Toro J. P. (1999) The involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIBO 3304. *Eur J Pharmacol* **376**, 251-255.
- Carvalho M., Carvalho F. and Bastos M. L. (2001) Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch Toxicol* **74**, 789-793.
- Carvalho M., Carvalho F., Remiao F., de Lourdes Pereira M., Pires-das-Neves R. and de Lourdes Bastos M. (2002) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol* **76**, 166-172.
- Carvalho M., Remiao F., Milhazes N., Borges F., Fernandes E., Monteiro Mdo C., Goncalves M. J., Seabra V., Amado F., Carvalho F. and Bastos M. L. (2004) Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro. *Chem Res Toxicol* **17**, 623-632.

- Cavadas C., Silva A. P., Mosimann F., Cotrim M. D., Ribeiro C. A. F., Brunner H. R. and Grouzmann E. (2001) NPY Regulates Catecholamine Secretion from Human Adrenal Chromaffin Cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5956-5963.
- Cavadas C., Cefai D., Rosmaninho-Salgado J., Vieira-Coelho M. A., Moura E., Busso N., Pedrazzini T., Grand D., Rotman S., Waeber B., Aubert J. F. and Grouzmann E. (2006) Deletion of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10497-10502.
- Cayre M., Malaterre J., Scotto-Lomassese S., Holstein G. R., Martinelli G. P., Forni C., Nicolas S., Aouane A., Strambi C. and Strambi A. (2005) A role for nitric oxide in sensory-induced neurogenesis in an adult insect brain. *Eur J Neurosci* **21**, 2893-2902.
- Cellerino A., Bahr M. and Isenmann S. (2000) Apoptosis in the developing visual system. *Cell Tissue Res* **301**, 53-69.
- Cepko C. L., Austin C. P., Yang X., Alexiades M. and Ezzeddine D. (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 589-595.
- Chan S. L. and Mattson M. P. (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* **58**, 167-190.
- Chen H. J., Rojas-Soto M., Oguni A. and Kennedy M. B. (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* **20**, 895-904.
- Chidlow G., Le Corre S. and Osborne N. N. (1998) Localization of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptors in rabbit ocular and brain tissues. *Neuroscience* **87**, 675-689.
- Cho Y. R. and Kim C. W. (2004) Neuropeptide Y promotes beta-cell replication via extracellular signal-regulated kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 773-780.
- Choi D. W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* **11**, 465-469.
- Choi D. W. and Rothman S. M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* **13**, 171-182.
- Chow R. L. and Lang R. A. (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 255-296.
- Chu T., Kumagai Y., DiStefano E. W. and Cho A. K. (1996a) Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem Pharmacol* **51**, 789-796.
- Chu Y., Solski P. A., Khosravi-Far R., Der C. J. and Kelly K. (1996b) The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* **271**, 6497-6501.
- Chuang J. C. and Raymond P. A. (2002) Embryonic origin of the eyes in teleost fish. *Bioessays* **24**, 519-529.
- Clauwaert K. M., Van Bocxlaer J. F., De Letter E. A., Van Calenbergh S., Lambert W. E. and De Leenheer A. P. (2000) Determination of the Designer Drugs 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-Methylenedioxyamphetamine with HPLC and Fluorescence Detection in Whole Blood, Serum, Vitreous Humor, and Urine. *Clin Chem* **46**, 1968-1977.
- Cobb M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 479-500.
- Cohen P. (1997) The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **7**, 353-361.
- Cohen R. S. and Cocores J. (1997) Neuropsychiatric manifestations following the use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA: "Ecstasy"). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **21**, 727-734.
- Colado M. I., O'Shea E. and Green A. R. (2004) Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 249-263.
- Colado M. I., Camarero J., Mechan A. O., Sanchez V., Esteban B., Elliott J. M. and Green A. R. (2001) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* **134**, 1711-1723.
- Colmers W. F. and Pittman Q. J. (1989) Presynaptic inhibition by neuropeptide Y and baclofen in hippocampus: insensitivity to pertussis toxin treatment. *Brain Res* **498**, 99-104.
- Colmers W. F., Lukowiak K. and Pittman Q. J. (1988) Neuropeptide Y action in the rat hippocampal slice: site and mechanism of presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* **8**, 3827-3837.

- Colombaioni L., Cellerino A. and Galli-Resta L. (1998) Intracellular calcium transients during neuronal death in the developing retina. *Eur J Neurosci Suppl* **10**, 11-13.
- Commins D. L., Vosmer G., Virus R. M., Woolverton W. L., Schuster C. R. and Seiden L. S. (1987) Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **241**, 338-345.
- Conn P. J. and Pin J. P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-237.
- Cook S. J. and McCormick F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1072.
- Cornwell T. L., Arnold E., Boerth N. J. and Lincoln T. M. (1994) Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* **267**, C1405-1413.
- Corp E. S., McQuade J., Krasnicki S. and Conze D. B. (2001) Feeding after fourth ventricular administration of neuropeptide Y receptor agonists in rats. *Peptides* **22**, 493-499.
- Cox H. M. and Tough I. R. (2002) Neuropeptide Y, Y1, Y2 and Y4 receptors mediate Y agonist responses in isolated human colon mucosa. *Br J Pharmacol* **135**, 1505-1512.
- Creighton F. J., Black D. L. and Hyde C. E. (1991) 'Ecstasy' psychosis and flashbacks. *Br J Psychiatry* **159**, 713-715.
- Crespi D., Mennini T. and Gobbi M. (1997) Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol* **121**, 1735-1743.
- Cunha-Oliveira T., Rego A. C., Cardoso S. M., Borges F., Swerdlow R. H., Macedo T. and de Oliveira C. R. (2006) Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. *Brain Res* **1089**, 44-54.
- D'Angelo I. and Brecha N. C. (2004) Y2 receptor expression and inhibition of voltage-dependent ca(2+) influx into rod bipolar cell terminals. *Neuroscience* **125**, 1039-1049.
- D'Angelo I., Oh S. J., Chun M. H. and Brecha N. C. (2002) Localization of neuropeptide Y1 receptor immunoreactivity in the rat retina and the synaptic connectivity of Y1 immunoreactive cells. *J Comp Neurol* **454**, 373-382.
- Dafters R. I. (1995) Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. *Physiol Behav* **58**, 877-882.
- Dafters R. I. and Lynch E. (1998) Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy") but not by fenfluramine. *Psychopharmacology (Berl)* **138**, 207-212.
- de la Torre R. and Farre M. (2004) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 505-508.
- de la Torre R., Farre M., Navarro M., Pacifici R., Zuccaro P. and Pichini S. (2004) Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin Pharmacokinet* **43**, 157-185.
- de la Torre R., Farre M., Ortuno J., Mas M., Brenneisen R., Roset P. N., Segura J. and Cami J. (2000) Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans. *Br J Clin Pharmacol* **49**, 104-109.
- De Letter E., Clauwaert K., Belpaire F., Lambert W., Van Bocxlaer J. and Piette M. (2002a) Post-mortem redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rabbit. *Int J Legal Med* **116**, 216-224.
- De Letter E. A., Belpaire F. M., Clauwaert K. M., Lambert W. E., Van Bocxlaer J. F. and Piette M. H. (2002b) Post-mortem redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rabbit. Part II: post-mortem infusion in trachea or stomach. *Int J Legal Med* **116**, 225-232.
- De Letter E. A., De Paepe P., Clauwaert K. M., Belpaire F. M., Lambert W. E., Van Bocxlaer J. F. and Piette M. H. A. (2000) Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? *Int J Legal Med* **114**, 29-35.
- de Quidt M. E. and Emson P. C. (1986a) Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system—II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **18**, 545-618.
- de Quidt M. E. and Emson P. C. (1986b) Neuropeptide Y in the adrenal gland: characterization, distribution and drug effects. *Neuroscience* **19**, 1011-1022.

- De Souza I., Kelly J. P., Harkin A. J. and Leonard B. E. (1997) An appraisal of the pharmacological and toxicological effects of a single oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the rat. *Pharmacol Toxicol* **80**, 207-210.
- Dean M. K., Higgs C., Smith R. E., Bywater R. P., Snell C. R., Scott P. D., Upton G. J., Howe T. J. and Reynolds C. A. (2001) Dimerization of G-protein-coupled receptors. *J Med Chem* **44**, 4595-4614.
- Delalle I., Evers P., Kostovic I. and Uylings H. B. (1997) Laminar distribution of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in human prefrontal cortex during development. *J Comp Neurol* **379**, 515-522.
- Demeulemeester H., Vandesande F., Orban G. A., Brandon C. and Vanderhaeghen J. J. (1988) Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J Neurosci* **8**, 988-1000.
- Devi L. A. (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 532-537.
- Dimitrijevic M., Stanojevic S., Micic S., Vujic V., Kovacevic-Jovanovic V., Mitic K., von Horsten S. and Kosec D. (2006) Neuropeptide Y (NPY) modulates oxidative burst and nitric oxide production in carrageenan-elicited granulocytes from rat air pouch. *Peptides* **27**, 3208-3215.
- Ding J. D. and Weinberg R. J. (2007) Distribution of soluble guanylyl cyclase in rat retina. *J Comp Neurol* **502**, 734-745.
- Dinger M. C., Bader J. E., Kobor A. D., Kretschmar A. K. and Beck-Sickinger A. G. (2003) Homodimerization of neuropeptide y receptors investigated by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* **278**, 10562-10571.
- Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716.
- Dogru M. and Tsubota K. (2005) Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* **140**, 305-306.
- Domin H., Kajta M. and Smialowska M. (2006) Neuroprotective effects of MTEP, a selective mGluR5 antagonist and neuropeptide Y on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. *Pharmacol Rep* **58**, 846-858.
- Donati G., Pournaras C. J. and Tsacopoulos M. (1998) Effect of nitroprusside on arteriolar constriction after retinal branch vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 1910-1917.
- Du M., Islam M. M., Lin L., Ohmura Y., Moriyama Y. and Fujimura S. (1997) Promotion of proliferation of murine BALB/C3T3 fibroblasts mediated by nitric oxide at lower concentrations. *Biochem Mol Biol Int* **41**, 625-631.
- Dudley D. T., Pang L., Decker S. J., Bridges A. J. and Saltiel A. R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7686-7689.
- Dumont Y., Cadieux A., Pheng L. H., Fournier A., St-Pierre S. and Quirion R. (1994) Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y1 and Y2 agonists devoided of activity for the Y3 receptor sub-type. *Brain Res Mol Brain Res* **26**, 320-324.
- Dyer M. A. and Cepko C. L. (2000) Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* **3**, 873-880.
- Ebara S., Kumamoto K. and Matsuura T. (1992) [Peptidergic innervation in the sinus hair follicles of several mammalian species]. *Kaibogaku Zasshi* **67**, 623-633.
- El Bahh B., Cao J. Q., Beck-Sickinger A. G. and Colmers W. F. (2002) Blockade of neuropeptide Y(2) receptors and suppression of NPY's anti-epileptic actions in the rat hippocampal slice by BIIE0246. *Br J Pharmacol* **136**, 502-509.
- Engelhardt M., Wachs F. P., Couillard-Despres S., Aigner L. (2004) The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* **78** 1025-36.
- English J., Pearson G., Wilsbacher J., Swantek J., Karandikar M., Xu S. and Cobb M. H. (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* **253**, 255-270.
- Erickson J. C., Clegg K. E. and Palmiter R. D. (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* **381**, 415-421.
- Esteban B., O'Shea E., Camarero J., Sanchez V., Green A. R. and Colado M. I. (2001a) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Berl)* **154**, 251-260.

- Esteban F. J., Jimenez A., Fernandez A. P., del Moral M. L., Sanchez-Lopez A. M., Hernandez R., Garrosa M., Pedrosa J. A., Rodrigo J. and Peinado M. A. (2001b) Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the guinea-pig liver: distribution and colocalization with neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide. *Liver* **21**, 374-379.
- Estrada C. and Murillo-Carretero M. (2005) Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* **11**, 294-307.
- Ewald D. A., Sternweis P. C. and Miller R. J. (1988) Guanine nucleotide-binding protein Go-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca<sup>2+</sup> channels in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3633-3637.
- Farfel G. M. and Seiden L. S. (1995) Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. II. Experiments with methamphetamine, p-chloroamphetamine, fenfluramine, dizocilpine and dextromethorphan. *J Pharmacol Exp Ther* **272**, 868-875.
- Farnsworth C. L., Freshney N. W., Rosen L. B., Ghosh A., Greenberg M. E. and Feig L. A. (1995) Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* **376**, 524-527.
- Farre M., de la Torre R., Mathuna B. O., Roset P. N., Peiro A. M., Torrens M., Ortuno J., Pujadas M. and Cami J. (2004) Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 364-375.
- Favata M. F., Horiuchi K. Y., Manos E. J., Daulerio A. J., Stradley D. A., Feeser W. S., Van Dyk D. E., Pitts W. J., Earl R. A., Hobbs F., Copeland R. A., Magolda R. L., Scherle P. A. and Trzaskos J. M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**, 18623-18632.
- Fernandez-Vivero J., Rodriguez-Sanchez F., Verastegui C., Cordoba Moriano F., Romero A. and de Castro J. M. (1993) Immunocytochemical distribution of serotonin and neuropeptide Y (NPY) in mouse adrenal gland. *Histol Histopathol* **8**, 509-520.
- Ferriero D. M. and Sagar S. M. (1989) Development of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* **48**, 19-26.
- Fiege M., Wappler F., Weisshorn R., Gerbershagen M. U., Menge M. and Schulte Am Esch J. (2003) Induction of malignant hyperthermia in susceptible swine by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Anesthesiology* **99**, 1132-1136.
- Fimbel S. M., Montgomery J. E., Burket C. T., Hyde D. R. (2007) Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* **27** 1712-24.
- Firth A. Y. (2006) Editorial: ocular effects of criminal drug use. *Can J Ophthalmol* **41**, 140-146.
- Fischer A. J. and Reh T. A. (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* **220**, 197-210.
- Fischer A. J. and Reh T. A. (2001) Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* **4**, 247-252.
- Fitzgerald J. L. and Reid J. J. (1994) Sympathomimetic actions of methylenedioxymethamphetamine in rat and rabbit isolated cardiovascular tissues. *J Pharm Pharmacol* **46**, 826-832.
- Forrester J. V., Dick A. D., McMenamin P. G. and Lee W. R. (2002) *The Eye - Basic Sciences in Practice*. **2nd Edition**.
- Forstermann U., Pollock J. S., Schmidt H. H., Heller M. and Murad F. (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1788-1792.
- Foucart S., Bleakman D., Bindokas V. P. and Miller R. J. (1993) Neuropeptide Y and pancreatic polypeptide reduce calcium currents in acutely dissociated neurons from adult rat superior cervical ganglia. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 903-909.
- Frank S., Kampfer H., Podda M., Kaufmann R. and Pfeilschifter J. (2000) Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J* **346 Pt 3**, 719-728.
- Frodin M., Peraldi P. and Van Obberghen E. (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* **269**, 6207-6214.
- Frodin M., Sekine N., Roche E., Filloux C., Prentki M., Wollheim C. B. and Van Obberghen E. (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* **270**, 7882-7889.

- Fujisaki H., Ito H., Hirata Y., Tanaka M., Hata M., Lin M., Adachi S., Akimoto H., Marumo F. and Hiroe M. (1995) Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* **96**, 1059-1065.
- Furtinger S., Pirker S., Czech T., Baumgartner C., Ransmayr G. and Sperk G. (2001) Plasticity of Y1 and Y2 receptors and neuropeptide Y fibers in patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **21**, 5804-5812.
- Furukawa T., Mukherjee S., Bao Z. Z., Morrow E. M. and Cepko C. L. (2000) *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**, 383-394.
- Gage F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438.
- Galineau L., Belzung C., Kudas E., Bodard S., Guilloteau D. and Chalon S. (2005) Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) exposure induces long-term alterations in the dopaminergic and serotonergic functions in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **154**, 165-176.
- Gammon C. M., Lyons S. A. and Morell P. (1990) Modulation by neuropeptides of bradykinin-stimulated second messenger release in dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **518**, 159-165.
- Gao X. B., Ghosh P. K. and van den Pol A. N. (2003) Neurons synthesizing melanin-concentrating hormone identified by selective reporter gene expression after transfection in vitro: transmitter responses. *J Neurophysiol* **90**, 3978-3985.
- Garcia M. and Vecino E. (2003) Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol* **18**, 1205-1218.
- Garthwaite J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**, 60-67.
- Garthwaite J. and Boulton C. L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**, 683-706.
- Garthwaite J., Charles S. L. and Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**, 385-388.
- Gerald C., Walker M. W., Criscione L., Gustafson E. L., Batzl-Hartmann C., Smith K. E., Vaysse P., Durkin M. M., Laz T. M., Linemeyer D. L., Schaffhauser A. O., Whitebread S., Hofbauer K. G., Taber R. I., Branchek T. A. and Weinshank R. L. (1996) A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* **382**, 168-171.
- Gherzi G., Chen W., Lee E. W. and Zukowska Z. (2001) Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding. *Peptides* **22**, 453-458.
- Gimpl G., Kirchhoff F., Lang R. E. and Kettenmann H. (1993) Identification of neuropeptide Y receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain. *J Neurosci Res* **34**, 198-205.
- Ginap T. and Kilbinger H. (1998) Inhibition by nitric oxide and cyclic GMP of 5-hydroxytryptamine release from the vascularly perfused guinea-pig small intestine. *Neurochem Int* **32**, 487-492.
- Goldman S. (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* **26**, 590-596.
- Gomes I., Jordan B. A., Gupta A., Trapaidze N., Nagy V. and Devi L. A. (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**, RC110.
- Gomes I., Jordan B. A., Gupta A., Rios C., Trapaidze N. and Devi L. A. (2001) G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* **79**, 226-242.
- Gonzalez-Albo M. C., Elston G. N. and DeFelipe J. (2001) The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cereb Cortex* **11**, 1170-1181.
- Gordon C. J., Watkinson W. P., O'Callaghan J. P. and Miller D. B. (1991) Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **38**, 339-344.
- Gotzes S., de Vente J. and Muller F. (1998) Nitric oxide modulates cGMP levels in neurons of the inner and outer retina in opposite ways. *Vis Neurosci* **15**, 945-955.
- Goureau O., Lepoivre M., Becquet F. and Courtois Y. (1993) Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor beta in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4276-4280.
- Graham J. K., Kunze E. and Hammerstedt R. H. (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* **43**, 55-64.

- Grant M. B., Davis M. I., Caballero S., Feoktistov I., Biaggioni I. and Belardinelli L. (2001) Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2068-2073.
- Gray H. (1999) *Gray's Anatomy. Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA 38th Edition.*
- Greber S., Schwarzer C. and Sperk G. (1994) Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br J Pharmacol* **113**, 737-740.
- Green A. R., Mehan A. O., Elliott J. M., O'Shea E. and Colado M. I. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* **55**, 463-508.
- Green A. R., O'Shea E., Saadat K. S., Elliott J. M. and Colado M. I. (2005) Studies on the effect of MDMA ('ecstasy') on the body temperature of rats housed at different ambient room temperatures. *Br J Pharmacol* **146**, 306-312.
- Gregor P., Millham M. L., Feng Y., DeCarr L. B., McCaleb M. L. and Cornfield L. J. (1996) Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett* **381**, 58-62.
- Groom L. A., Sneddon A. A., Alessi D. R., Dowd S. and Keyse S. M. (1996) Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* **15**, 3621-3632.
- Grouzmann E., Comoy E., Walker P., Burnier M., Bohuon C., Waeber B. and Brunner H. (1992) Production and characterization of four anti-neuropeptide Y monoclonal antibodies. *Hybridoma* **11**, 409-424.
- Grundemar L. and Hakanson R. (1993) Multiple neuropeptide Y receptors are involved in cardiovascular regulation. Peripheral and central mechanisms. *Gen Pharmacol* **24**, 785-796.
- Grundemar L., Krstenansky J. L. and Hakanson R. (1993) Activation of neuropeptide Y1 and neuropeptide Y2 receptors by substituted and truncated neuropeptide Y analogs: identification of signal epitopes. *Eur J Pharmacol* **232**, 271-278.
- Grundemar L., Jonas S. E., Morner N., Hogestatt E. D., Wahlestedt C. and Hakanson R. (1992) Characterization of vascular neuropeptide Y receptors. *Br J Pharmacol* **105**, 45-50.
- Grunditz T., Hakanson R., Rerup C., Sundler F. and Uddman R. (1984) Neuropeptide Y in the thyroid gland: neuronal localization and enhancement of stimulated thyroid hormone secretion. *Endocrinology* **115**, 1537-1542.
- Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Gu J., Polak J. M., Adrian T. E., Allen J. M., Tatemoto K. and Bloom S. R. (1983) Neuropeptide tyrosine (NPY)--a major cardiac neuropeptide. *Lancet* **1**, 1008-1010.
- Guan K. L. and Dixon J. E. (1993) Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases. *Semin Cell Biol* **4**, 389-396.
- Gupta N., Brown K. E. and Milam A. H. (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* **76**, 463-471.
- Gutkind J. S. (1998) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**, 1839-1842.
- Hajri A., Metzger E., Vallat F., Coffy S., Flatter E., Evrard S., Marescaux J. and Aprahamian M. (1998) Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. *Br J Cancer* **78**, 841-849.
- Hanada S., Terada Y., Inoshita S., Sasaki S., Lohmann S. M., Smolenski A. and Marumo F. (2001) Overexpression of protein kinase G using adenovirus inhibits cyclin E transcription and mesangial cell cycle. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F851-859.
- Hansel D., Eipper BA, Ronnet, GV (2001) Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* **410**, 940-944.
- Hashimoto T., Zhang X. M., Chen B. Y. and Yang X. J. (2006) VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* **133**, 2201-2210.
- Hastings J. A., Morris M. J., Lambert G., Lambert E. and Esler M. (2004) NPY and NPY Y1 receptor effects on noradrenaline overflow from the rat brain in vitro. *Regul Pept* **120**, 107-112.
- Hayashi Y., Nishio M., Naito Y., Yokokura H., Nimura Y., Hidaka H. and Watanabe Y. (1999) Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem* **274**, 20597-20602.

- Hecquet C., Lefevre G., Valtink M., Engelmann K. and Mascarelli F. (2002) cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. *Oncogene* **21**, 6101-6112.
- Hendry S. H., Jones E. G., DeFelipe J., Schmechel D., Brandon C. and Emson P. C. (1984) Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6526-6530.
- Henry J. A. (1992) Ecstasy and the dance of death. *Bmj* **305**, 5-6.
- Henry J. A., Fallon J. K., Kicman A. T., Hutt A. J., Cowan D. A. and Forsling M. (1998) Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion. *Lancet* **351**, 1784.
- Herskowitz I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**, 187-197.
- Herzog H. (2002) Hypothalamic Y2 Receptors: Central Coordination of Energy Homeostasis and Bone Mass Regulation. *Drug News Perspect* **15**, 506-510.
- Hevel J. M., White K. A. and Marletta M. A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* **266**, 22789-22791.
- Hewton R., Salem A. and Irvine R. J. (2007) Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT release in the rat substantia nigra by clorgyline, a monoamine oxidase A inhibitor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 1051-1057.
- Hicks D. and Courtois Y. (1990) The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res* **51**, 119-129.
- Hiramatsu M., Kumagai Y., Unger S. E. and Cho A. K. (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther* **254**, 521-527.
- Ho E., Karimi-Tabesh L. and Koren G. (2001) Characteristics of pregnant women who use ecstasy (3, 4-methylenedioxymethamphetamine). *Neurotoxicol Teratol* **23**, 561-567.
- Honjo M., Tanihara H., Nishijima K., Kiryu J., Honda Y., Yue B. Y. and Sawamura T. (2002) Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* **120**, 1707-1713.
- Hood J. and Granger H. J. (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 23504-23508.
- Horvath T. L., Bechmann I., Naftolin F., Kalra S. P. and Leranath C. (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res* **756**, 283-286.
- Horvath T. L., Pu S., Dube M. G., Diano S. and Kalra S. P. (2001) A GABA-neuropeptide Y (NPY) interplay in LH release. *Peptides* **22**, 473-481.
- Hosoya K., Tomi M., Ohtsuki S., Takanaga H., Ueda M., Yanai N., Obinata M. and Terasaki T. (2001) Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat. *Exp Eye Res* **72**, 163-172.
- Howe L. R. and Marshall C. J. (1993) Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *J Biol Chem* **268**, 20717-20720.
- Howell O. W., Scharfman H. E., Herzog H., Sundstrom L. E., Beck-Sickinger A. and Gray W. P. (2003) Neuropeptide Y is neuroproliferative for post-natal hippocampal precursor cells. *J Neurochem* **86**, 646-659.
- Howell O. W., Doyle K., Goodman J. H., Scharfman H. E., Herzog H., Pringle A., Beck-Sickinger A. G. and Gray W. P. (2005) Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. *J Neurochem* **93**, 560-570.
- Howell O. W., Silva S., Scharfman H. E., Sosunov A. A., Zaben M., Shatya A., McKhann G., 2nd, Herzog H., Laskowski A. and Gray W. P. (2007) Neuropeptide Y is important for basal and seizure-induced precursor cell proliferation in the hippocampus. *Neurobiol Dis* **26**, 174-188.
- <http://learn.genetics.utah.edu>.
- Hu Y., Bloomquist B. T., Cornfield L. J., DeCarr L. B., Flores-Riveros J. R., Friedman L., Jiang P., Lewis-Higgins L., Sadlowski Y., Schaefer J., Velazquez N. and McCaleb M. L. (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem* **271**, 26315-26319.
- Husum H., Bolwig T. G., Sanchez C., Mathe A. A. and Hansen S. L. (2004) Levetiracetam prevents changes in levels of brain-derived neurotrophic factor and neuropeptide Y mRNA and of Y1- and Y5-like receptors in the

- hippocampus of rats undergoing amygdala kindling: implications for antiepileptogenic and mood-stabilizing properties. *Epilepsy Behav* **5**, 204-215.
- Hutchinson H. G., Trindade P. T., Cunanán D. B., Wu C. F. and Pratt R. E. (1997) Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **35**, 158-167.
- Hutsler J. J. and Chalupa L. M. (1994) Neuropeptide Y immunoreactivity identifies a regularly arrayed group of amacrine cells within the cat retina. *J Comp Neurol* **346**, 481-489.
- Hutsler J. J. and Chalupa L. M. (1995) Development of neuropeptide Y immunoreactive amacrine and ganglion cells in the pre- and postnatal cat retina. *J Comp Neurol* **361**, 152-164.
- Hutsler J. J., White C. A. and Chalupa L. M. (1993) Neuropeptide Y immunoreactivity identifies a group of gamma-type retinal ganglion cells in the cat. *J Comp Neurol* **336**, 468-480.
- Hwa J. J., Witten M. B., Williams P., Ghibaudi L., Gao J., Salisbury B. G., Mullins D., Hamud F., Strader C. D. and Parker E. M. (1999) Activation of the NPY Y5 receptor regulates both feeding and energy expenditure. *Am J Physiol* **277**, R1428-1434.
- Ientile R., Picciurro V., Pedale S., Nucci C., Malecka B., Nistico G. and Macaione S. (1996) Nitric oxide enhances amino acid release from immature chick embryo retina. *Neurosci Lett* **219**, 79-82.
- Inomata Y., Nakamura H., Tanito M., Teratani A., Kawaji T., Kondo N., Yodoi J. and Tanihara H. (2006) Thioredoxin inhibits NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *J Neurochem* **98**, 372-385.
- Itzhak Y., Ali S. F., Achat C. N. and Anderson K. L. (2003) Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **166**, 241-248.
- Jackerott M. and Larsson L. I. (1997) Immunocytochemical localization of the NPY/PYY Y1 receptor in enteric neurons, endothelial cells, and endocrine-like cells of the rat intestinal tract. *J Histochem Cytochem* **45**, 1643-1650.
- Jacks A. S. and Hykin P. G. (1998) Retinal haemorrhage caused by "ecstasy". *Br J Ophthalmol* **82**, 842-843.
- Jacques D., Sader S., Perreault C., Fournier A., Pelletier G., Beck-Sickinger A. G. and Descorbeth M. (2003) Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 288-300.
- Janssens S. P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D. B. and Bloch K. D. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**, 14519-14522.
- Jen P. Y., Li W. W. and Yew D. T. (1994) Immunohistochemical localization of neuropeptide Y and somatostatin in human fetal retina. *Neuroscience* **60**, 727-735.
- Jimenez A., Jorda E. G., Verdaguer E., Pubill D., Sureda F. X., Canudas A. M., Escubedo E., Camarasa J., Camins A. and Pallas M. (2004) Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 223-234.
- Johns P. R. (1977) Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J Comp Neurol* **176**, 343-357.
- Johnson E. A., Sharp D. S. and Miller D. B. (2000) Restraint as a stressor in mice: against the dopaminergic neurotoxicity of D-MDMA, low body weight mitigates restraint-induced hypothermia and consequent neuroprotection. *Brain Res* **875**, 107-118.
- Johnson M., Bush L. G., Hanson G. R. and Gibb J. W. (1993) Effects of ritanserin on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced decrease in striatal serotonin concentration and on the increase in striatal neurotensin and dynorphin A concentrations. *Biochem Pharmacol* **46**, 770-772.
- Johnson M. P., Hoffman A. J. and Nichols D. E. (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **132**, 269-276.
- Jones D. C., Duvauchelle C., Ikegami A., Olsen C. M., Lau S. S., de la Torre R. and Monks T. J. (2005) Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 422-431.
- Jones E. G. and Hendry S. H. (1986) Peptide-containing neurons of the primate cerebral cortex. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **64**, 163-178.
- Jones P. M., Ghatei M. A., Steel J., O'Halloran D., Gon G., Legon S., Burrin J. M., Leonhardt U., Polak J. M. and Bloom S. R. (1989) Evidence for neuropeptide Y synthesis in the rat anterior pituitary and the influence of thyroid hormone status: comparison with vasoactive intestinal peptide, substance P, and neurotensin. *Endocrinology* **125**, 334-341.

- Jotwani G., Itoh K. and Wadhwa S. (1994) Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase, substance P, neuropeptide-Y and leucine-enkephalin in developing human retinal amacrine cells. *Brain Res Dev Brain Res* **77**, 285-289.
- Kawada N., Seki S., Kuroki T. and Inoue M. (1998) Regulation of stellate cell proliferation by lipopolysaccharide: role of endogenous nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol* **13 Suppl**, S6-13.
- Keffel S., Schmidt M., Bischoff A. and Michel M. C. (1999) Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 1172-1178.
- Kelley S. P., Nannini M. A., Bratt A. M. and Hodge C. W. (2001) Neuropeptide-Y in the paraventricular nucleus increases ethanol self-administration. *Peptides* **22**, 515-522.
- Kenyon K. R. and Tseng S. C. (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* **96**, 709-722; discussion 722-703.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Keynes R. G. and Garthwaite J. (2004) Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med* **4**, 179-191.
- Khoo S. and Cobb M. H. (1997) Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5599-5604.
- Kim K. Y., Moon J. I., Lee E. J., Lee Y. J., Kim I. B., Park C. K., Oh S. J. and Chun M. H. (2002) The effect of L-arginine, a nitric oxide synthase substrate, on retinal cell proliferation in the postnatal rat. *Dev Neurosci* **24**, 313-321.
- Kirch W., Horneber M. and Tamm E. R. (1996) Characterization of Meibomian gland innervation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Anat Embryol (Berl)* **193**, 365-375.
- Kish S. J., Furukawa Y., Ang L., Vorce S. P. and Kalasinsky K. S. (2000) Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user. *Neurology* **55**, 294-296.
- Kitaoka Y., Kumai T., Isenoumi K., Kitaoka Y., Motoki M., Kobayashi S. and Ueno S. (2003) Neuroprotective effect of nitric oxide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina is associated with tyrosine hydroxylase expression. *Brain Res* **977**, 46-54.
- Kitlinska J., Abe K., Kuo L., Pons J., Yu M., Li L., Tilan J., Everhart L., Lee E. W., Zukowska Z. and Toretsky J. A. (2005) Differential effects of neuropeptide Y on the growth and vascularization of neural crest-derived tumors. *Cancer Res* **65**, 1719-1728.
- Klassen H., Kiilgaard J. F., Zahir T., Ziaeiian B., Kirov I., Scherfig E., Warfvinge K. and Young M. J. (2007) Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. *Stem Cells* **25**, 1222-1230.
- Klemp K. and Woldbye D. P. (2001) Repeated inhibitory effects of NPY on hippocampal CA3 seizures and wet dog shakes. *Peptides* **22**, 523-527.
- Knipping S., Holzhausen H. J., Riederer A. and Berghaus A. (2003) [NPY in human nasal mucosa -- an immunocytochemical and immunoelectron microscopical study]. *Laryngorhinootologie* **82**, 109-113.
- Kofler N., Kirchmair E., Schwarzer C. and Sperk G. (1997) Altered expression of NPY-Y1 receptors in kainic acid induced epilepsy in rats. *Neurosci Lett* **230**, 129-132.
- Koprach J. B., Chen E. Y., Kanaan N. M., Campbell N. G., Kordower J. H. and Lipton J. W. (2003) Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters exploratory behavior, reduces monoamine metabolism, and increases forebrain tyrosine hydroxylase fiber density of juvenile rats. *Neurotoxicol Teratol* **25**, 509-517.
- Korner M., Waser B. and Reubi J. C. (2004) High expression of neuropeptide y receptors in tumors of the human adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. *Clin Cancer Res* **10**, 8426-8433.
- Koulu M., Movafagh S., Tuohimaa J., Jaakkola U., Kallio J., Pesonen U., Geng Y., Karvonen M. K., Vainio-Jylha E., Pollonen M., Kaipio-Salmi K., Seppala H., Lee E. W., Higgins R. D. and Zukowska Z. (2004) Neuropeptide Y and Y2-receptor are involved in development of diabetic retinopathy and retinal neovascularization. **36**, 232-240.
- Kranz A., Kendall M. D. and von Gaudecker B. (1997) Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. *J Anat* **191 ( Pt 3)**, 441-450.
- Kraus M. M. and Prast H. (2001) The nitric oxide system modulates the in vivo release of acetylcholine in the nucleus accumbens induced by stimulation of the hippocampal fornix/fimbria-projection. *Eur J Neurosci* **14**, 1105-1112.

- Krischel V., Bruch-Gerharz D., Suschek C., Kroncke K. D., Ruzicka T. and Kolb-Bachofen V. (1998) Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol* **111**, 286-291.
- Lambert R. W., Campton K., Ding W., Ozawa H. and Granstein R. D. (2002) Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY. *Neuropeptides* **36**, 246-251.
- Larhammar D., Blomqvist A. G., Yee F., Jazin E., Yoo H. and Wahlested C. (1992) Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J. Biol. Chem.* **267**, 10935-10938.
- Leal E. C., Santiago A. R. and Ambrosio A. F. (2005) Old and new drug targets in diabetic retinopathy: from biochemical changes to inflammation and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 421-434.
- Leal E. C., Manivannan A., Hosoya K., Terasaki T., Cunha-Vaz J., Ambrósio A. F. and Forrester J. V. (2007) Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, In press.
- Lecklin A., Lundell I., Salmela S., Mannisto P. T., Beck-Sickinger A. G. and Larhammar D. (2003) Agonists for neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 stimulate different phases of feeding in guinea pigs. *Br J Pharmacol* **139**, 1433-1440.
- Lee E. W., Grant D. S., Movafagh S. and Zukowska Z. (2003a) Impaired angiogenesis in neuropeptide Y (NPY)-Y2 receptor knockout mice. *Peptides* **24**, 99-106.
- Lee E. W., Michalkiewicz M., Kitlinska J., Kalezic I., Switalska H., Yoo P., Sangkharat A., Ji H., Li L., Michalkiewicz T., Ljubisavljevic M., Johansson H., Grant D. S. and Zukowska Z. (2003b) Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. *J Clin Invest* **111**, 1853-1862.
- Leist M. and Jaattela M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589-598.
- Lemos V. S. and Takeda K. (1995) Neuropeptide Y2-type receptor-mediated activation of large-conductance Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channels in a human neuroblastoma cell line. *Pflugers Arch* **430**, 534-540.
- Leonardi E. T. and Azmitia E. C. (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* **10**, 231-238.
- Lewis T. S., Shapiro P. S. and Ahn N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**, 49-139.
- Li C., Ruan L., Sood S. G., Papapetropoulos A., Fulton D. and Venema R. C. (2007) Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol* **47**, 257-264.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. and Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Liechti M. E. and Vollenweider F. X. (2000) The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') in healthy volunteers. *J Psychopharmacol* **14**, 269-274.
- Lima L., Schmeer C. and Urbina M. (1994) 8-[3H]hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin binding sites in goldfish retina. *Neurochem Res* **19**, 249-255.
- Lincoln T. M., Dey N. and Sellak H. (2001) Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* **91**, 1421-1430.
- Lindstrom L. M. and Ekblad E. (2002) Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Auton Neurosci* **97**, 73-82.
- Liu S. X., Chiou G. C. and Varma R. S. (1995) Improvement of retinal functions after ischemia with L-arginine and its derivatives. *J Ocul Pharmacol Ther* **11**, 261-265.
- Liu X., Zou H., Widlak P., Garrard W. and Wang X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* **274**, 13836-13840.
- Liu X., Li P., Widlak P., Zou H., Luo X., Garrard W. T. and Wang X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8461-8466.
- Lombardi G., Moroni F. and Moroni F. (1994) Glutamate receptor antagonists protect against ischemia-induced retinal damage. *Eur J Pharmacol* **271**, 489-495.

- Lopez-Costa J. J., Goldstein J. and Saavedra J. P. (1997) Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina. *Neurosci Lett* **232**, 155-158.
- Lopez-Illasaca M. (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* **56**, 269-277.
- Lucas K. A., Pitari G. M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K. P. and Waldman S. A. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**, 375-414.
- Luczak K., Balcerzyk A., Soszynski M. and Bartosz G. (2004) Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biol Int* **28**, 483-486.
- Lundell I., Blomqvist A. G., Berglund M. M., Schober D. A., Johnson D., Statnick M. A., Gadski R. A., Gehlert D. R. and Larhammar D. (1995) Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J Biol Chem* **270**, 29123-29128.
- Luo X., Baba A., Matsuda T. and Romano C. (2004) Susceptibilities to and mechanisms of excitotoxic cell death of adult mouse inner retinal neurons in dissociated culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4576-4582.
- Macarthur H., Westfall T. C. and Wilken G. H. (2008) Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H183-189.
- MacLaren R. E., Pearson R. A., MacNeil A., Douglas R. H., Salt T. E., Akimoto M., Swaroop A., Sowden J. C. and Ali R. R. (2006) Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* **444**, 203-207.
- Maeda Y., Ikeda U., Oya K., Shimpo M., Ueno S., Okada K., Saito T., Mano H., Ozawa K. and Shimada K. (2000) Endogenously generated nitric oxide by nitric-oxide synthase gene transfer inhibits cellular proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 387-393.
- Magalhaes C. R., Socodato R. E. and Paes-de-Carvalho R. (2006) Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int J Dev Neurosci* **24**, 53-60.
- Malberg J. E. and Seiden L. S. (1998) Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* **18**, 5086-5094.
- Malberg J. E., Sabol K. E. and Seiden L. S. (1996) Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 258-267.
- Mansour S. J., Matten W. T., Hermann A. S., Candia J. M., Rong S., Fukasawa K., Vande Woude G. F. and Ahn N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**, 966-970.
- Marion-Audibert A. M., Nejjarri M., Pouretyron C., Anderson W., Gouysson G., Jacquier M. F., Dumortier J. and Scoazec J. Y. (2000) [Effects of endocrine peptides on proliferation, migration and differentiation of human endothelial cells]. *Gastroenterol Clin Biol* **24**, 644-648.
- Marksteiner J., Sperk G. and Maas D. (1989) Differential increases in brain levels of neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide after kainic acid-induced seizures in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **339**, 173-177.
- Marksteiner J., Prommegger R. and Sperk G. (1990a) Effect of anticonvulsant treatment on kainic acid-induced increases in peptide levels. *Eur J Pharmacol* **181**, 241-246.
- Marksteiner J., Ortler M., Bellmann R. and Sperk G. (1990b) Neuropeptide Y biosynthesis is markedly induced in mossy fibers during temporal lobe epilepsy of the rat. *Neurosci Lett* **112**, 143-148.
- Marksteiner J., Lassmann H., Saria A., Humpel C., Meyer D. K. and Sperk G. (1990c) Neuropeptide Levels after Pentylentetrazol Kindling in the Rat. *Eur J Neurosci* **2**, 98-103.
- Marshak D. W. (1989) Peptidergic neurons of the macaque monkey retina. *Neurosci Res Suppl* **10**, S117-130.
- Martin S. E. and Patterson R. E. (1989) Coronary constriction due to neuropeptide Y: alleviation with cyclooxygenase blockers. *Am J Physiol* **257**, H927-934.
- Martins R. A. and Pearson R. A. (2007) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res*.
- Martire M., Pistrutto G., Mores N., Agnati L. F. and Fuxe K. (1995) Presynaptic A2-adrenoceptors and neuropeptide Y Y2 receptors inhibit [3H]noradrenaline release from rat hypothalamic synaptosomes via different mechanisms. *Neurosci Lett* **188**, 9-12.

- Masatoshi Tomi T. F., Hayato Abukawa, Kazunori Katayama, Tetsu Kondo, Sumio Ohtsuki, Masatsugu Ueda, Masuo Obinata, Tetsuya Terasaki, Ken-Ichi Hosoya (2003) Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc-, in the newly developed rat retinal Muller cell line (TR-MUL). *Glia* **43**, 208-217.
- Matarredona E. R., Murillo-Carretero M., Moreno-Lopez B. and Estrada C. (2005) Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 355-366.
- Mathern G. W., Babb T. L., Pretorius J. K. and Leite J. P. (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci* **15**, 3990-4004.
- Matsumoto M., Nomura T., Momose K., Ikeda Y., Kondou Y., Akiho H., Togami J., Kimura Y., Okada M. and Yamaguchi T. (1996) Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem* **271**, 27217-27220.
- Mayer E. J., Hughes E. H., Carter D. A. and Dick A. D. (2003) Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* **87**, 1154-1158.
- Mayer E. J., Carter D. A., Ren Y., Hughes E. H., Rice C. M., Halfpenny C. A., Scolding N. J. and Dick A. D. (2005) Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* **89**, 102-106.
- McCann U. D., Slate S. O. and Ricaurte G. A. (1996) Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'ecstasy'). *Drug Saf* **15**, 107-115.
- McCann U. D., Szabo Z., Scheffel U., Dannals R. F. and Ricaurte G. A. (1998) Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* **352**, 1433-1437.
- McCann U. D., Szabo Z., Seckin E., Rosenblatt P., Mathews W. B., Ravert H. T., Dannals R. F. and Ricaurte G. A. (2005) Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [<sup>11</sup>C]McN5652 and [<sup>11</sup>C]DASB. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1741-1750.
- McElhatton P. R., Bateman D. N., Evans C., Pughe K. R. and Thomas S. H. (1999) Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet* **354**, 1441-1442.
- McGillen G. S. and Dacheux R. F. (1998) Migration of retinal microglia in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* **67**, 371-375.
- McNamara M. G., Kelly J. P. and Leonard B. E. (1995) Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 479-484.
- Medeiros M. D. and Turner A. J. (1994) Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology* **134**, 2088-2094.
- Medeiros Mdos S. and Turner A. J. (1996) Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem Res* **21**, 1125-1132.
- Meini A., Garcia J. B., Pessina G. P., Aldinucci C., Frosini M. and Palmi M. (2006) Role of intracellular Ca<sup>2+</sup> and calmodulin/MAP kinase/extracellular signal-regulated protein kinase signalling pathway in the mitogenic and antimitogenic effect of nitric oxide in glia- and neurone-derived cell lines. *Eur J Neurosci* **23**, 1690-1700.
- Mejia-Garcia T. A. and Paes-de-Carvalho R. (2007) Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *J Neurochem* **100**, 382-394.
- Meldrum B. and Garthwaite J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 379-387.
- Meleth A. D., Agron E., Chan C. C., Reed G. F., Arora K., Byrnes G., Csaky K. G., Ferris F. L., 3rd and Chew E. Y. (2005) Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4295-4301.
- Meyer J. S., Grande M., Johnson K. and Ali S. F. (2004) Neurotoxic effects of MDMA ("ecstasy") administration to neonatal rats. *Int J Dev Neurosci* **22**, 261-271.
- Michael J. C., Pak J., Pulido J. and de Venecia G. (2003) Central serous chorioretinopathy associated with administration of sympathomimetic agents. *Am J Ophthalmol* **136**, 182-185.
- Michel M. C. (1991) Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 389-394.
- Michel M. C. and Rascher W. (1995) Neuropeptide Y: a possible role in hypertension? *J Hypertens* **13**, 385-395.
- Michel M. C., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods H. N., Herzog H., Larhammar D., Quirion R., Schwartz T. and Westfall T. (1998) XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 143-150.

- Milenkovic I., Weick M., Wiedemann P., Reichenbach A. and Bringmann A. (2004) Neuropeptide Y-evoked proliferation of retinal glial (Muller) cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**, 944-950.
- Milhazes N., Cunha-Oliveira T., Martins P., Garrido J., Oliveira C., Rego A. C. and Borges F. (2006) Synthesis and cytotoxic profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its metabolites on undifferentiated PC12 cells: a putative structure-toxicity relationship. *Chem Res Toxicol* **19**, 1294-1304.
- Millar B. C., Weis T., Piper H. M., Weber M., Borchard U., McDermott B. J. and Balasubramaniam A. (1991) Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* **261**, H1727-1733.
- Miller D. B. and O'Callaghan J. P. (1995) The role of temperature, stress, and other factors in the neurotoxicity of the substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine and fenfluramine. *Mol Neurobiol* **11**, 177-192.
- Miller R. T., Lau S. S. and Monks T. J. (1996) Effects of intracerebroventricular administration of 5-(glutathion-S-yl)-alpha-methyl-dopamine on brain dopamine, serotonin, and norepinephrine concentrations in male Sprague-Dawley rats. *Chem Res Toxicol* **9**, 457-465.
- Miller R. T., Lau S. S. and Monks T. J. (1997) 2,5-Bis-(glutathion-S-yl)-alpha-methyl-dopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine, decreases brain serotonin concentrations. *Eur J Pharmacol* **323**, 173-180.
- Minth C. D., Bloom S. R., Polak J. M. and Dixon J. E. (1984) Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4577-4581.
- Miranda M., Bosch-Morell F., Johnsen-Soriano S., Barcia J., Almansa I., Asensio S., Araiz J., Messeguer A. and Romero F. J. (2007) Oxidative Stress in Rat Retina and Hippocampus after Chronic MDMA ('ecstasy') Administration. *Neurochem Res* **32**, 1156-1162.
- Misra S., Murthy K. S., Zhou H. and Grider J. R. (2004) Coexpression of Y1, Y2, and Y4 receptors in smooth muscle coupled to distinct signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 1154-1162.
- Mitsutomi N., Akashi C., Odagiri J. and Matsumura Y. (1999) Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* **364**, 65-73.
- Miyachi E., Hidaka S. and Murakami M. (1999) Electrical couplings of retinal neurons. 171-184.
- Molliver M. E., Berger U. V., Mamounas L. A., Molliver D. C., O'Hearn E. and Wilson M. A. (1990) Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci* **600**, 649-661; discussion 661-644.
- Monks T. J. and Lau S. S. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol* **10**, 1296-1313.
- Monnin J., Morand-Villeneuve N., Michel G., Hicks D., Versaux-Botteri C. (2007) Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. *Neurosci Lett* **421** 22-6.
- Montet J. C., Caroli-Bosc F. X., Ferrari P., Piche T., Baize N., Anty R., Montet A. M., Rampal P. and Tran A. (2005) Gallbladder motility and gut hormone plasma levels in subjects with and without gallstones. *Gastroenterol Clin Biol* **29**, 569-572.
- Montiel-Duarte C., Varela-Rey M., Osés-Prieto J. A., Lopez-Zabalza M. J., Beitia G., Cenarruzabeitia E. and Iraburu M. J. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1588**, 26-32.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Motulsky H. J. and Michel M. C. (1988) Neuropeptide Y mobilizes Ca<sup>2+</sup> and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am J Physiol* **255**, E880-885.
- Mourey R. J., Vega Q. C., Campbell J. S., Wenderoth M. P., Hauschka S. D., Krebs E. G. and Dixon J. E. (1996) A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. *J Biol Chem* **271**, 3795-3802.
- Movafagh S., Hobson J. P., Spiegel S., Kleinman H. K. and Zukowska Z. (2006) Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. *Faseb J* **20**, 1924-1926.
- Mullins D. E., Zhang X. and Hawes B. E. (2002) Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y1, Y2, Y4 and Y5 receptor subtypes. *Regul Pept* **105**, 65-73.
- Nathan C. (1994) Nitric oxide and biopterin: a study in Chiaroscuro. *J Clin Invest* **93**, 1875-1876.

- Nathans J. (1989) The genes for color vision. *Sci Am* **260**, 42-49.
- Naveilhan P., Hassani H., Canals J. M., Ekstrand A. J., Larefalk A., Chhajlani V., Arenas E., Gedda K., Svensson L., Thoren P. and Ernfors P. (1999) Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. *Nat Med* **5**, 1188-1193.
- Neal M. J., Cunningham J. R. and Matthews K. L. (2001) Activation of nicotinic receptors on GABAergic amacrine cells in the rabbit retina indirectly stimulates dopamine release. *Vis Neurosci* **18**, 55-64.
- Niskanen L., Voutilainen-Kaunisto R., Terasvirta M., Karvonen M. K., Valve R., Pesonen U., Laakso M., Uusitupa M. I. and Koulu M. (2000) Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the neuropeptide y gene is associated with retinopathy in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**, 235-236.
- Norenberg W., Bek M., Limberger N., Takeda K. and Illes P. (1995) Inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells by Y3-type neuropeptide Y receptors via the adenylate cyclase/protein kinase A system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **351**, 337-347.
- Nunokawa Y. and Tanaka S. (1992) Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 409-415.
- Nunokawa Y., Ishida N. and Tanaka S. (1993) Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **191**, 89-94.
- O'Cain P. A., Hletko S. B., Ogden B. A. and Varner K. J. (2000) Cardiovascular and sympathetic responses and reflex changes elicited by MDMA. *Physiol Behav* **70**, 141-148.
- O'Callaghan J. P. and Miller D. B. (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 741-751.
- O'Hearn E., Battaglia G., De Souza E. B., Kuhar M. J. and Molliver M. E. (1988) Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci* **8**, 2788-2803.
- O'Shea E., Escobedo I., Orio L., Sanchez V., Navarro M., Green A. R. and Colado M. I. (2005) Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1312-1323.
- O'Shea E., Orio L., Escobedo I., Sanchez V., Camarero J., Green A. R. and Colado M. I. (2006) MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br J Pharmacol* **148**, 778-785.
- Oberto A., Mele P., Zammaretti F., Panzica G. and Eva C. (2003) Evidence of altered neuropeptide Y content and neuropeptide Y1 receptor gene expression in the hypothalamus of pregnant transgenic mice. *Endocrinology* **144**, 4826-4830.
- Oh S. J., D'Angelo I., Lee E. J., Chun M. H. and Brecha N. C. (2002) Distribution and synaptic connectivity of neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the rat retina. *J Comp Neurol* **446**, 219-234.
- Olasmaa M. and Terenius L. (1986) Neuropeptide Y receptor interaction with beta-adrenoceptor coupling to adenylate cyclase. *Prog Brain Res* **68**, 337-341.
- Olney J. W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney J. W., Price M. T., Samson L. and Labruyere J. (1986) The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett* **65**, 65-71.
- Olsen M. K., Reszka A. A. and Abraham I. (1998) KT5720 and U-98017 inhibit MAPK and alter the cytoskeleton and cell morphology. *J Cell Physiol* **176**, 525-536.
- Orio L., O'Shea E., Sanchez V., Pradillo J. M., Escobedo I., Camarero J., Moro M. A., Green A. R. and Colado M. I. (2004) 3,4-Methylenedioxyamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem* **89**, 1445-1453.
- Ortrud Uckermann A. W. F. K. F. K. A. G. B.-S. P. W. A. R. A. B. (2006) Glutamate release by neurons evokes a purinergic inhibitory mechanism of osmotic glial cell swelling in the rat retina: Activation by neuropeptide Y. *J Neurosci Res* **83**, 538-550.
- Osborne N. N. and Herrera A. J. (1994) The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience* **59**, 1071-1081.
- Osborne N. N., Wood J. and Muller A. (1995) The influence of experimental ischaemia on protein kinase C and the GABAergic system in the rabbit retina. *Neuropharmacology* **34**, 1279-1288.

- Osborne N. N., Schwarz M. and Pergande G. (1996) Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 274-280.
- Osborne N. N., Pergande G., Block F. and Schwarz M. (1994) Immunohistochemical evidence for flupirtine acting as an antagonist on the N-methyl-D-aspartate and homocysteic acid-induced release of GABA in the rabbit retina. *Brain Res* **667**, 291-294.
- Osinski M. T., Rauch B. H. and Schror K. (2001) Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol* **59**, 1044-1050.
- Overton M. C. and Blumer K. J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr Biol* **10**, 341-344.
- Oyster C. W. (1999) The Human Eye-Structure and function. *Sinauer Associates, Sunderland, MA* chapter 13.
- Ozawa S., Kamiya H. and Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **54**, 581-618.
- Packer M. A., Stasiv Y., Benraiss A., Chmielnicki E., Grinberg A., Westphal H., Goldman S. A. and Enikolopov G. (2003) Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9566-9571.
- Papadopoulos G. C., Parnavelas J. G. and Cavanagh M. E. (1987) Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res* **420**, 95-99.
- Parenti A., Morbidelli L., Cui X. L., Douglas J. G., Hood J. D., Granger H. J., Ledda F. and Ziche M. (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* **273**, 4220-4226.
- Paris J. M. and Cunningham K. A. (1992) Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res Bull* **28**, 115-119.
- Parrott A. C. (2005) Chronic tolerance to recreational MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) or Ecstasy. *J Psychopharmacol* **19**, 71-83.
- Partilla J. S., Dempsey A. G., Nagpal A. S., Blough B. E., Baumann M. H. and Rothman R. B. (2006) Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 237-246.
- Passie T., Schneider U. and Emrich H. M. (2002) Persisting continuous visual perception disorder in a chronic MDMA ('ecstasy') user. *Aust N Z J Psychiatry* **36**, 266-267.
- Pellegrini G., Golisano O., Paterna P., Lambiase A., Bonini S., Rama P. and De Luca M. (1999) Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* **145**, 769-782.
- Pelto-Huikko M. (1989) Immunocytochemical localization of neuropeptides in the adrenal medulla. *J Electron Microscop Tech* **12**, 364-379.
- Perez-Leon J. A., Sarabia G., Miledi R. and Garcia-Alcocer G. (2004) Distribution of 5-hydroxytryptamine2C receptor mRNA in rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* **125**, 140-142.
- Perney T. M. and Miller R. J. (1989) Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J Biol Chem* **264**, 7317-7327.
- Perron M. and Harris W. A. (2000) Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* **22**, 685-688.
- Piehl L., Capani F., Facorro G., Lopez E. M., de Celis E. R., Pustovrh C., Hager A., Coirini H. and Lopez-Costa J. J. (2007) Nitric oxide increases in the rat retina after continuous illumination. *Brain Res* **1156**, 112-119.
- Pirone A., Lenzi C., Marroni P., Betti L., Mascia G., Giannaccini G., Lucacchini A., Fabiani O. (2008) Neuropeptide Y in the Brain and Retina of the Adult Teleost Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Anat Histol Embryol* **In press**.
- Ponery A. S. and Adeghate E. (2000) Distribution of NPY and SP and their effects on glucagon secretion from the in vitro normal and diabetic pancreatic tissues. *Peptides* **21**, 1503-1509.
- Pootanakit K. and Brunken W. J. (2000) 5-HT(1A) and 5-HT(7) receptor expression in the mammalian retina. *Brain Res* **875**, 152-156.
- Pootanakit K. and Brunken W. J. (2001) Identification of 5-HT(3A) and 5-HT(3B) receptor subunits in mammalian retinae: potential pre-synaptic modulators of photoreceptors. *Brain Res* **896**, 77-85.
- Pootanakit K., Prior K. J., Hunter D. D. and Brunken W. J. (1999) 5-HT2a receptors in the rabbit retina: potential presynaptic modulators. *Vis Neurosci* **16**, 221-230.
- Potter E. (1987) Presynaptic inhibition of cardiac vagal postganglionic nerves by neuropeptide Y. *Neurosci Lett* **83**, 101-106.

- Pozzo Miller L. D., Mahanty N. K., Connor J. A. and Landis D. M. (1994) Spontaneous pyramidal cell death in organotypic slice cultures from rat hippocampus is prevented by glutamate receptor antagonists. *Neuroscience* **63**, 471-487.
- Prast H. and Philippu A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**, 51-68.
- Pringle A. K., Iannotti F., Wilde G. J., Chad J. E., Seeley P. J. and Sundstrom L. E. (1997) Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. *Brain Res* **755**, 36-46.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A., McNamara J. O. and Williams M. (2004) Neuroscience. *Sinauer Associates, Inc. Publishers. Third Edition*.
- Quednow B. B., Jessen F., Kuhn K. U., Maier W., Daum I. and Wagner M. (2006) Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J Psychopharmacol* **20**, 373-384.
- Quinton M. S. and Yamamoto B. K. (2006) Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. *Aaps J* **8**, E337-347.
- Rahn C. A., Bombick D. W. and Doolittle D. J. (1991) Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. *Fundam Appl Toxicol* **16**, 435-448.
- Rameau G. A., Tukey D. S., Garcin-Hosfield E. D., Titcombe R. F., Misra C., Khatri L., Getzoff E. D. and Ziff E. B. (2007) Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* **27**, 3445-3455.
- Redrobe J. P., Dumont Y., Fournier A. and Quirion R. (2002) The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* **26**, 615-624.
- Reh T. A. and Fischer A. J. (2001) Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav Evol* **58**, 296-305.
- Reis R. A., Ventura A. L., Kubrusly R. C., de Mello M. C. and de Mello F. G. (2007) Dopaminergic signaling in the developing retina. *Brain Res Rev* **54**.
- Reneman L., Endert E., de Bruin K., Lavalaye J., Feenstra M. G., de Wolff F. A. and Booij J. (2002) The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* **26**, 387-396.
- Rettenbacher M. and Reubi J. C. (2001) Localization and characterization of neuropeptide receptors in human colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **364**, 291-304.
- Rettori V., Milenkovic L., Aguila M. C. and McCann S. M. (1990a) Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge. *Endocrinology* **126**, 2296-2301.
- Rettori V., Milenkovic L., Riedel M. and McCann S. M. (1990b) Physiological role of neuropeptide Y (NPY) in control of anterior pituitary hormone release in the rat. *Endocrinol Exp* **24**, 37-45.
- Reubi J. C., Gugger M., Waser B. and Schaer J. C. (2001) Y(1)-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets. *Cancer Res* **61**, 4636-4641.
- Ricaurte G., Bryan G., Strauss L., Seiden L. and Schuster C. (1985) Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science* **229**, 986-988.
- Ricaurte G. A., Yuan J. and McCann U. D. (2000) (+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology* **42**, 5-10.
- Ricaurte G. A., Martello A. L., Katz J. L. and Martello M. B. (1992) Lasting effects of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: neurochemical observations. *J Pharmacol Exp Ther* **261**, 616-622.
- Ricaurte G. A., DeLanney L. E., Wiener S. G., Irwin I. and Langston J. W. (1988a) 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res* **474**, 359-363.
- Ricaurte G. A., Forno L. S., Wilson M. A., DeLanney L. E., Irwin I., Molliver M. E. and Langston J. W. (1988b) (+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *Jama* **260**, 51-55.
- Robinson M. J., Stippec S. A., Goldsmith E., White M. A. and Cobb M. H. (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* **8**, 1141-1150.
- Rodi D., Mazzuferi M., Bregola G., Dumont Y., Fournier A., Quirion R. and Simonato M. (2003) Changes in NPY-mediated modulation of hippocampal [3H]D-aspartate outflow in the kindling model of epilepsy. *Synapse* **49**, 116-124.

- Rose P. M., Fernandes P., Lynch J. S., Frazier S. T., Fisher S. M., Kodukula K., Kienzle B. and Seethala R. (1995) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* **270**, 29038.
- Rosen L. B., Ginty D. D., Weber M. J. and Greenberg M. E. (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**, 1207-1221.
- Rosmaninho-Salgado J., Araújo I., Álvaro A. R., Duarte E. and Cavadas C. (2007) Intracellular signalling mechanisms mediating catecholamine release upon activation of NPY Y1 receptors in mouse chromaffin cells. *J Neurochem* **103**, 896-903.
- Roth J., Rummel C., Barth S. W., Gerstberger R. and Hubschle T. (2006) Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin* **24**, 421-439, v.
- Rungger-Brandle E., Dosso A. A. and Leuenberger P. M. (2000) Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 1971-1980.
- Rymaszewski Z., Szymanski P. T., Abplanalp W. A., Myatt L., Di Salvo J. and Cohen R. M. (1992) Human retinal vascular cells differ from umbilical cells in synthetic functions and their response to glucose. *Proc Soc Exp Biol Med* **199**, 183-191.
- Saadat K. S., Elliott J. M., Colado M. I. and Green A. R. (2004) Hyperthermic and neurotoxic effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in guinea pigs. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 452-453.
- Sadzot B., Baraban J. M., Glennon R. A., Lyon R. A., Leonhardt S., Jan C. R. and Titeler M. (1989) Hallucinogenic drug interactions at human brain 5-HT<sub>2</sub> receptors: implications for treating LSD-induced hallucinogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* **98**, 495-499.
- Sainsbury A., Schwarzer C., Couzens M., Fetissov S., Furlinger S., Jenkins A., Cox H. M., Sperk G., Hokfelt T. and Herzog H. (2002) Important role of hypothalamic Y2 receptors in body weight regulation revealed in conditional knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8938-8943.
- Sajdyk T. J., Vandergriff M. G. and Gehlert D. R. (1999) Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. *Eur J Pharmacol* **368**, 143-147.
- Salgado J. M. R. (2007) Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina 1-beta e do neuropeptídeo Y. *Universidade de Coimbra*, 33.
- Salum C., Guimaraes F. S., Brandao M. L. and Del Bel E. A. (2006) Dopamine and nitric oxide interaction on the modulation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the Wistar rat. *Psychopharmacology (Berl)* **185**, 133-141.
- Sanaï N., Tramontin A. D., Quinones-Hinojosa A., Barbaro N. M., Gupta N., Kunwar S., Lawton M. T., McDermott M. W., Parsa A. T., Manuel-Garcia Verdugo J., Berger M. S. and Alvarez-Buylla A. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-744.
- Sanchez V., Camarero J., Esteban B., Peter M. J., Green A. R. and Colado M. I. (2001) The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br J Pharmacol* **134**, 46-57.
- Sattler R. and Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* **78**, 3-13.
- Schmidt C. J. (1987) Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* **240**, 1-7.
- Schmidt C. J. and Taylor V. L. (1987) Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem Pharmacol* **36**, 4095-4102.
- Schmidt C. J., Wu L. and Lovenberg W. (1986) Methylenedioxymethamphetamine: a potentially neurotoxic amphetamine analogue. *Eur J Pharmacol* **124**, 175-178.
- Schmidt C. J., Levin J. A. and Lovenberg W. (1987) In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol* **36**, 747-755.
- Schmidt C. J., Black C. K. and Taylor V. L. (1990) Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol* **181**, 59-70.
- Schmued L. C. (2003) Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res* **974**, 127-133.

- Schwartz T. W., Fuhlendorff J., Kjems L. L., Kristensen M. S., Vervelde M., O'Hare M., Krstenansky J. L. and Bjornholm B. (1990) Signal epitopes in the three-dimensional structure of neuropeptide Y. Interaction with Y1, Y2, and pancreatic polypeptide receptors. *Ann N Y Acad Sci* **611**, 35-47.
- Schwartzberg M., Unger J., Weindl A. and Lange W. (1990) Distribution of neuropeptide Y in the prosencephalon of man and cotton-head tamarin (*Saguinus oedipus*): colocalization with somatostatin in neurons of striatum and amygdala. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 157-166.
- Schwertfeger E., Klein T., Vonend O., Oberhauser V., Stegbauer J. and Rump L. C. (2004) Neuropeptide Y inhibits acetylcholine release in human heart atrium by activation of Y2-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 455-461.
- Segovia G. and Mora F. (1998) Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull* **45**, 275-279.
- Seifert P., Stuppi S., Spitznas M. and Weihe E. (1996) Differential distribution of neuronal markers and neuropeptides in the human lacrimal gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **234**, 232-240.
- Shankaran M. and Gudelsky G. A. (1999) A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology (Berl)* **147**, 66-72.
- Sharma R. V., Tan E., Fang S., Gurjar M. V. and Bhalla R. C. (1999) NOS gene transfer inhibits expression of cell cycle regulatory molecules in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **276**, H1450-1459.
- Sherr C. J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Shulgin A. and Nichols D. (1978) Characterization of three new psychotomimetics. *The Pharmacology of hallucinogens (Stillman RC and Willette RE Eds) Pergamon Press, Oxford*.
- Silva A. P., Cavadas C. and Grouzmann E. (2002) Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta* **326**, 3-25.
- Silva A. P., Carvalho A. P., Carvalho C. M. and Malva J. O. (2001) Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus. *J Neurochem* **79**, 286-296.
- Silva A. P., Carvalho A. P., Carvalho C. M. and Malva J. O. (2003a) Functional interaction between neuropeptide Y receptors and modulation of calcium channels in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* **44**, 282-292.
- Silva A. P., Xapelli S., Grouzmann E. and Cavadas C. (2005a) The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 331-347.
- Silva A. P., Cavadas C., Baisse-Agushi B., Spertini O., Brunner H. R. and Grouzmann E. (2003b) NPY, NPY receptors, and DPP IV activity are modulated by LPS, TNF-alpha and IFN-gamma in HUVEC. *Regul Pept* **116**, 71-79.
- Silva A. P., Pinheiro P. S., Carvalho A. P., Carvalho C. M., Jakobsen B., Zimmer J. and Malva J. O. (2003c) Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB J* **17**, 1118-1120.
- Silva A. P., Lourenco J., Xapelli S., Ferreira R., Kristiansen H., Woldbye D. P., Oliveira C. R. and Malva J. O. (2007) Protein kinase C activity blocks neuropeptide Y-mediated inhibition of glutamate release and contributes to excitability of the hippocampus in status epilepticus. *Faseb J* **21**, 671-681.
- Silva A. P., Kaufmann J. E., Vivancos C., Fakan S., Cavadas C., Shaw P., Brunner H. R., Vischer U. and Grouzmann E. (2005b) Neuropeptide Y expression, localization and cellular transducing effects in HUVEC. *Biol Cell* **97**, 457-467.
- Silva A. P., Xapelli S., Pinheiro P. S., Ferreira R., Lourenco J., Cristovao A., Grouzmann E., Cavadas C., Oliveira C. R. and Malva J. O. (2005c) Up-regulation of neuropeptide Y levels and modulation of glutamate release through neuropeptide Y receptors in the hippocampus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurochem* **93**, 163-170.
- Simantov R. and Tauber M. (1997) The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *Faseb J* **11**, 141-146.
- Sinclair J. R. and Nirenberg S. (2001) Characterization of neuropeptide Y-expressing cells in the mouse retina using immunohistochemical and transgenic techniques. *J Comp Neurol* **432**, 296-306.
- Sinclair J. R., Jacobs A. L. and Nirenberg S. (2004) Selective ablation of a class of amacrine cells alters spatial processing in the retina. *J Neurosci* **24**, 1459-1467.
- Smith Y. and Parent A. (1986) Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res* **372**, 241-252.

- Soler M. V., Gallo J. E., Dodds R. A., Hokfelt T., Villar M. J. and Suburo A. M. (2002) Y1 receptor of neuropeptide Y as a glial marker in proliferative vitreoretinopathy and diseased human retina. *Glia* **39**, 320-324.
- Southam E. and Garthwaite J. (1993) The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* **32**, 1267-1277.
- Spence J. R., Madhavan M., Aycinena J. C. and Del Rio-Tsonis K. (2007) Retina regeneration in the chick embryo is not induced by spontaneous Mitf downregulation but requires FGF/FGFR/MEK/Erk dependent upregulation of Pax6. *Mol Vis* **13**, 57-65.
- St-Pierre J. A., Nouel D., Dumont Y., Beaudet A. and Quirion R. (2000) Sub-population of cultured hippocampal astrocytes expresses neuropeptide Y Y(1) receptors. *Glia* **30**, 82-91.
- Stamler J. S., Lamas S. and Fang F. C. (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.
- Statnick M. A., Schober D. A., Gackenhaimer S., Johnson D., Beavers L., Mayne N. G., Burnett J. P., Gadski R. and Gehlert D. R. (1998) Characterization of the neuropeptide Y5 receptor in the human hypothalamus: a lack of correlation between Y5 mRNA levels and binding sites. *Brain Res* **810**, 16-26.
- Stein C. S., Fabry Z., Murphy S. and Hart M. N. (1995) Involvement of nitric oxide in IFN-gamma-mediated reduction of microvessel smooth muscle cell proliferation. *Mol Immunol* **32**, 965-973.
- Stone D. M., Hanson G. R. and Gibb J. W. (1987) Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* **26**, 1657-1661.
- Stone D. M., Stahl D. C., Hanson G. R. and Gibb J. W. (1986) The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur J Pharmacol* **128**, 41-48.
- Straub V. A., Grant J., O'Shea M. and Benjamin P. R. (2007) Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. *J Neurophysiol* **97**, 1088-1099.
- Straznicky C. and Hiscock J. (1989) Neuropeptide Y-like immunoreactivity in neurons of the human retina. *Vision Res* **29**, 1041-1048.
- Straznicky K. and Gaze R. M. (1971) The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J Embryol Exp Morphol* **26**, 67-79.
- Stuehr D. J., Cho H. J., Kwon N. S., Weise M. F. and Nathan C. F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7773-7777.
- Stumm G., Schlegel J., Schafer T., Wurz C., Mennel H. D., Krieg J. C. and Vedder H. (1999) Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *Faseb J* **13**, 1065-1072.
- Suhasini M., Li H., Lohmann S. M., Boss G. R. and Pilz R. B. (1998) Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 6983-6994.
- Sun H., Charles C. H., Lau L. F. and Tonks N. K. (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**, 487-493.
- Sun L. and Miller R. J. (1999) Multiple Neuropeptide Y Receptors Regulate K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Channels in Acutely Isolated Neurons From the Rat Arcuate Nucleus. *J Neurophysiol* **81**, 1391-1403.
- Sun Q.-Q., Huguenard J. R. and Prince D. A. (2001) Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels and high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat thalamic neurons. *J Physiol (Lond)* **531**, 67-79.
- Taffe M. A., Lay C. C., Von Huben S. N., Davis S. A., Crean R. D. and Katner S. N. (2006) Hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in unrestrained rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* **82**, 276-281.
- Tamburini I., Blandini F., Gesi M., Frenzilli G., Nigro M., Giusiani M., Paparelli A. and Fornai F. (2006) MDMA induces caspase-3 activation in the limbic system but not in striatum. *Ann N Y Acad Sci* **1074**, 377-381.
- Tao J., Tu Y. T., Li J. W., Feng A. P., Huang C. Z., Wu Y. and Shen G. X. (2006) Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell. *Clin Exp Dermatol* **31**, 94-99.
- Tatemoto K. (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5485-5489.
- Temple S. (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-117.

- Temple S. (2005) Defining Neural Stem Cells and Their Role in Normal Development of the Nervous System in *Neural Development and Stem Cells*, edited by Mahendra S. Rao, 2 ed, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Thiele T. E., Koh M. T. and Pedrazzini T. (2002) Voluntary alcohol consumption is controlled via the neuropeptide Y Y1 receptor. *J Neurosci* **22**, RC208.
- Thiriet N., Deng X., Solinas M., Ladenheim B., Curtis W., Goldberg S. R., Palmiter R. D. and Cadet J. L. (2005) Neuropeptide Y protects against methamphetamine-induced neuronal apoptosis in the mouse striatum. *J Neurosci* **25**, 5273-5279.
- Thomas D. M., Dowgiert J., Geddes T. J., Francescutti-Verbeem D., Liu X. and Kuhn D. M. (2004) Microglial activation is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neurosci Lett* **367**, 349-354.
- Tiangco D. A., Lattanzio F. A., Jr., Osgood C. J., Beebe S. J., Kerry J. A. and Hargrave B. Y. (2005) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine activates nuclear factor-kappaB, increases intracellular calcium, and modulates gene transcription in rat heart cells. *Cardiovasc Toxicol* **5**, 301-310.
- Toda N. and Nakanishi-Toda M. (2007) Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* **26**, 205-238.
- Tornqvist K. and Ehinger B. (1988) Peptide immunoreactive neurons in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**, 680-686.
- Troger J., Sellemond S., Kieselbach G., Kralinger M., Schmid E., Teuchner B., Nguyen Q. A., Schretter-Irschick E. and Gottinger W. (2003) Inhibitory effect of certain neuropeptides on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol* **87**, 1403-1408.
- Tropepe V., Coles B. L., Chiasson B. J., Horsford D. J., Elia A. J., McInnes R. R. and van der Kooy D. (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287**, 2032-2036.
- Tsuda K., Tsuda S., Goldstein M. and Masuyama Y. (1995) Sodium ions attenuate the inhibitory effects of neuropeptide Y on norepinephrine release in rat hypothalamus. *Am J Hypertens* **8**, 1135-1140.
- Turner D. L. and Cepko C. L. (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**, 131-136.
- Ulibarri J. A., Mozdziaik P. E., Schultz E., Cook C. and Best T. M. (1999) Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 215-218.
- Ullian E. M., Barkis W. B., Chen S., Diamond J. S. and Barres B. A. (2004) Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci* **26**, 544-557.
- Unger J. W. and Lange W. (1992) NADPH-diaphorase-positive cell populations in the human amygdala and temporal cortex: neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **83**, 636-646.
- Vanhoof G., Goossens F., Juliano M. A., Juliano L., Hendriks D., Schatteman K., Lin A. H. and Scharpe S. (1997) Isolation and sequence analysis of a human cDNA clone (XPNPEPL) homologous to X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P). *Cytogenet Cell Genet* **78**, 275-280.
- Vecino E., Hernandez M. and Garcia M. (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol* **48**, 965-974.
- Venema R. C., Ju H., Zou R., Venema V. J. and Ryan J. W. (1997) Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* **1354**, 45-48.
- Vetter M. L. and Moore K. B. (2001) Becoming glial in the neural retina. *Dev Dyn* **221**, 146-153.
- Vezzani A. and Sperk G. (2004) Overexpression of NPY and Y2 receptors in epileptic brain tissue: an endogenous neuroprotective mechanism in temporal lobe epilepsy? *Neuropeptides* **38**, 245-252.
- Vezzani A., Schwarzer C., Lothman E. W., Williamson J. and Sperk G. (1996) Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures. *Epilepsy Res* **26**, 267-279.
- Villalobo A. (2006) Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS Journal* **273**, 2329-2344.
- Vitale M., Zamai L., Mazzotti G., Cataldi A. and Falcieri E. (1993) Differential kinetics of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry* **100**, 223-229.
- Vollenweider F. X., Gamma A., Liechti M. and Huber T. (1998) Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naive healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* **19**, 241-251.

- Vuillet J., Kerkerian-Le Goff L., Kachidian P., Desticier G., Bosler O. and Nieoullon A. (1990) Striatal NPY-Containing Neurons Receive GABAergic Afferents and may also Contain GABA: An Electron Microscopic Study in the Rat. *Eur J Neurosci* **2**, 672-681.
- Wagers A. J. and Weissman I. L. (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639-648.
- Wahlestedt C., Regunathan S. and Reis D. J. (1992) Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci* **50**, PL7-12.
- Wahlestedt C., Pich E. M., Koob G. F., Yee F. and Heilig M. (1993) Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides. *Science* **259**, 528-531.
- Wallace V. A. (2007) Stem cells: a source for neuron repair in retinal disease. *Can J Ophthalmol* **42**, 442-446.
- Wang A. L., Yu A. C. H., Lau L. T., Lee C., Wu L. M., Zhu X. A. and Tso M. O. M. (2005) Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochem Int* **47**, 152-158.
- Wang S. J. (2005) Activation of neuropeptide Y Y1 receptors inhibits glutamate release through reduction of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> entry in the rat cerebral cortex nerve terminals: Suppression of this inhibitory effect by the protein kinase C-dependent facilitatory pathway. *Neuroscience* **134**, 987-1000.
- Wang X., Baumann M. H., Xu H. and Rothman R. B. (2004) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse* **53**, 240-248.
- Warren M. W., Zheng W., Kobeissy F. H., Cheng Liu M., Hayes R. L., Gold M. S., Larner S. F. and Wang K. K. (2006) Calpain- and caspase-mediated alphaII-spectrin and tau proteolysis in rat cerebrocortical neuronal cultures after ecstasy or methamphetamine exposure. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-11.
- Warren M. W., Larner S. F., Kobeissy F. H., Brezing C. A., Jeung J. A., Hayes R. L., Gold M. S. and Wang K. K. (2007) Calpain and caspase proteolytic markers co-localize with rat cortical neurons after exposure to methamphetamine and MDMA. *Acta Neuropathol (Berl)* **114**, 277-286.
- Weinberg D. H., Sirinathsinghji D. J., Tan C. P., Shiao L. L., Morin N., Rigby M. R., Heavens R. H., Rapoport D. R., Bayne M. L., Cascieri M. A., Strader C. D., Linemeyer D. L. and MacNeil D. J. (1996) Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* **271**, 16435-16438.
- Wettstein J. G., Earley B. and Junien J. L. (1995) Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol Ther* **65**, 397-414.
- Wiest R., Jurzik L., Moleda L., Froh M., Schnabl B., von Horsten S., Scholmerich J. and Straub R. H. (2006) Enhanced Y1-receptor-mediated vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension. *J Hepatol* **44**, 512-519.
- Woldbye D. P., Madsen T. M., Larsen P. J., Mikkelsen J. D. and Bolwig T. G. (1996) Neuropeptide Y inhibits hippocampal seizures and wet dog shakes. *Brain Res* **737**, 162-168.
- Wu J., Dent P., Jelinek T., Wolfman A., Weber M. J., Sturgill T. W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262**, 1065-9.
- Wu Y. F. and Li S. B. (2005) Neuropeptide Y expression in mouse hippocampus and its role in neuronal excitotoxicity. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 63-68.
- [www.ecstasy.org](http://www.ecstasy.org).
- [www.usdoj.gov/dea](http://www.usdoj.gov/dea).
- Wyllie A. H., Kerr J. F. and Currie A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
- Xapelli S., Silva A. P., Ferreira R. and Malva J. O. (2007) Neuropeptide Y can rescue neurons from cell death following the application of an excitotoxic insult with kainate in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Peptides* **28**, 288-294.
- Xie T., Tong L., McLane M. W., Hatzidimitriou G., Yuan J., McCann U. and Ricaurte G. (2006) Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2639-2651.
- Xin H., Yannazzo J. A., Duncan R. S., Gregg E. V., Singh M. and Koulen P. (2006) A novel organotypic culture model of the postnatal mouse retina allows the study of glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci Methods*.
- Xiong Z. and Cheung D. W. (1995) ATP-Dependent inhibition of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells by neuropeptide Y. *Pflugers Arch* **431**, 110-116.
- Xu H. and Tian N. (2004) Pathway-specific maturation, visual deprivation, and development of retinal pathway. *Neuroscientist* **10**, 337-346.

- Yamagishi S. and Imaizumi T. (2005) Pericyte biology and diseases. *Int J Tissue React* **27**, 125-135.
- Yamamoto B. K. and Spanos L. J. (1988) The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol* **148**, 195-203.
- Yamasaki E. N., Barbosa V. D., De Mello F. G. and Hokoc J. N. (1999) GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. *Int J Dev Neurosci* **17**, 201-213.
- Yang X.-L. (2004) Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* **73**, 127-150.
- Yaron A. and Mlynar D. (1968) Amino-peptidase-P. *Biochem Biophys Res Commun* **32**, 658-663.
- Yoon H. Z., Yan Y., Geng Y. and Higgins R. D. (2002) Neuropeptide Y expression in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* **30**, 424-429.
- Yu D. and Eldred W. D. (2005) Nitric oxide stimulates gamma-aminobutyric acid release and inhibits glycine release in retina. *J Comp Neurol* **483**, 278-291.
- Yu S. M., Hung L. M. and Lin C. C. (1997) cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* **95**, 1269-1277.
- Zhang J. and Yang X. L. (1999) GABA(B) receptors in Muller cells of the bullfrog retina. *Neuroreport* **10**, 1833-1836.
- Zhang R., Wang L., Zhang L., Chen J., Zhu Z., Zhang Z. and Chopp M. (2003) Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res* **92**, 308-313.
- Zhao C., Tao Z., Xiao J., Zhao S. and Qiao J. (1998) Histochemical and immunohistochemical studies of distribution of acetylcholinesterase-positive fibers and peptidergic terminals in the nasal mucosa of rats. *Chin Med J (Engl)* **111**, 644-647.
- Zheng C. F. and Guan K. L. (1993) Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem* **268**, 16116-16119.
- Zhou X., Li F., Kong L., Tomita H., Li C. and Cao W. (2005) Involvement of inflammation, degradation, and apoptosis in a mouse model of glaucoma. *J Biol Chem* **280**, 31240-31248.
- Zhou Z. and Neher E. (1993) Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **469**, 245-273.
- Zhu X. J., Hua Y., Jiang J., Zhou Q. G., Luo C. X., Han X., Lu Y. M. and Zhu D. Y. (2006) Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience* **141**, 827-836.
- Zhuo L., Theis M., Alvarez-Maya I., Brenner M., Willecke K. and Messing A. (2001) hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* **31**, 85-94.
- Zou H., Li Y., Liu X. and Wang X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-11556.
- Zukowska-Grojec Z., Karwowska-Prokopczuk E., Fisher T. A. and Ji H. (1998a) Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul Pept* **75-76**, 231-238.
- Zukowska-Grojec Z., Karwowska-Prokopczuk E., Rose W., Rone J., Movafagh S., Ji H., Yeh Y., Chen W. T., Kleinman H. K., Grouzmann E. and Grant D. S. (1998b) Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* **83**, 187-195.

