



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

BRUNO OLIVEIRA FERREIRA DE SOUZA

Efeito dual da suplementação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) sobre a retina de camundongos albinos (SWISS) submetidos à exposição à luz de média intensidade

RECIFE
2011



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

BRUNO OLIVEIRA FERREIRA DE SOUZA

Efeito dual da suplementação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) sobre a retina de camundongos albinos (SWISS) submetidos à exposição à luz de média intensidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

RECIFE
2011

BRUNO OLIVEIRA FERREIRA DE SOUZA

Efeito dual da suplementação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) sobre a retina de camundongos albinos (SWISS) submetidos à exposição à luz de média intensidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá.
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares.
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Primeiro examinador

Prof^a Dr^a Liriane Baratella Evêncio.
Universidade Federal de Pernambuco
Segundo Examinador

Prof^a Dr^a Camila Souza Porto.
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Terceiro Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fabrício Bezerra de Sá, meu orientador, amigo, compadre e pai científico, que sempre me fez ir mais além à busca do conhecimento e do aprimoramento e por ter dividido comigo seu tempo, sua sabedoria, sua casa.

Ao Professor George Jimenez e a Ferreira, por fornecerem a estrutura física e os animais, essenciais para a realização deste trabalho e pela inestimável contribuição em vários momentos.

Ao Professor Joaquim Evêncio Neto, pela grande colaboração e apoio durante a execução do projeto.

Ao Professor Marcos Correia, pelo suporte técnico-científico na fabricação das ferramentas necessárias para a realização deste estudo.

À Professora Belmira Costa, pelas valiosas contribuições teóricas e práticas durante a realização dos experimentos.

À Sra. Edna, secretária do PPGBCA/UFRPE pela paciência, amizade e disposição.

Aos amigos do Laboratório, Taciana, Mirella, Fabiana, Elton, Alexandre e Maína, pela ajuda e momentos de descontração, que se fizeram muitas vezes necessários durante estes dois anos de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Histologia do DMFA, pela troca de valiosas informações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE.

Ao Programa REUNI por conceder a bolsa de estudos.

À minha esposa, Luiza, pelo amor, dedicação e companheirismo em todas as horas.

À minha mãe, que sempre torceu para que tudo desse certo.

Aos meus tios Edmilson e Graça, pelas conversas agradáveis e sempre pertinentes.

Aos meus primos Edmilson Filho e Emanuela pela ajuda quando solicitada.

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

***“Se eu soubesse o que eu estava fazendo, não seria chamada
pesquisa.”***

(Albert Einstein)

RESUMO

As degenerações retinianas são a maior causa de cegueira no mundo, sendo a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) a mais importante. A DMAI é uma doença de caráter lento, progressivo e de causas multifatoriais. O estresse oxidativo causado pela exposição à luz é o principal fator de risco para esta enfermidade. Embora não haja cura, a suplementação dietética com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa ω -3 (ω -3 LCPUFAs) é indicada para a redução da progressão da doença. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética com ω -3 LCPUFAs em camundongos albinos (SWISS) submetidos à exposição à luz de média intensidade. Os animais foram suplementados com dieta rica em ω -3 LCPUFAs e expostos à luz branca (3000LUX) por 12 horas, e em seguida avaliados nos períodos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição. Camundongos alimentados com ração comercial serviram como controle. Os grupos foram avaliados quanto a morfologia da retina, espessura da camada nuclear externa, número de células do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR), presença e ativação de micróglia, imunolocalização de PEDF, presença de células em apoptose e neovascularizações. Nossos resultados indicaram que imediatamente após a exposição à luz, os animais suplementados tiveram alterações atenuadas em relação ao grupo controle. Entretanto, nos períodos seguintes, os grupos suplementados apresentaram lesões equivalentes ou até mesmo mais acentuadas em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que os ω -3 LCPUFAs possuem um efeito dual sobre a retina, exercendo uma neuroproteção inicial e, em seguida, atuando de maneira nociva.

Palavras-chave: degeneração luz-induzida, ácido docosa-hexaenóico, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Retinal degenerations are the major causes of blindness in the world, and the Age-Related Macular Degeneration (AMD) is the most important. The AMD is a slow and progressive disease with multi-factorial causes. The oxidative stress caused by light exposure is the major risk factor for this disease. Although there is no cure, dietary supplementation with ω -3 long chain polyunsaturated fatty acids (ω -3 LCPUFAs) is indicated for reduction of disease progression. The purpose of our study is evaluate the effects of dietary supplementation with ω -3 LCPUFAs in albino mice (SWISS) subjected to medium intensity light exposure. The animals were fed with a diet enriched with ω -3 LCPUFAs and exposed to white light (3000LUX) for 12 hours, and then evaluated at periods of 0, 7, 14, 21, 30, 60 and 90 days after exposure. Mice fed with a commercial diet served as controls. The retinal morphology, outer nuclear layer thickness, Retinal Pigmented Epithelium (EPR) cell number, presence and activation of microglial cells, PEDF immunolocalization, presence of apoptotic cells and retina neovascularization. Our results indicated that immediately after light exposure, supplemented animals had attenuated lesions compared to the control group. However, in subsequent periods, supplemented groups showed lesions similar or even more pronounced as the control group. These results suggest that ω -3 LCPUFAs have a dual effect on the retina, exerting an initial neuroprotection, and then exhibiting a deleterious effect to the retina.

Keywords: Light-induced degeneration, Docosahexaenoic Acid, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Pág
FIGURA 1	Representação de um olho humano em corte longitudinal. Fonte: SENSE organs-eyes, 2011.	13
FIGURA 2	Diagrama da retina de vertebrado evidenciando-se as células envolvidas no processamento visual. Fonte: SENSE organs-eyes, 2011.	15
FIGURA 3	Diagrama da morfologia de um fotorreceptor bastonete. Fonte: KRIZAJ e COPENHAGEN, 2002.	16
FIGURA 4	Diagrama da molécula de rodopsina, com o componente não-protéico 11- <i>cis</i> retinal em seu interior, inserida em um disco de membrana de um bastonete. Fonte: MIßFELDT, 1993.	17
FIGURA 5	Diagrama de parte do segmento externo de um bastonete, evidenciando-se o a cadeia de fototransdução. Fonte: PURVES et al., 2001.	18
FIGURA 6	Diagrama das funções do Epitélio Pigmentar da Retina. SE, Segmento Externo do Fotorreceptor; VM, Vilosidade de Membrana do epitélio pigmentar. Fonte: STRAUSS, 2005.	20
FIGURA 7	Estrutura química do Ácido Docosa-hexaenóico, Ácido Eicosapentaenóico e Ácido Aracdônico. As moléculas estão orientadas com o terminal Metila (Omega) à esquerda. Fonte: SANGIOVANNI E CHEW, 2005.	30
FIGURA 8	Diagrama do processo de absorção (Via Longa) e conservação (Via Curta) do Ácido Docosa-Hexaenóico nos fotorreceptores. R=Processo mediado por Receptor. Fonte: SANGIOVANNI E CHEW, 2005.	32
CAPÍTULO II		
FIGURA 1	Fotomicrografia de luz da região externa de retinas avaliadas logo após a exposição à luz e a 60 dias após a fotoexposição. A. retina de animal alimentado com dieta controle apresentando desorganização dos segmentos internos dos fotorreceptores (seta), vacuolizações na matriz intercelular dos segmentos externos e intracitoplasmáticas no EPR (asteriscos). B. retina de animal suplementado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs, com segmentos internos intactos, e vacuolizações em menor número. C. retina de animal suplementado, 60 dias após exposição à luz evidenciando-se a redução da espessura da CNE (asterisco) e aderência do tecido coroidal ao EPR (seta). D. Maior aumento da fotomicrografia C, evidenciando-se debris nucleares na CNE (seta). Coloração em H.E. EPR: Epitélio Pigmentar da Retina, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3), CNE: Camada Nuclear Externa.	62
FIGURA 2	Comparação das espessuras da Camada Nuclear Externa entre o grupo controle sem exposição à luz, grupo alimentado com dieta controle e o suplementado com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) nos tempos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após	63

- a exposição à luz. * $P < 0.05$ entre os grupos de dieta controle e dieta rica em n-3 LCPUFAs.
- FIGURA 3 Comparação do número de células do Epitélio Pigmentar da Retina, dorsal e ventralmente ao disco óptico, entre o grupo controle sem exposição à luz, grupo alimentado com dieta controle e o suplementado com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) nos tempos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição à luz. * $P < 0.05$. 64
- FIGURA 4 Fotomicrografia de reação histoquímica para a marcação de processos citoplasmáticos de micróglia da retina de animais avaliados imediatamente após exposição à luz. **A.** retina do grupo de dieta controle, apresentando uma grande quantidade de processos citoplasmáticos de micróglia ativadas nos segmentos dos fotorreceptores (asterisco). **B.** retina do grupo alimentado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs, apresentando uma menor quantidade de processos citoplasmáticos nos segmentos dos fotorreceptores. **C.** retina do grupo controle evidenciando-se processos citoplasmáticos de micróglia no espaço subretiniano (seta). A e B: contra-coloração com Azul de Toluidina, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). 64
- FIGURA 5 Marcação de células em apoptose pelo método TUNEL na retina de animais avaliados imediatamente após exposição à luz. **A.** retina representativa do grupo controle apresentando uma grande quantidade de núcleos em processo de apoptose na CNE. **B.** retina representativa do grupo suplementado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs apresentando uma menor quantidade de núcleos marcados na CNE. CNE: Camada Nuclear Externa, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). Contra-coloração com Eosina. 65
- FIGURA 6 Fotomicrografia de marcação imuno-histoquímica de PEDF na retina de animais avaliados logo após exposição à luz. A. presença de PEDF no citoplasma do EPR e nos segmentos internos dos fotorreceptores (setas). B. marcação mais evidente do PEDF na camada plexiforme externa da retina (asterisco). Contra-coloração com Hematoxilina. 65
- FIGURA 7 Fotomicrografia de marcação imuno-histoquímica de PEDF na retina de animais alimentados com dieta rica em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). **A.** retina de animal avaliado logo após a exposição. **B.** retina de animal avaliado 90 dias após a exposição à luz, evidenciando-se marcação mais intensa do tecido retiniano. Contra-coloração com Hematoxilina. 66
- FIGURA 8 Fotografia estereoscópica de montagem global da retina para demonstração intravascular da peroxidase de rábano. **A.** Retina representativa do grupo controle sem exposição à luz. **B.** retina de animal do grupo alimentado com dieta controle a 90 dias pós exposição. **C.** retina de animal do grupo suplementado com dieta rica em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). 66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido Aracdônico
ACL	Amaurose Congênita de Leber
AP-1	Proteína Ativadora 1
APR	Atrofia Progressiva da Retina
ARVO	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia
CEP	Carboxil-etil-pirrole
CEUA/UFRPE	Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco
CNE	Camada Nuclear Externa
Co-A	Coenzima A
DAB	3,3´Diaminobenzidina
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
DMAI	Degeneração Macular Associada à Idade
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGCG	Epigallocatequina Galato
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
FGF-2	Fator de Crescimento do Fibroblasto 2
g	grama
GDP	Guanosina Difosfato
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico

GTP	Guanosina Trifosfato
Kd	Kilodaltons
Kg	Kilograma
LA	Ácido Linoleico
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LCPUFAs	Ácidos Graxos Polinsaturados de Cadeia Longa
mg	miligrama
NPD1	Neuroprotectina D1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCRD	Degeneração Progressiva de Cones e Bastonetes
PEDF	Fator Derivado do Epitélio Pigmentar
pH	Potencial Hidrogeniônico
RCS	Royal College of Surgeons
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RP	Retinite Pigmentar
RPE65	Proteína Específica do Epitélio Pigmentar da Retina
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TUNEL	“TdT–Mediated dUTP Nick-End Labeling”
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VLDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
α - LLNA	Ácido α - Linolênico
ω -3 LCPUFAs	Ácidos Graxos Polinsaturados de Cadeia Longa ω -3

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 RETINA.....	14
2.2 DEGENERAÇÃO RETINIANA.....	22
2.3 FOTOTOXICIDADE.....	24
2.4 TERAPÊUTICA DA DEGENERAÇÃO FOTOTÓXICA.....	28
2.5 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS DE CADEIA LONGA Ω -3.....	29
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO II	45
TÍTULO	45
RESUMO	45
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 ANIMAIS.....	47
2.2 DIETAS.....	48
2.3 EXPOSIÇÃO À LUZ.....	48
2.4 AMOSTRAGEM DO TECIDO OCULAR.....	48
2.5 MORFOLOGIA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA DEGENERAÇÃO RETINIANA.....	49
2.6 PROCEDIMENTO TUNEL (TDT-MEDIATED DUTP NICK-END LABELING)....	49
2.7 HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	50
2.8 INJEÇÃO DE PEROXIDASE DE RÁBANO (HRP) E MONTAGEM GLOBAL DA RETINA.....	50
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3 RESULTADOS	51
3.1 MORFOLOGIA.....	51
3.2 ESPESSURA DA CNE E QUANTIDADE DE CÉLULAS DO EPR.....	52
3.3 MIGRAÇÃO E ATIVAÇÃO DE MICRÓGLIAS.....	52
3.4 APOPTOSE DE FOTORRECEPTORES.....	53
3.5 IMUNOMARCAÇÃO DO PEDF.....	53
3.6 VASOS SANGUÍNEOS DA RETINA.....	54
4 DISCUSSÃO	54
4.1 DEGENERAÇÃO INDUZIDA PELA LUZ.....	54
4.2 EFEITO DA DIETA RICA EM Ω -3 LCPUFAS.....	55
AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE	61
ANEXO	67

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

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

Dentre os vários tipos de enfermidades que acometem a retina de seres humanos a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) é a mais importante, caracterizada pela morte dos fotorreceptores, destacando-se como uma importante doença, sendo responsável por cerca de 90% das alterações retinianas que levam à cegueira no mundo (GEHRS et al., 2006). Em alguns animais, como cães e gatos, são observados alguns tipos de degenerações retinianas semelhantes às aquelas encontradas em seres humanos. Estudos recentes demonstram que alterações em alguns genes são responsáveis pelo desenvolvimento destas enfermidades e testes genéticos específicos já são rotineiramente utilizados na identificação destes genes com a finalidade de se evitar a propagação destes nas proles de raças atingidas (NARFSTRÖM e PETERSEN-JONES, 2008).

Acredita-se que a exposição à luz é um dos fatores etiológicos fundamentais da DMAI (TAYLOR et al., 1990; MARGRAIN et al., 2004 ; TOMANY et al., 2004; VILLEGAS-PÉREZ et al., 2005), assim como acelera a evolução das degenerações hereditárias dos fotorreceptores, tanto em humanos (HECKENLIVELY et al., 1991) como em animais (NAASH et al., 1996; ORGANISCIK et al., 2003; CIDECIYAN et al., 2005).

Devido à incapacidade de regeneração das células da retina de mamíferos as lesões causadas pela luz são de caráter permanente (VILLEGAS-PÉREZ et al., 2005). Portanto, é de fundamental importância a busca de terapias que atenuem ou bloqueiem o processo de degeneração, como o uso de substâncias antioxidantes para o retardamento e bloqueio dos processos degenerativos da retina.

Apesar de existirem diversos estudos que associam o uso de substâncias antioxidantes à neuroproteção retiniana, novas pesquisas são necessárias para a elucidação dos mecanismos moleculares e níveis seguros para utilização na clínica oftalmológica em seres humanos e animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A grande maioria dos animais possui órgãos capazes de perceber estímulos luminosos. Desde estruturas mais simples como o ocelo, composto de fotorreceptores e um epitélio pigmentar subjacente, encontrados, por exemplo, em planárias, até os olhos dos vertebrados, como seres humanos, que constituem um aparato especializado na captura de estímulos luminosos. Os diferentes níveis de complexidade dos aparelhos visuais são reflexos das adaptações ao meio ambiente, seja para detecção de fonte de alimento, acasalamento, relação predador/presa, orientação ou simplesmente captar os ciclos de claro/escuro pelo movimento do sol (YAU e HARDIE, 2009).

Atualmente, sabe-se que para ocorrer a experiência visual propriamente dita, são gerados paralelamente diversos estímulos, que são modulados em diferentes níveis e finalmente associados no encéfalo. O primeiro nível de modulação da informação luminosa ocorre no olho (HUBERMAN et al., 2008).

Longe de ser apenas um órgão de captura da luz e transmissão de impulsos nervosos, o olho é o aparato responsável pelo primeiro processamento da imagem. Este é composto de estruturas que refratam a luz, como a córnea e o cristalino, bem como a íris, que regula a quantidade de luz que incide sobre a retina (SLATTER, 2005).

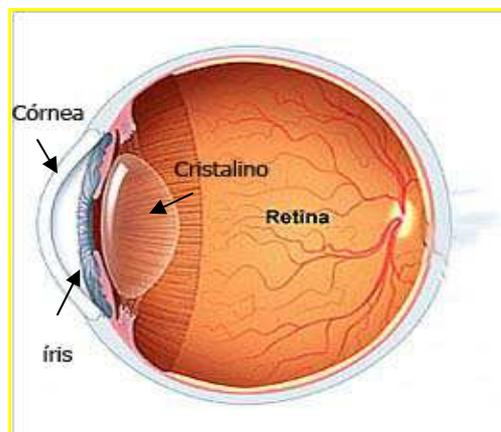


Figura 1: Representação de um olho humano em corte longitudinal.
Fonte: SENSE organs-eyes, 2011.

2.1 RETINA

A retina constitui a porção nervosa do globo ocular e está localizada em seu segmento posterior, internamente está em contato com o corpo vítreo e, externamente com o epitélio pigmentar e Membrana de Bruch. Juntamente com o nervo óptico, é considerada uma extensão do Sistema Nervoso Central, sendo derivada do prosencéfalo embrionário (SLATTER, 2005).

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

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

É a partir dos fotorreceptores que o processo visual se inicia. Após a estimulação destas células, são gerados sinais elétricos que por sua vez, são transmitidos a outros neurônios (células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares) que têm a função de modular, associar e retransmitir a informação, por meio do nervo óptico até o encéfalo (SUNG e CHUANG, 2010). Segundo Baccus (2007), foram identificados mais de 20 tipos de células amácrinas e ganglionares que contribuem para este processo de modulação, fazendo parte de vias paralelas que são ativadas ou inibidas por estímulos específicos, como mudanças na intensidade da luz, movimentos de objetos, mudanças de cor, entre outros.

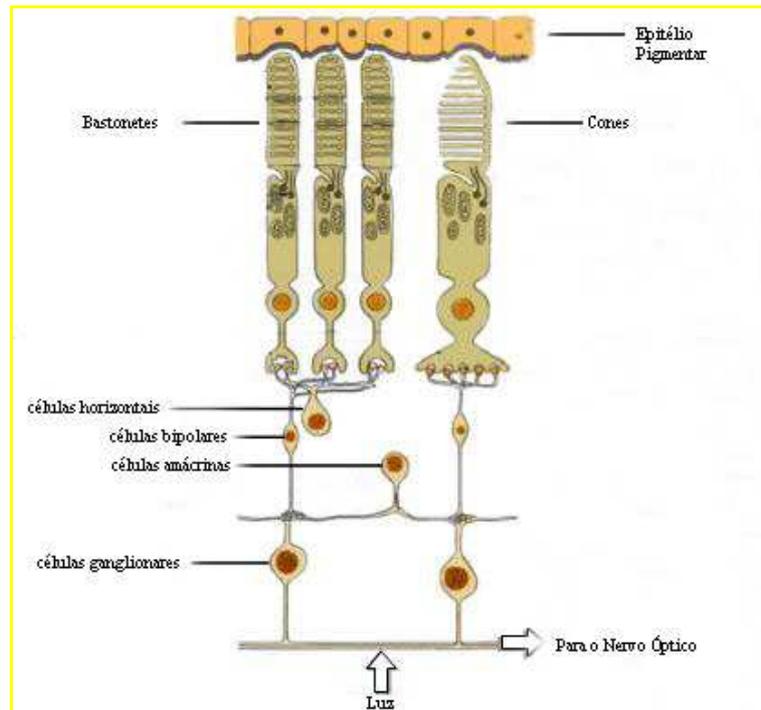


Figura 2. Diagrama da retina de vertebrado evidenciando-se as células envolvidas no processamento visual.
 Fonte: SENSE organs-eyes, 2011.

Os feixes dos axônios oriundos da retina fazem sinapses com diferentes áreas do tronco encefálico, corpos geniculados, tálamo e córtex visual, onde ocorrem novos processamentos dos estímulos para gerar a experiência visual propriamente dita, assim como, para o controle dos movimentos oculares, equilíbrio, movimentos pupilares e regulação do ritmo circadiano (HUBERMAN et al., 2008).

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

ligado a somente uma célula bipolar e a uma célula ganglionar, o que leva ao aumento da resolução da imagem (SUNG e CHUANG, 2010).

Os bastonetes constituem a maior parte dos fotorreceptores da retina, fazendo parte da visão em situações de baixa luminosidade e associados à percepção de movimentos. Anatomicamente, são divididos em segmento externo, intimamente relacionado com o EPR, segmento interno, região nuclear e processos sinápticos (SLATTER, 2005). Os segmentos externos dos fotorreceptores estão preenchidos com discos de membrana nos quais contém pigmentos visuais. Estes pigmentos são constituídos de um cromóforo derivado da vitamina A e de uma apoproteína denominada Opsina (YAU e HARDIE, 2009). Segundo Terakita (2005), existem mais de 1000 opsinas no reino animal, todas originadas de um ancestral comum a vertebrados e invertebrados.

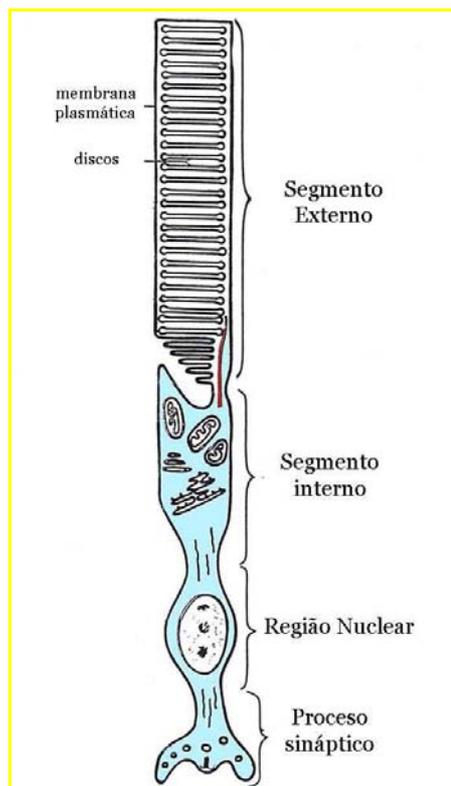


Figura 3. Diagrama da morfologia de um fotorreceptor bastonete.
Fonte: KRIZAJ e COPENHAGEN, 2002.

Dentre os diversos tipos de pigmentos visuais nos vertebrados, a rodopsina é a mais estudada. Esta proteína está localizada nos discos de membrana e na

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

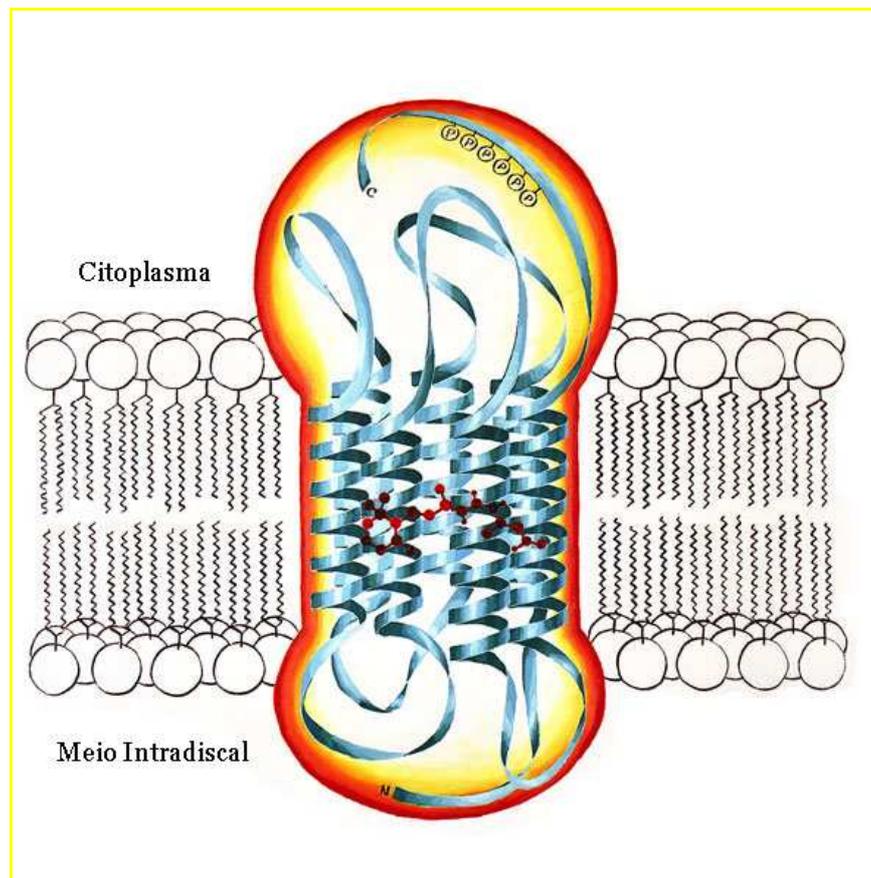


Figura 4. Diagrama da molécula de rodopsina, com o componente não-protéico 11-*cis* retinal em seu interior, inserida em um disco de membrana de um bastonete.

Fonte: MIßFELDT, 1993.

A isomerização do cromóforo constituinte do pigmento visual marca o início da visão, a este processo dá-se o nome de fototransdução. Apesar de existir em todos fotorreceptores, a fototransdução da rodopsina em bastonetes é a mais conhecida (SUNG e CHUANG, 2010).

Quando fótons atingem a molécula de rodopsina, ocorre a isomerização do 11-*cis* retinal para *all-trans* retinal, criando uma molécula energeticamente instável, ou ativada, que rapidamente muda sua conformação, passando por estágios intermediários (Bartorodopsina, Lumirodopsina, Metarodopsina I e II). Em seguida, a molécula ativada se liga a uma proteína G trimérica denominada transducina pela catalisação da troca de Guanosina Difosfato (GDP) por Guanosina Trifosfato (GTP). A subunidade alfa dissociada da transducina ativa a Guanosina Monofosfato cíclico-Fosfodiesterase (GMPc-Fosfodiesterase), a qual rapidamente hidrolisa a Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) citoplasmática. Conseqüentemente, a GMPc se dissocia da membrana plasmática dos canais de Sódio, fechando-os. Este processo leva à hiperpolarização da membrana plasmática, que inicia o impulso nervoso reduzindo a liberação no neurotransmissor Glutamato na fenda sináptica (WHIKEHART, 1994 ;MOLDAY, 1998; LAMB e PUGH JUNIOR, 2004).

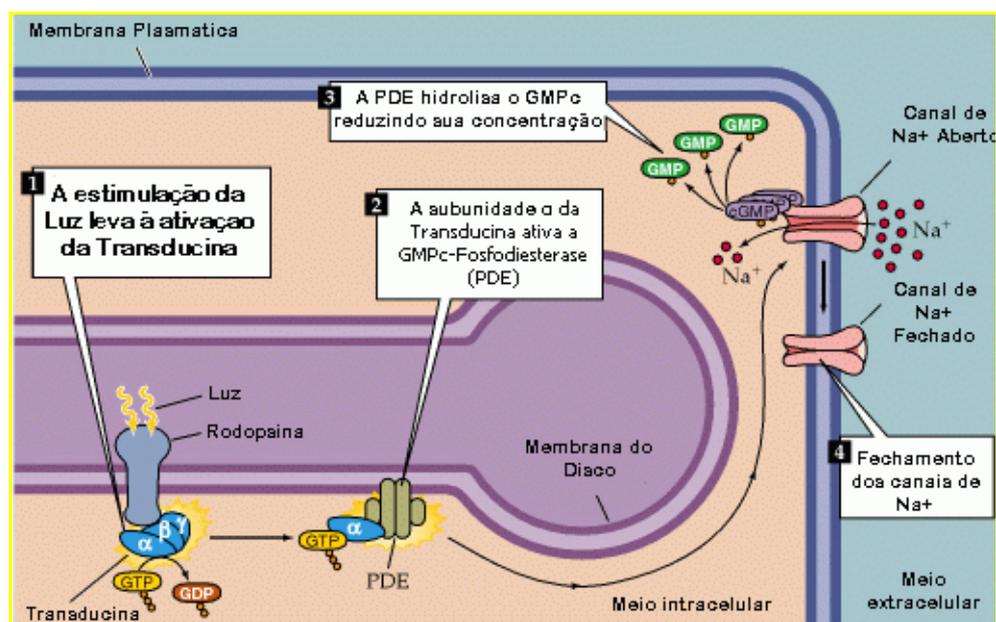


Figura 5. Diagrama de parte do segmento externo de um bastonete, evidenciando-se o a cadeia de fototransdução.

Fonte: PURVES et al., 2001.

Os canais de sódio também são permeáveis a íons de cálcio, de maneira que, quando ocorre seu fechamento, há uma diminuição da concentração de cálcio citoplasmático, estimulando a produção de guanilil ciclase, uma enzima que catalisa a produção de GMPc, levando a célula ao estado que se encontrava antes do estímulo luminoso. A ativação da guanilil ciclase é mediada por uma proteína denominada recoverina, que é sensível aos baixos níveis de cálcio no citoplasma. Este mecanismo faz com que a célula se recupere rapidamente para ser estimulado novamente e também, acredita-se que funciona como um regulador da sensibilidade do fotorreceptor a diferentes intensidades de luz (ALBERTS et al. 1997). Durante este processo de recuperação, a rodopsina ativada é rapidamente desensibilizada pela fosforilação e ligação à arrestina (SUNG e CHUANG, 2010).

Após a ligação da rodopsina ativada à molécula de arrestina, ocorre a liberação do *all-trans* retinal, o qual é levado ao EPR e re-isomerizado em *11-cis* retinal para compor novamente a molécula de rodopsina. A este processo dá-se o nome de ciclo visual. Apesar de largamente estudado e ter a maioria de seus componentes identificados e caracterizados, a biologia celular deste mecanismo tão complexo ainda permanece desconhecida (SUNG e CHUANG, 2010). Atualmente sabe-se que o *all-trans* retinal sofre uma série de reações de oxidação e redução pela ação de enzimas denominadas retinol desidrogenases para chegar a ser re-isomerizada. Além destas enzimas, outro grupo de proteínas, denominadas chaperonas são extremamente importantes no processo, de modo que, dentre outras funções, exercem o papel de transporte do cromóforo entre o segmento externo do fotorreceptor e o epitélio pigmentar da retina (STRAUSS, 2005). A Proteína Específica do Epitélio Pigmentar da Retina de 65KDa (RPE65), é uma destas chaperonas que atuam diretamente no processo de re-isomerização. Algumas doenças retinianas congênitas estão associadas com mutações desta proteína, indicando que ela é crucial para a regeneração do pigmento visual (CAI et al., 2009).

Durante o processo de fototransdução, ocorre a descamação constante de discos de membrana na extremidade dos segmentos externos dos fotorreceptores. Estes discos são ativamente fagocitados pelo EPR e novos surgem na base do segmento externo. Esta característica do EPR é essencial para o funcionamento dos

fotorreceptores, pois são liberadas substâncias tóxicas como radicais livres, lipídios e proteínas danificadas pela luz, que, se não fossem removidas do meio extracelular, levariam à perda da homeostase da retina e morte de fotorreceptores (SUNG e CHUANG, 2010). Além destas substâncias, também são fagocitadas moléculas de retinal que entram no ciclo visual, e também ácidos graxos essenciais para a constituição dos discos de membrana são fagocitados, processados e reapresentados aos fotorreceptores para a formação de novos discos (STRAUSS, 2005).

Além de participar ativamente do processo de re-isomerização dos pigmentos visuais e fagocitar os discos de membrana liberados pelos fotorreceptores, o EPR possui uma série de outras funções essenciais para o funcionamento da retina, que são a absorção da luz e proteção contra foto-oxidação, transporte transepitelial e a secreção de fatores de crescimento (STRAUSS, 2005).

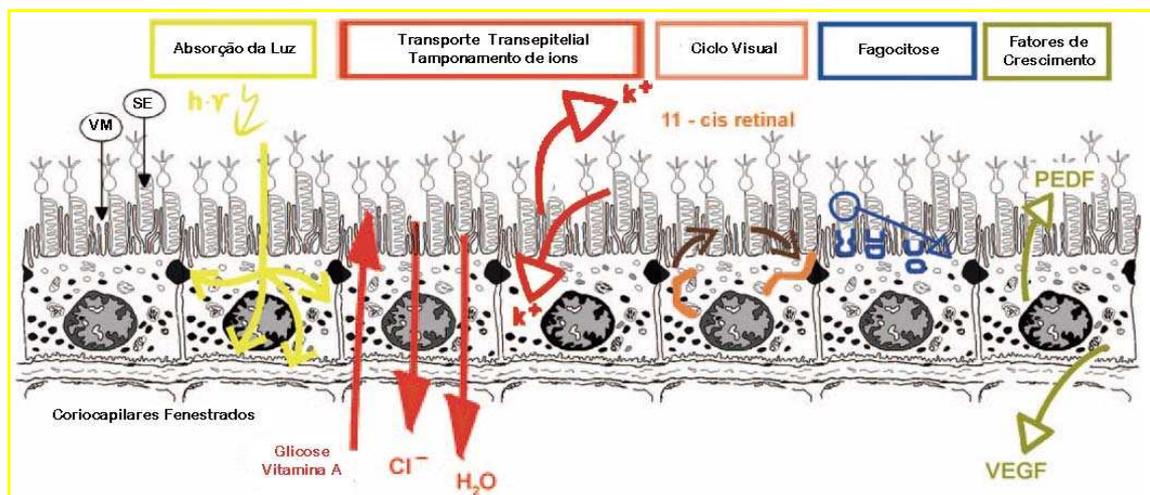


Figura 6. Diagrama das funções do Epitélio Pigmentar da Retina. SE, Segmento Externo do Fotorreceptor; VM, Vilosidade de Membrana do epitélio pigmentar.
Fonte: STRAUSS, 2005.

O EPR é capaz de absorver a luz incidida sobre a retina. Com exceção de animais albinos, suas células possuem uma grande variedade de pigmentos que servem como filtros especializados em diferentes comprimentos de onda, em especial aqueles que são mais danosos para a retina. O principal pigmento constituinte do EPR é a melanina. Além deste, a lipofucsina, é outro pigmento

acumulado no citoplasma destas células durante toda a vida. Em indivíduos idosos, o acúmulo de lipofucsina pode chegar a concentrações tóxicas para a retina. O EPR produz enzimas como a superóxido dismutase e catalase que atuam reduzindo os níveis de radicais livres nas células, assim como substâncias não-enzimáticas, como carotenóides (luteína, zeaxantina, beta-caroteno), e pigmentos como a melanina, contribuem para a manutenção da homeostase do meio intra e extracelular (STRAUSS, 2005; BEATTY et al., 2001).

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

O EPR participa ativamente nos processos de angiogênese, por meio da secreção de fatores de crescimento, que estão envolvidos desde a formação da retina até em sua homeostase no indivíduo adulto. Dois fatores se destacam por sua importância clínica, o Fator Derivado do Epitélio Pigmentar (PEDF) e o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). Na retina saudável, o PEDF é secretado em grande quantidade pelo EPR, o qual tem como funções atuar como neuroprotetor e inibidor da neovascularização. O VEGF por sua vez, é secretado em pequenas quantidades e é responsável pela preservação do endotélio vascular dos capilares da coróide e também atua como um agente permeabilizante das janelas do endotélio. Estes dois fatores atuam em conjunto para a manutenção dos vasos sanguíneos da coróide e retina. Qualquer alteração na relação entre eles pode induzir a neovascularizações e perda da homeostase retiniana (STRAUSS, 2005).

Entre os tipos celulares que compõem a estrutura da retina, existem dois que não fazem parte das vias de transmissão dos impulsos nervosos gerados pela luz. São duas células da glia encontradas no SNC, denominadas Micróglia e célula de Müller (SLATTER; 2005).

A micróglia constitui a população de células fagocitárias da retina e sistema nervoso. Como existe a barreira hematorretiniana, não há circulação de células do sistema imune do organismo, como leucócitos e linfócitos. Portanto as micróglia

constituem a primeira defesa. Na retina saudável, as micróglia estão em um estado quiescente e se localizam na periferia do tecido. A qualquer sinal de alteração da homeostase, são ativadas e migram para área atingida atuando como fagócitos e liberando citocinas para comunicação com outras células e neurônios (KARLSTETTER et al., 2010).

As células de Müller localizam-se em toda a espessura da retina e estão associadas intimamente com todos os tipos celulares. Inicialmente, pensava-se que a célula de Müller possuía como única função manter a estabilidade da arquitetura da retina. Recentemente, sabe-se que esta célula possui muitas outras funções essenciais para o funcionamento da retina, como a manutenção da homeostase do meio extracelular (íons, água, pH e reciclagem de neurotransmissores), em retinas vascularizadas, está associada ao controle da angiogênese e regulação do fluxo sanguíneo. Alterações na homeostase retiniana leva à ativação da célula de Müller denominada gliose. A gliose é caracterizada por respostas não-específicas e específicas dependendo dos fatores patogênicos envolvidos (BRINGMANN et al., 2006).

2.2 DEGENERAÇÃO RETINIANA

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

As degenerações retinianas possuem em sua maioria um caráter congênito e hereditário. Mais de 100 genes estão relacionados com estas enfermidades. Dentre as principais estão a Retinite Pigmentar (RP) e a Amaurose Congênita de Leber (ACL). A RP compreende diferentes mutações que levam à morte de fotorreceptores cones e bastonetes. Os principais sintomas incluem déficit visual progressivo, cegueira noturna, até a perda total da visão. Esta enfermidade geralmente inicia-se na infância ou adolescência, levando a lesões severas entre 40 a 50 anos de idade.

A prevalência da RP é de cerca de 1 entre 4000 indivíduos em um total de quase 1 milhão de pessoas acometidas em todo o mundo (PREISING e HEEGAARD, 2004). Dentre os tipos de mutações que caracterizam a RP, cerca de 40% são autossômicas dominantes, 50% são recessivas e 10% são ligadas ao cromossomo X (HARTONG et al., 2006). A ACL constitui uma distrofia rara, porém não menos importante, que acomete indivíduos jovens. É caracterizada pelo surgimento de defeitos visuais severos dentro dos dois primeiros anos de vida (PREISING E HEEGAARD, 2004). Apesar de sua patogenia ainda não estar totalmente elucidada, estudos demonstraram que em 10% dos casos avaliados os indivíduos possuíam mutações no gene RPE65, o qual codifica a isomero-hidrolase de mesmo nome (THOMPSON et al., 2000).

As degenerações retinianas são bastante conhecidas em animais. Segundo Ofri e Nafström (2007), o primeiro caso de degeneração retiniana em cães foi descrito em 1909 em um animal da raça Setter Gordon. A partir desta época, inúmeros casos foram relatados em mais de 100 raças de cães, sendo também relatadas em gatos. Apesar de estarem agrupadas sob uma mesma denominação, Atrofia Progressiva de Retina (APR), já foram identificados diferentes tipos de degenerações hereditárias. Atualmente, cerca de 12 genes mutantes foram identificados como causadores de APR em cães. Estas degenerações hereditárias compartilham semelhanças com as observadas em seres humanos, sendo o cão, um animal ideal para o desenvolvimento de modelos para a compreensão dos mecanismos patogênicos e para o teste de novas estratégias terapêuticas que possam ser utilizadas no tratamento destas enfermidades (BELTRAN, 2009).

Entre as degenerações de caráter adquirido, a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) se destaca como a maior causadora de cegueira entre os idosos no mundo (GEHRS et al., 2006). Segundo Gu et al. (2003), cerca de 35% das pessoas com déficit visual acima de 75 anos possuem algum grau de DMAI. É uma doença de causas multifatoriais que envolve diversos fatores de risco tanto ambientais, quanto demográficos e genéticos, como idade, gênero, etnia, dieta, tabagismo, educação, doenças cardiovasculares e exposição à luz. Alguns estudos sugerem que o tabagismo, idade, dieta e exposição à luz são os fatores de risco mais preponderantes para a doença (TAYLOR et al., 1990; MARGRAIN et al., 2004; TOMANY et al., 2004; VILLEGAS-PÉREZ et al., 2005; COLEMAN et al., 2008; JAGER et al., 2008). Apesar de sua patogenia não estar completamente esclarecida,

sabe-se que acomete primariamente o EPR, fotorreceptores, Membrana de Bruch e coriocapilares, culminando na atrofia do EPR, morte de fotorreceptores, neovascularização retiniana, e conseqüente perda da visão (DING et al., 2009).

Para o estudo das degenerações retinianas, tanto hereditárias quanto adquiridas, os animais de experimentação têm sido de grande utilidade. Existem vários animais que apresentam degenerações hereditárias dos fotorreceptores causadas, similarmente ao que ocorre em humanos, por mutações genéticas. Um destes animais é o rato Royal College of Surgeons (RCS) que apresenta uma degeneração hereditária dos fotorreceptores (LAVAIL, 2001) causada por uma mutação do gene MERTK do epitélio pigmentar (D'CRUZ et al., 2000), mutação esta que produz em humanos uma distrofia retiniana (GAL et al., 2000). Estudos preliminares demonstram que a exposição à luz acelera a evolução da degeneração retiniana do rato RCS (ORGANISCIAK et al., 1999). A causa desta degeneração deve-se ao fato do epitélio pigmentar não ser capaz de fagocitar os segmentos externos dos fotorreceptores. Como na DMAI, a atrofia do epitélio pigmentar é um evento freqüente, sendo este modelo animal relevante para o estudo desta enfermidade (LAVAIL, 2001).

2.3 FOTOTOXICIDADE

Apesar dos fotorreceptores serem células especializadas na fototransdução, a intensidade da luz ou até mesmo o espectro ao qual o animal é exposto pode levar a um desequilíbrio deste processo, assim como do ciclo visual de regeneração da rodopsina. Isto pode culminar na morte de fotorreceptores e células do EPR, levando à cegueira (REMÉ et al., 2003).

O processo pelo qual a luz é o agente causador da lesão denomina-se fototoxicidade ou degeneração luz-induzida. O mecanismo é dado da seguinte forma: o excesso de luz pode, num curto período, induzir a fototransdução de grandes quantidades de rodopsina, liberando radicais livres em excesso, e levando ao estresse oxidativo dos fotorreceptores e EPR. Além disso, o acúmulo de componentes ou toxinas não digeríveis, oriundos da fagocitose dos discos de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores, no EPR leva à redução das

funções vitais e eventualmente à morte celular (REMÉ et al., 2003; CINGOLANI et al., 2006).

A Lipofucsina é um pigmento acumulado no EPR, que, quando em excesso, torna-se citotóxico, induzindo a formação de radicais livres. O aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio no interior do EPR leva à desestabilização de membranas de estruturas celulares como lisossomos e mitocôndrias. A redução da eficiência metabólica resultante leva ao acúmulo de mais lipofucsina e ao surgimento de mais radicais livres. Um importante constituinte da Lipofucsina é derivado da ineficiência do EPR em isomerizar o *all-trans* retinol. Uma quantidade adicional desta substância origina-se da fagocitose de restos de membrana dos fotorreceptores. Este composto, N-retinil-N-retinilideno etanolamina, também chamado de A2E, aumenta a sensibilidade do EPR à luz e possui diversos efeitos tóxicos sobre a célula (STRAUSS, 2005).

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

Os mecanismos de fototoxicidade podem variar dependendo da intensidade, duração, e espectro da luz (REMÉ, 2005). Outros estudos ressaltam que tanto a espécie quanto linhagens de animais de experimentação podem influenciar nas respostas aos diferentes modelos de foto-exposição (KELLER et al., 2001). Lavail et al.(1987), em estudos independentes, identificaram diferenças na velocidade de regeneração da rodopsina em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57/B16). Estes autores concluíram que o BALB/c possuía uma taxa de regeneração da rodopsina maior que a outra linhagem, sendo conseqüentemente, o primeiro mais susceptível à fotodegeneração do que o segundo.

Estudos realizados por Grimm et al.(2000) identificaram um mecanismo de regeneração da rodopsina independente do ciclo visual. Eles observaram que a rodopsina, quando estimulada por um feixe de luz com espectro entre 400 e 410 nm (Luz azul), é decomposta em Metarodopsina II e em seguida o *all-trans* retinal é re-isomerizado em 11-*cis* retinal, tornando-se reativa novamente. Os autores sugerem que a luz azul possui uma maior capacidade de causar danos à retina devido a este

fenômeno, no qual a rápida regeneração da rodopsina leva a um maior acúmulo de compostos tóxicos e radicais livres.

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

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

As micróglia respondem ao processo de degeneração dos fotorreceptores por meio de citocinas que são liberadas pelos mesmos. Em estudo com camundongo com degeneração hereditária dos bastonetes (rd-1), Zeiss e Johnson (2004) observaram a migração e proliferação de microglia para a camada nuclear externa da retina, indicando que o processo de apoptose induziu sua ativação.

Após a ativação, as micróglia migram para a região afetada onde liberam diferentes citocinas e fagocitam os fotorreceptores (LANGMANN, 2007). Apesar do papel benéfico das micróglia, a reação exagerada é atualmente compreendida como um fator deletério para a retina, levando à liberação de fatores pró-inflamatórios e à quebra da barreira hematorretiniana, induzindo a migração de macrófagos derivados da medula óssea e a formação de edema (KARLSTETTER et al., 2010). Segundo Schuetz e Thanos (2004), micróglia ativadas liberam fatores pró-apoptóticos em diversas doenças da retina.

Atualmente, estudos sobre a origem das micróglia ainda são conflitantes. Diversos grupos de pesquisa utilizaram técnicas de engenharia genética para a formação de camundongos quimeras com o objetivo de avaliar a possível origem das micróglia recrutadas durante o processo degenerativo (KARLSTETTER et al., 2010). Xu et al. (2007) em estudo com camundongos GFP (Proteína Fluorescente Verde) identificaram um grupo de células presentes na retina derivado da medula

óssea. Os autores sugerem que estas células penetram na retina por meio da barreira hematorretiniana. No mesmo estudo, os autores observaram que a proliferação de micróglia *in situ* é bastante limitada. Em contrapartida, Kaneko et al. (2008) sugerem que a quantidade de células derivadas da medula óssea é bastante reduzida em animais que não sofreram lesão na retina. Quando os animais foram submetidos à degeneração por oxidação utilizando N-metil-N-nitrosurea, ocorreu um aumento significativo de células GFP positivas oriundas da medula óssea (KANEKO et al., 2008).

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

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

A neovascularização retiniana e coroidal constituem os últimos eventos na cronologia da degeneração fototóxica da retina. Atualmente sabe-se que em seres humanos enfermidades como a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI), Retinite Pigmentar (RP) e Retinopatia Diabética Proliferativa (RDP), têm a neovascularização como um dos fatores mais importantes para seu agravamento (BHUTTO et al., 2006; MATSUOKA et al., 2006).

Segundo Strauss (2005), mudanças nos padrões secretórios do EPR estão diretamente relacionadas com a neovascularização retiniana. Este mecanismo se dá pelo balanço de fatores anti e pró-angiogênicos, o PEDF e o VEGF. Quando ocorre o desequilíbrio do EPR ou a morte destas células, há um aumento na concentração de VEGF e uma diminuição na de PEDF, induzindo a neovascularização (MATSUOKA et al., 2006).

Em estudo clínico realizado em seres humanos com RDP e Doença de Eale, foi observado que a proporção entre VEGF e PEDF foi significativamente maior nestes pacientes em relação a pacientes saudáveis. Além disso, a alta relação entre

VEGF e PEDF foi correlacionada com o aumento dos sinais clínicos observados, e a diminuição da relação teve efeito contrário (ANGAYARKANNI et al., 2009).

Huang et al. (2008), avaliaram a taxa de expansão vascular em camundongos PEDF-deficientes. Os autores observaram que ocorreu uma maior expansão de vasos na retina destes animais em relação aos animais saudáveis, concluindo que o PEDF é crucial para a modulação do processo de vascularização na retina em desenvolvimento, bem como no controle da angiogênese na retina de animais adultos.

Em estudo clínico em cavalos portadores de uveíte recorrente, uma enfermidade auto-imune, Deeg et al. (2007) observaram a diminuição da concentração de PEDF e o aumento de VEGF no corpo vítreo destes animais, sugerindo que estes fatores possuem uma relação com a patogenia da doença ainda não totalmente elucidada.

2.4 TERAPÊUTICA DA DEGENERAÇÃO FOTOTÓXICA

Apesar de estudos recentes demonstrarem que células-tronco embrionárias podem se diferenciar em fotorreceptores e células do EPR, a aplicabilidade clínica deste tipo de terapêutica ainda é impraticável (BHARTI et al., 2010). Diante disto, diversos grupos de pesquisa estudam meios de prevenir, atenuar ou bloquear os efeitos da degeneração luz-induzida. A maior parte dos estudos busca atingir dois pontos-chave no processo de fototoxicidade, a formação de radicais livres pela foto-oxidação e a apoptose de fotorreceptores e células do EPR, pelo uso de substâncias com características antioxidantes e neuroprotetoras.

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

reduziu níveis de fatores pró-inflamatórios, sendo um potencial componente nutracêutico para a prevenção de degenerações retinianas.

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

Costa et al. (2008) observaram que a Epigallocatequina Galato (EGCG), um dos principais componentes do chá verde, administrada a ratos expostos à luz, teve efeito neuroprotetor sobre os fotorreceptores, reduzindo o número de células em apoptose, assim como níveis de fatores pró-apoptóticos. Em contrapartida, Keller et al. (2001) observaram que o anestésico volátil Halotano protege os fotorreceptores contra a degeneração luz-induzida, pela inibição temporária da regeneração da rodopsina, indicando que esta substância atua como neuroprotetor, sem exercer necessariamente alguma ação antioxidante.

2.5 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS DE CADEIA LONGA ω -3

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa compreendem os ácidos graxos essenciais. Duas famílias deste grupo existem na natureza, o ω -3 e ω -6. Estes lipídios são caracterizados por possuírem grandes cadeias de carbono com uma extremidade carboxila e duas ou mais duplas ligações metileno-interrompidas (insaturações). Estruturalmente, são classificados pelo número de carbonos, duplas-ligações, e proximidade da primeira dupla-ligação com o terminal metil (omega) da cadeia de carbonos. Por exemplo, o ácido aracdônico é representado pela fórmula 20:4 ω -6, ou seja, possui 20 carbonos com quatro insaturações em sua cadeia, estando a primeira localizada a seis carbonos da extremidade terminal (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

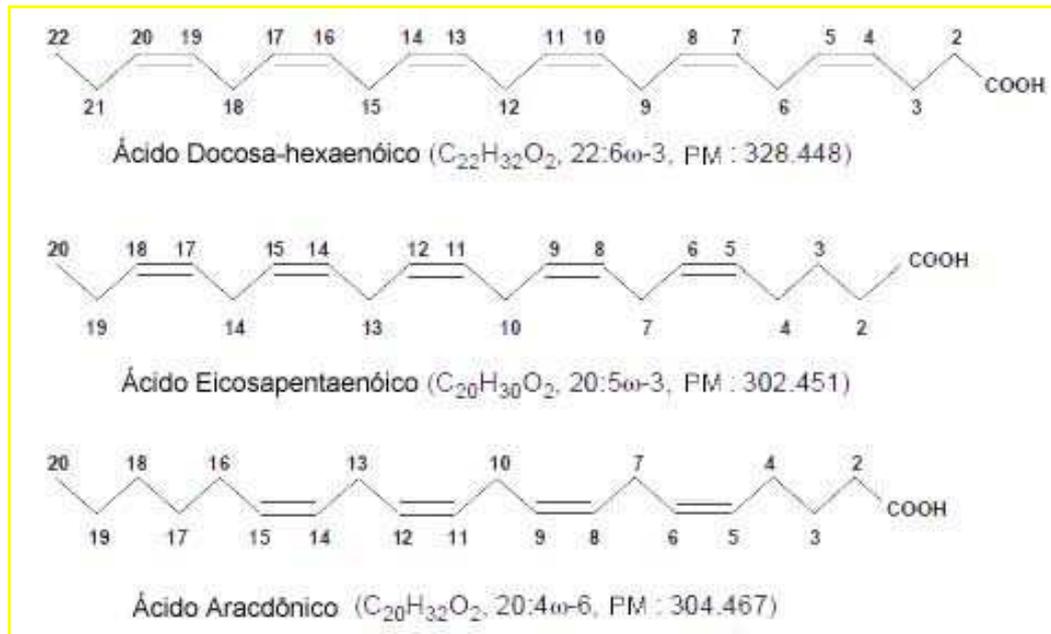


Figura 7. Estrutura química do Ácido Docosa-hexaenóico, Ácido Eicosapentaenóico e Ácido Aracídônico. As moléculas estão orientadas com o terminal Metila (Omega) à esquerda.

Fonte: SANGIOVANNI E CHEW, 2005.

Os ácidos graxos essenciais são assim denominados porque os seres humanos e mamíferos não possuem a capacidade de biosíntese destes compostos, devido à ausência natural de duas enzimas, a Δ -15 e Δ -12 desaturase. Por isso, nós somos dependentes de fontes alimentares destes lipídios. Entre os ácidos graxos ω -6, o Ácido Aracídônico (AA) é o mais importante, sendo utilizado como substrato para a formação de moléculas envolvidas nos processos inflamatórios. Seu precursor é o Ácido Linoleico (LA). O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o docosa-hexaenóico (DHA) são os ácidos graxos ω -3 principais, sendo derivados do α -LLNA, ácido α -Linolênico (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

Os ácidos graxos essenciais geralmente existem sob a forma esterificada em triglicerídeos nos alimentos. No processo de digestão, ocorre a hidrólise das ligações entre a molécula de glicerol e os lipídios por meio de enzimas pancreáticas. Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs) são, posteriormente, re-esterificados em triglicerídeos e fosfolipídios no interior dos enterócitos. Em seguida, estes compostos são integrados a quilomícrons e lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), que são transportados até a corrente sanguínea por meio do sistema linfático, chegando ao fígado. Nos hepatócitos, ocorre a síntese dos ácidos graxos

polinsaturados de cadeia longa ω -3 (ω -3 LCPUFAs), DHA e EPA, derivados do α -LLNA. Dentre os ω -3 LCPUFAs, o DHA é o mais estudado e de maior importância para a retina. A seguir é descrito o processo de absorção e transporte deste ácido graxo (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

O α -LLNA entra no hepatócito por meio de um processo mediado por receptor e é ativado pela Coenzima-A (CoA). Este complexo entra no retículo endoplasmático onde é desaturado em DHA-CoA, que é, por sua vez, esterificado em fosfolipídios e formam complexos com apoproteínas. Estes complexos são transportados em vesículas para o Complexo de Golgi, onde são agrupados em lipoproteínas e secretados. O DHA se liga ao VLDL e triglicerídeos e é transportado até os coriocapilares, onde transportado através da barreira hematorretiniana para o Epitélio Pigmentar da Retina (EPR). Para o DHA entrar na célula ocorre a hidrólise e liberação do ácido graxo livre por meio de receptores de membrana. A partir daí, o DHA é levado aos segmentos internos dos fotorreceptores por meio de moléculas chaperonas transportadoras, onde entram nestas células para formarem os fosfolipídios dos discos de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores (BAZAN, 1990).

Apesar de existir este processo de transporte e adição do DHA à retina, o sistema Fotorreceptor-EPR, possui um mecanismo peculiar de conservação deste ácido graxo. Os discos de membrana são fagocitados pelo EPR, onde são formados os fagossomos, que são degradados formando grandes gotículas de lipídios ricos em triglicerídeos contendo DHA. Estes compostos são transportados até o segmento interno dos fotorreceptores entrando novamente na formação de discos de membrana. Durante este processo não há a presença de DHA no citosol das células do EPR, o que pode significar um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo (BAZAN, 1990).

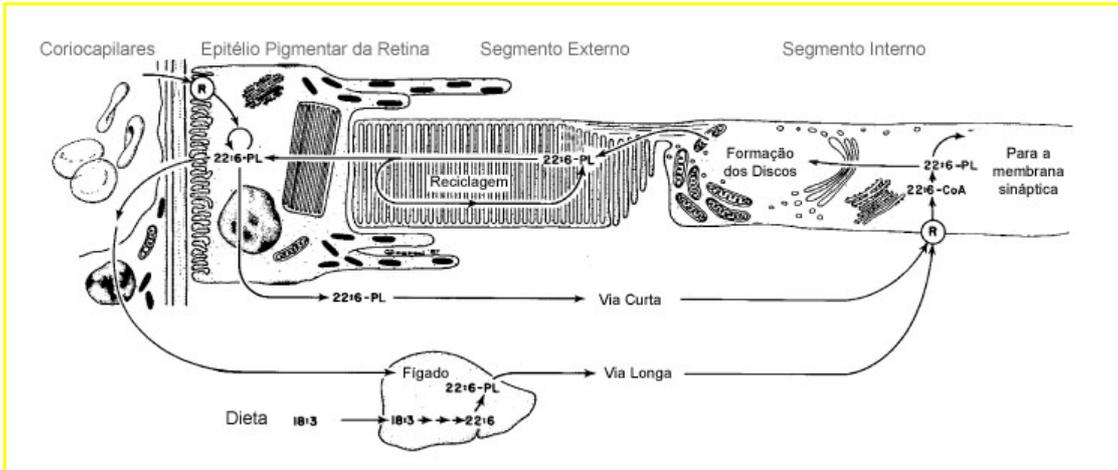


Figura 8. Diagrama do processo de absorção (Via Longa) e conservação (Via Curta) do Ácido Docosa-Hexaenóico nos fotorreceptores. R=Processo mediado por Receptor.
Fonte: SANGIOVANNI E CHEW, 2005.

Diversos estudos indicam que os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa ω -3 (ω -3 LCPUFAs) compreendem um conjunto de substâncias com potencial antioxidante para a retina e sistema nervoso central, sendo o DHA o mais importante (GORDON e BAZAN, 1997; MUKHERJEE et al., 2004). Segundo Kris-Etherton et al. (2000), o consumo médio de ω -3 LCPUFAs é de 1.6g por dia, geralmente na forma de α -LLNA. O EPA e DHA compreendem cerca de 6 a 12% deste valor. As principais fontes alimentares de α -LLNA são os óleos vegetais como o óleo de canola, linhaça e soja. Já o EPA e DHA têm como maiores fontes ovos, peixes e mamíferos marinhos (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

Devido ao EPA e DHA estarem em suas maiores concentrações em uma variedade limitada de alimentos de origem marinha, a ingestão destes nutrientes pode ser um fator modificador em dietas para a redução de riscos de desenvolvimento de degenerações retinianas e outras doenças. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um consumo médio diário de cerca de 0,3 a 0,5g de EPA + DHA. Além disso, órgãos governamentais norte-americanos alertam que uma ingestão acima de 3g por dia de ω -3 LCPUFAs, pode aumentar o risco de hemorragias (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

O DHA é o principal de ω -3 LCPUFA constituinte dos fosfolipídios de membrana dos fotorreceptores. Segundo Sangiovanni e Chew (2005), a maior concentração corporal de DHA por unidade de área (cerca de 30% do total de ácidos

graxos da retina) é nos discos de membrana dos fotorreceptores. A composição lipídica dos segmentos externos dos fotorreceptores é peculiar, pelo fato de que cerca de 90% são glicerofosfolipídios e 10% são lipídios neutros, como o colesterol. Uma outra característica dos discos de membrana é a composição de seus fosfolipídios. Um fosfolipídio é constituído de uma porção polar (grupo fosfato) e duas apolares (ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol). Os fosfolipídios da retina são únicos porque são constituídos de duas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados. Estes são assim denominados fosfolipídios polienóicos. Os tipos de fosfolipídios encontrados na retina são Fosfatidil-Etanolamina, Fosfatidil-Serina (12%), Fosfatidil-Colina e Fosfatidil-Inositol. O DHA constitui cerca de 50% dos fosfolipídios de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

A constituição lipídica peculiar dos fotorreceptores indica que a grande quantidade de DHA possui uma significância funcional para estas células. Atualmente sabe-se que as propriedades bioquímicas e biofísicas do DHA afetam a função da membrana, alterando sua fluidez, permeabilidade, espessura e ativação de proteínas ligadas à membrana. As propriedades bioquímicas do DHA também podem explicar sua grande concentração na retina. Os ácidos graxos constituintes dos fosfolipídios de membrana servem como precursores de moléculas de sinalização que modulam a comunicação intracelular e modulam sinais autócrinos da membrana plasmática. Estes processos também influenciam o controle nuclear da expressão de determinados genes (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

Diversos estudos foram realizados para elucidar o papel do DHA na retina saudável e em processos degenerativos. Sua ação antioxidante influencia, direta ou indiretamente, diferentes aspectos dos processos degenerativos, como a fluidez da membrana, redução da concentração de substâncias oxidantes, modulação da excitabilidade neuronal, liberação de fatores anti-apoptóticos e a migração de micróglia (SANGIOVANNI e CHEW, 2005).

Em estudos com privação de DHA na alimentação de ratos, foi observada redução da fluidez das membranas dos segmentos externos dos fotorreceptores (BOESZE-BATTAGLIA et al., 2008; WEISINGER et al., 2002). Esta redução da fluidez influencia na velocidade da fototransdução da rodopsina, bem como em sua regeneração, levando a uma diminuição da sensibilidade dos fotorreceptores à luz (WEISINGER et al., 2002). Além disso, a baixa concentração de DHA na retina

reduz a taxa de adesão de moléculas intermediárias no processo de fototransdução, como a proteína G, influenciando negativamente na transmissão do impulso nervoso às células bipolares. Estes resultados sugerem que os déficits visuais observados na deficiência de LCPUFAs podem resultar da baixa eficiência nas vias de fototransdução e ciclo visual da rodopsina (LITMAN, et al., 2001).

Ebert et al. (2009), avaliaram o efeito do DHA sobre a ativação de micróglia tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Em seu estudo, observaram que a suplementação do meio de cultivo com DHA inibiu a ativação e migração de micróglia. Na retina dos animais, foi possível observar que os animais que receberam uma dieta rica em DHA apresentaram sinais de neuroproteção, bem como as micróglia ativadas foram convertidas em um fenótipo quiescente. Em estudo com injeção intravítrea de um aminoácido excitatório, Mizota et al. (2001) suplementaram ratos com 1000mg/Kg por dia de DHA e observaram que houve uma neuroproteção dos fotorreceptores, indicando que a suplementação do ácido graxo pode ter um papel na modulação da excitabilidade neuronal e na inibição da cascata de apoptose. Em estudo semelhante, Moriguchi et al. (2003), induziram a degeneração retiniana pela injeção intravítrea de uma substância oxidante que lesa diretamente fotorreceptores. Estes autores observaram que nos animais que receberam uma dieta rica em DHA houve uma diminuição do número de células em apoptose, sugerindo que este ácido graxo pode ter um papel na proteção dos fotorreceptores reduzindo os níveis de radicais livres na retina. German et al. (2006), em estudo com cultivo celular de fotorreceptores de ratos, observaram que a suplementação do meio com DHA inibiu a apoptose por meio da ativação de fatores anti-apoptóticos.

Apesar de diversos estudos indicarem uma ação direta do DHA como neuroprotetor, outras pesquisas sugerem que o ácido graxo serve como precursor de outra substância de potencial efeito neuroprotetor, denominada NPD1, Neuroprotectina D1 (BAZAN, 2006). Segundo Mukherjee et al. (2004), a NPD1 se contrapõe a fatores pró-inflamatórios que são gerados no estresse oxidativo, como radicais peróxidos e Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e também atuou aumentando a concentração de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XI.

Estudos clínicos em humanos envolvendo dietas ricas em LCPUFAs foram procedidos. Estes trabalhos sugerem que a ingestão de DHA e outros LCPUFAs pode estar relacionada positivamente com a atenuação e até regressão de sinais clínicos de degenerações retinianas como DMAI e RP (HUNT, 2007; SANGIOVANNI

et al., 2007; BERSON et al., 2004a; BERSON et al., 2004b; SANGIOVANNI et al., 2008)

Apesar de diversos estudos indicarem que o DHA possui características neuroprotetoras para a retina, outros trabalhos sugerem que este ácido graxo pode ter efeitos deletérios sobre fotorreceptores. Aguirre et al. (1997), observaram que a dieta rica em ω -3 LCPUFAs não teve influência no processo degenerativo de cães com um tipo de Atrofia Progressiva de Retina (APR) denominada Degeneração Progressiva de Cones e Bastonetes (PCRD).

Tanito et al. (2009), em estudo com camundongos transgênicos portadores do gene *fat-1*, responsável pela codificação de uma desaturase que converte ácidos graxos ω -6 em ω -3, observaram que animais com dieta rica em ω -6 apresentavam altos níveis de ω -3 incorporados nos fosfolípidios de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores e após exposição à luz, os camundongos sofreram degeneração retiniana. Os autores sugerem que isto se deve ao fato de que a retina é susceptível ao estresse foto-oxidativo e o excesso de ω -3 leva à peroxidação lipídica, agravando o quadro.

Suh et al. (2009), utilizando o modelo animal anteriormente citado, forneceu aos animais uma dieta rica em ω -6, observaram um aumento na amplitude do traçado eletrorretinográfico, acreditando que isto se deve ao aumento da fluidez de membrana nos segmentos externos de fotorreceptores. No mesmo estudo foram encontrados indicadores de estresse oxidativo, como a superexpressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) pelas células de Müller, bem como altos níveis de compostos resultantes da peroxidação lipídica. Song et al. (2000) observaram que ratos que ingeriram uma dieta rica em ω -3 LCPUFAs, tiveram altas concentrações de lipídios oxidados, principalmente DHA, em diversos tecidos como sangue, fígado e rins. Os autores indicam que a alta concentração de lipídios oxidados aumenta a probabilidade de ocorrer novas peroxidações lipídicas e reduzir a ação de substâncias antioxidantes teciduais.

Além da peroxidação lipídica, a oxidação do DHA por radicais livres pode levar à formação de uma substância denominada Carboxi-etil-pirrole (CEP), uma lipoproteína presente nos segmentos externos dos fotorreceptores e no EPR. Gu et al. (2003) observaram altas concentrações de CEP na retina de pacientes com Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI). Estes autores sugerem que o CEP é imunogênico, agravando o processo degenerativo.

Diante de diversos estudos conflitantes sobre a atuação dos ω -3 LCPUFAs, principalmente o DHA, na retina de mamíferos, faz-se necessário desenvolver modelos experimentais que permitam observar a ação destes ácidos graxos sobre a retina de animais em diferentes condições de iluminação e estresse oxidativo, para que sejam determinados níveis ou dosagens seguras para a ingestão destes agentes antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G. D. et al. Diets Enriched in Docosahexaenoic Acid Fail to Correct Progressive Rod-Cone Degeneration (prcd) Phenotype. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 38, n. 11, p. 2387-2407, 1997.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes médicas, 1997. p. 721-785.
- ANGAYARKANNI, N. et al. Ratio of the vitreous vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor in Eales disease. **Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics**, EUA, v. 2, p. 20-28, 2009.
- BACCUS, S. A. Timing and computation in inner retinal circuitry. **Annual Review of Physiology**, EUA, v. 69, p. 271-290, 2007.
- BAZAN, N. G. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. **TRENDS in Neuroscience**, [S.l.], v. 29, n.5, p. 263-271, 2006.
- BAZAN, N. G. Supply of n-3 polyunsaturated fatty acids and their significance in the central nervous system. In: Wurtnam R.J.; Wurtnam, J.J.(Ed.), **Nutrition and the Brain**. New York: Raven Press, 1990. v. 8, p. 1-24.
- BEATTY, S. et al. Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 42, p. 439-446, 2001.
- BELTRAN, W. A. The use of canine models of inherited retinal degeneration to test novel therapeutical approaches. **Veterinary Ophthalmology**, EUA, v. 12, n. 3, p. 192-204, 2009.
- BERSON, E. L. et al. Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 122, n. 9, p. 1297-1305, 2004a.
- BERSON, E. L. et al. Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 122, n. 9, p. 1306-1314, 2004b.
- BHARTI, K.; MILLER, S.S.; ARNHEITER, H. The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, EUA, v.24, p.21-34, 2010.
- BHUTTO, I et al. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. **Experimental Eye Research**, EUA, v. 82, p. 99-110, 2006.

BOESZE-BATTAGLIA, K. et al. Alteration of retinal rod outer segment membrane fluidity in a rat model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. **The Journal of Lipid Research**, EUA, v. 49, n. 7, p.1488-1499, 2008.

BRINGMANN, A. et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Brain Research**, EUA, v. 25, p. 397-424, 2006.

BUCH, H. et al. 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. **Ophthalmology**, EUA, v. 112, p. 787-798, 2005.

CAI, X.; CONLEY, S. M.; NAASH, M. I. RPE65: Role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. **Ophthalmic Genetics**, EUA, v. 30, n. 2, p. 1-9, 2009.

CHIA, R. et al. The origins and uses of mouse outbred stocks. **Nature Genetics**, EUA, v. 37, n. 11, p. 1181-1186, 2005.

CHUCAIR, A. J. et al. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 48, n. 11, p. 5168-5177, 2007.

CIDECIYAN, A. V. et al. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, EUA, v. 102, p. 5233-8, 2005.

CINGOLANI, C. et al. Retinal degeneration from oxidative damage. **Free Radical & Biology Medicine**, EUA, v. 40, p. 660-669, 2006.

COLEMAN, H. R. et al. Age-Related Macular Degeneration. **Lancet**, Inglaterra, v. 372, p. 1835-1845, 2008.

COSTA, B. L. S. A. et al. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates light-induced photoreceptor damage. **Brain Research Bulletin**, EUA, v. 76, p. 412-423, 2008.

D'CRUZ, P. M. et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MERTK in the retinal dystrophic RCS rat. **Human Molecular Genetics**, Inglaterra, v. 9, n. 4, p. 645-651, 2000.

DEEG, C. A. et al. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor on uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. **Proteomics**, Alemanha, v. 7, p. 1540-1548, 2007.

DING, X.; PATEL, M.; CHAN, C. C. Molecular pathology of age-related macular degeneration. **Progress in Retinal and Eye Research**, Inglaterra, v. 28, p. 1-18, 2009.

EBERT, S. et al. Docosahexaenoic acid attenuates microglia activation and delays early retinal degeneration. **Journal of Neurochemistry**, Inglaterra, v. 110, p. 1863-1875, 2009.

GAL, A. et al. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene cause retinitis pigmentosa. **Nature Genetics**, EUA, v. 26, n. 3, p. 270-271, 2000.

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

GERMAN, O. L. et al. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. **Journal of Neurochemistry**, Inglaterra, v. 98, n. 5, p. 1507-1520, 2006.

GORDON, W. C.; BAZAN, N. G. Enzymes. In: HARDING, J. J. **Biochemistry of the Eye**. London: Chapman and Hall, 1997. Cap. 2, p. 144-275.

GRIMM, C. et al. Blue light's effects on rhodopsin: Photoreversal of bleaching in living rats eyes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 41, n. 12, p. 3984-3990, 2000.

GU, X. et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. **The Journal of Biological Chemistry**, EUA, v. 278, p. 42027-42035, 2003.

HAFEZI, F. et al. The absence of *c-fos* prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration *in vivo*. **Nature Medicine**, EUA, v. 3, p. 346-349, 1997.

HARTONG, D. T.; BERSON, E. L.; DRYJA, T. P. Retinitis pigmentosa. **Lancet**, Inglaterra, v. 368, p. 1795-1809, 2006.

HECKENLIVELY, J. R.; RODRIGUEZ, J. A.; DAIGER, S. P. Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 109, p.84-91, 1991.

HUANG, Q. et al. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced ratio of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessels obliteration. **Experimental Eye Research**, EUA, v. 87, n. 3, p. 226-241, 2008.

HUBERMAN, A. D.; FELLER, M. B.; CHAPMAN, B. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. **Annual Review of Neuroscience**, EUA, v. 31, p. 479-509, 2008.

HUNT, S. Prävention von Retinopathien durch ω -3-Fettsäuren? **Ophthalmologe**, Alemanha, v.104, p. 727-729, 2007.

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

JOLY, S. et al. Resident Microglia and Bone Marrow Immigrants Remove Dead Photoreceptors in Retinal Lesions. **American Journal of Pathology**, EUA, v. 174, p. 2310–2323; 2009.

KANEKO, H. et al. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 49, n. 9, p. 4162-4168, 2008

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

KELLER, C. et al. Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 42, n. 2, p. 476-480, 2001.

KRIS-ETHERTON, P. M.; et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, EUA, v. 71, p. 179S-188S, 2000.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, EUA, v. 106, p. 2747-2757, 2002.

KUBOTA, S. et al. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. **American Journal of Pathology**, EUA, v. 177, n. 4, p.1725-1731, 2010.

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

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

LAVAIL, M. Legacy of the RCS rat: impact of a seminal study on retinal cell biology and retinal degenerative diseases. **Progress in Brain Research**, EUA, v. 131, Cap 44, p. 617-627, 2001.

LAVAIL, M. M.; GORRIN, G. M. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. **Experimental Eye Research**, EUA, v. 44, n. 6, p. 877-889, 1987.

LAVAIL, M. M. et al. Genetic regulation of light damage to photoreceptors. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 28, n. 7, p. 1043-1048, 1987.

- LI, F. et al. DHA does not protect ELOVL4 transgenic mice from retinal degeneration. **Molecular Vision**, EUA, v. 13, n. 15, p. 1185-1193, 2009.
- LITMAN, B. J. et al. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. **The Journal of Molecular Neuroscience**, EUA, v. 16, n. 2/3, p. 237-242, 2001.
- MANDAL, M. D. N. A. et al. Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, EUA, v. 46, p. 672-679, 2009.
- MARGRAIN, T. H. et al. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? **Progress in Retinal and Eye Research**, Inglaterra, v. 23, p. 523-531, 2004.
- MATSUOKA, M. et al. Expression of Pigment Epithelium-Derived Factor and Vascular Endothelial Growth Factor in Fibrovascular Membranes from Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. **The Japanese Journal of Ophthalmology**, Japão, v. 50, p. 116-120, 2006.
- MIßFELDT, M. **Kunst, Malerei und Gemälde: Künstler-Galerie mit vielen Bildern**. Alemanha, 1993. Disponível em: <<http://www.martin-missfeldt.de/kunst-bilder/wahrnehmung-sehen/rhodopsin-auge-licht.php>>. Acesso em: 10 jan. 2011. Figura modificada pelo autor.
- MIZOTA, A. et al. Protective effects of dietary docosahexaenoic acid against kainate-induced retinal degeneration in rats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 42, n. 1, p. 216-221, 2001.
- MOLDAY, R. S. Photoreceptor Outer Segment Proteins, Phototransduction and Retinal Degenerative Diseases: The Friedenwald Lecture. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 39, p. 2493-2509, 1998.
- MORIGUCHI, K. et al. Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. **Experimental Eye Research**, EUA, v. 77, n. 2, p. 167-176, 2003.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, EUA, v. 101, n. 22, p.8491-8496, 2004.
- NAASH, M. L. et al. Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing mutant rhodopsin. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 37, p. 775-782, 1996.
- NARFSTRÖM, K.; PETERSEN-JONES, S. Diseases of the Canine Ocular Fundus. In: GELATT, K. N. **Veterinary Ophthalmology**. EUA. Blackwell, 2008. Cap. 21, p. 944-1125.

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

ORGANISCIAK, D. T. et al. Susceptibility to retinal light damage in transgenic rats with rhodopsin mutations. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 44, p. 486-492, 2003.

ORGANISCIAK, D. T. et al. Photoreceptor cell damage by light in young Royal College of Surgeons rats. **Current Eye Research**, Inglaterra, v. 19, n. 2, p. 188-196, 1999.

PREISING, M. N.; HEEGARD, S. Recent advances in early-onset severe retinal degeneration: more than just basic research. **TRENDS in Molecular Medicine**, Inglaterra, v. 10, n. 2, p. 51-54, 2004.

PURVES, D. et al. **Neuroscience**. 2. ed. EUA: [s.n.], 2001. Disponível em <<http://openwetware.org/wiki/BIO254:Phototransduction>>. Acesso em: 10 jan. 2011. Figura modificada pelo autor.

RAVIOLA, G.; FREDDO, T. F. A simple staining method for blood vessels in flat preparations of ocular tissues. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 19, n. 12, p. 1518–1521, 1980.

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

REMÉ, C. E. et al. Apoptosis in the retina: The silent death of vision. **News in physiological sciences**, EUA, v. 15, p. 120-125, 2000.

REMÉ, C. E. et al. Why study rod cell death in retinal degenerations and how? **Documenta Ophthalmologica**, Noruega, v. 106, p. 25–29, 2003.

SANGIOVANNI, J. P. et al. The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS report no. 23. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 126, n. 9, p. 1274-1279, 2008.

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

SANGIOVANNI, J. P. et al. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 125, n. 5, p. 671-679, 2007.

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

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

SENSE organs-eyes. EUA. Disponível em: <<http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/nervous-coordination/sense-organs-eyes.php>>. Acesso em: 10 jan. 2011. Figura modificada pelo autor.

SONG, J. H.; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. **The Journal of Nutrition**, EUA, v. 130, p. 3028-3033, 2000.

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

SUH, M. et al. Supranormal electroretinogram in fat-1 mice with retinas enriched in docosahexaenoic acid and n-3 very long chain fatty acids (C24-C36). **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 50, n. 9, p. 4394-4401, 2009.

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

TANITO, M. et al. High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. **The Journal of Lipids Research**, EUA, v. 50, n. 5, p. 807-819, 2009.

TAYLOR, H. R. et al. Visible light and risk of age-related macular degeneration. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, EUA, v. 122, p. 750-7, 1990.

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

THOMPSON, D. A. et al. Genetics and Phenotypes of *RPE65* Mutations in Inherited Retinal Degeneration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, EUA, v. 41, n. 13, p. 4293-4299, 2000.

TOMANY, S. C. et al. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. **Archives of Ophthalmology**, EUA, v. 122, p. 750-757, 2004.

VAUGHAN, D. K. et al. Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. **Photochemistry and Photobiology**, EUA, v. 75, p. 547-553, 2002.

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

WEISINGER, H. S. et al. Retinal sensitivity loss in third-generation n-3 PUFA-deficient rats. **Lipids**, EUA, v. 37, n. 8, p. 759-765, 2002.

WHIKEHART, D. R. **Biochemistry of the Eye**. EUA: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 131-147.

XU, H. et al. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. **Glia**, EUA, v. 55, n. 11, p.1189-1198, 2007.

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

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

CAPÍTULO II

Artigo científico enviado à revista “Molecular Vision”

Título

Efeito dual da dieta rica em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) na degeneração retiniana luz-induzida em camundongos

Bruno Oliveira Ferreira de Souza¹, Fabrício Bezerra de Sá¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor para correspondência: Fabrício Bezerra de Sá, e-mail: crleucas@yahoo.com

Resumo

Objetivo: O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação dietética com ω -3 LCPUFAs em camundongos albinos (SWISS) submetidos à exposição à luz de média intensidade.

Métodos: Os animais foram suplementados com dieta rica em ω -3 LCPUFAs e expostos à luz branca (3000LUX) por 12 horas, e em seguida avaliados nos períodos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição. Camundongos alimentados com ração comercial serviram como controle. Os grupos foram avaliados quanto a morfologia da retina, espessura da camada nuclear externa, número de células do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR), presença e ativação de micróglia, imunolocalização de PEDF, presença de células em apoptose e neovascularizações.

Resultados: Logo após a foto-exposição, os animais suplementados com a dieta rica em ω -3 LCPUFAs apresentaram atenuações em lesões do EPR e segmentos dos fotorreceptores, na ativação e migração de micróglia e um reduzido número de células em apoptose em relação aos animais suplementados com a dieta controle. Entretanto, nos períodos subsequentes, os grupos suplementados apresentaram lesões equivalentes ou até mais acentuadas em relação aos grupos alimentados com dieta controle.

Conclusões: A alimentação de camundongos submetidos à foto-exposição de média intensidade, com uma dieta rica em ω -3 LCPUFAs promoveu a proteção de fotorreceptores e EPR imediatamente após a exposição à luz, e em seguida, atuou como agente pró-inflamatório. Portanto, a dieta rica em ω -3 LCPUFAs possui um efeito dual sobre a retina, exercendo uma neuroproteção inicial e, em seguida, atuando de maneira nociva.

Palavras-chave: degeneração luz-induzida, ácido docosa-hexaenóico, estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

As degenerações retinianas são as maiores causas de cegueira no mundo em seres humanos e animais [1,2]. Apresentam, em sua maioria, caráter congênito e hereditário, com mais de 100 genes implicados em sua patogenia [3-5]. Entre as degenerações retinianas, a Degeneração Macular Associada à Idade (DMAI) é a causa mais comum de déficit visual em indivíduos idosos em países desenvolvidos [6]. É uma doença de causas multifatoriais que envolve fatores de risco ambientais relacionados com lesões oxidativas, por exemplo, o tabagismo, dieta e exposição à luz durante a vida [7-12].

O excesso de luz visível pode induzir lesões em fotorreceptores e células do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR) pelo processo denominado degeneração luz-induzida [13]. A alta intensidade de luz causa a fototransdução da rodopsina num curto período de tempo, que induz a formação de grandes quantidades de radicais livres nos fotorreceptores e na matriz intercelular. As células do EPR fagocitam os discos de membrana dos fotorreceptores contendo substâncias citotóxicas como proteínas e lipídios danificados. O estresse oxidativo resultante induz a apoptose de fotorreceptores, reconhecida como o processo de morte celular comum em muitas degenerações retinianas em seres humanos [14,15]. Portanto, a foto-exposição de animais de laboratórios, como camundongos e ratos, serve para o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo dos mecanismos celulares da degeneração luz-induzida, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas [16].

Diversos estudos demonstram que os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa ω -3 (ω -3 LCPUFAs) compreendem um conjunto de substâncias com potencial antioxidante para a retina e sistema nervoso central [17,18]. Além disso, existe uma correlação positiva entre a ingestão de ω -3 LCPUFAs e a atenuação de sinais clínicos da DMAI [19-23]. O Ácido Docosa-hexaenóico (DHA) é o principal constituinte dos ω -3 LCPUFAs, e é encontrado em grande quantidade nos discos de membrana dos segmentos externos dos fotorreceptores [24]. Um número de estudos in vitro e in vivo demonstraram que o DHA pode exercer ações neuroprotetoras na retina. Em modelos de estresse oxidativo, a suplementação de DHA atuou inibindo a

apoptose de fotorreceptores e reduzindo níveis de fatores pró-apoptóticos [25,26] e ativando fatores anti-apoptóticos [27]. Além disso, a dieta rica em DHA inibiu a ativação e migração de micróglia em retinas submetidas a estresse oxidativo [28]. Estudos recentes demonstram que o DHA serve como substrato para a formação de um docosatrieno denominado Neuroprotectina D1, que reduz a quantidade de radicais peróxidos, fatores pró-inflamatórios e aumenta a concentração de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XI [18,29]. Apesar disso, estudos recentes demonstram que o excesso de DHA contribui para o aumento do estresse oxidativo no tecido retiniano. Devido ao tamanho de sua molécula e ao número de insaturações, o DHA é susceptível à oxidação. A alta concentração de lipídios oxidados aumenta a probabilidade de ocorrer novas peroxidações lipídicas e reduzir a ação de substâncias antioxidantes teciduais [30,31]. A oxidação do DHA por radicais livres pode levar à formação de uma lipoproteína denominada Carboxi-etil-pirrole (CEP), reconhecida como um agente imunogênico na patogenia da DMAI [32].

O propósito do presente estudo foi avaliar o efeito da dieta rica em ω -3 LCPUFA em camundongos albinos (SWISS) submetidos à degeneração luz-induzida em diferentes períodos após a foto-exposição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (SWISS) machos com 45 dias de idade provenientes do Biotério do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura em Recife-PE, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade controladas sob regime de iluminação cíclica (12h escuro, 12h claro) com intensidade de luz \leq 100LUX, em nossa instituição. Todos os experimentos animais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE, Processo n. 2010/3894568) e com o Estatuto para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e Visão da ARVO.

2.2 DIETAS

A dieta rica em ω -3 LCPUFA foi preparada pela incorporação de um extrato purificado de óleo de peixe comercial (Omega-3 DHA 500, Naturalis®) em ração comercial para camundongos (Labina, Purina®). Cada 1000mg do óleo purificado contém 500mg de DHA, 100mg de Ácido Eicosapentaenóico (EPA) e 2mg de Vitamina E. A incorporação dos ω -3 LCPUFA foi procedida pulverizando a ração reduzida à pó, com o óleo dissolvido em Etanol a 99,5%GL. Em seguida, a ração foi repeletizada, seca em estufa de ventilação forçada a 55°C, selada em sacos plásticos e estocadas a 4°C ao abrigo da luz. A quantidade de óleo de peixe ingerida pelos animais foi calculada tomando por base a dosagem de 1000mg de DHA/Kg de peso por dia [25]. A ração suplementada com ω -3 LCPUFA foi oferecida aos animais uma semana antes da exposição à luz e continuou durante todo o experimento. Os grupos receberam diariamente cerca de 5g de ração/animal. A ração comercial para camundongos (Labina, Purina®) foi usada como dieta controle.

2.3 EXPOSIÇÃO À LUZ

Os animais foram submetidos a 3000 LUX de luz branca durante 12 horas, iniciando-se às 6:00 em uma câmara de foto-exposição, dotada de duas lâmpadas fluorescentes de 40W com paredes internas brancas, sistema de ventilação para a manutenção da temperatura a 23°C. Antes da foto-exposição os animais foram adaptados ao escuro por 24 horas. Imediatamente após as 12 horas de exposição os animais voltaram ao ambiente de luz de baixa intensidade.

2.4 AMOSTRAGEM DO TECIDO OCULAR

Os animais submetidos à foto-exposição foram divididos em dois grupos, com dieta rica em ω -3 LCPUFA, e dieta controle. Os grupos foram analisados em períodos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição (n= 6 a cada período). Um grupo de animais não submetidos à foto-exposição (n= 6) foi utilizado como controle.

Os camundongos foram profundamente anestesiados com Quetamina (100mg/Kg- Vetenarcol®) e Xilazina (20mg/Kg-Rompun®) e submetidos à eutanásia com uma sobre dose de pentobarbital sódico aplicados por via intraperitoneal. Em seguida foram procedidas toracotomia e perfusão através do ventrículo esquerdo com solução de Cloreto de Sódio a 0,9%, e em seguida com Paraformaldeído a 4% em Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,4). Após a enucleação os olhos foram imersos no mesmo fixador por 48h a 4°C e embebidos em Paraplast (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich). Foram feitos cortes de 5µm de espessura para processamento histológico. Este procedimento foi realizado nas análises subseqüentes, exceto quando indicado.

2.5 MORFOLOGIA E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA DEGENERAÇÃO RETINIANA

Cortes da região central do globo ocular paralelo ao disco óptico foram corados com Hematoxilina e Eosina para observação em microscópio de luz (Olympus BX-41®) e captura de imagem com câmera fotográfica (Canon Powershot A470) acoplada à lente ocular do aparelho. Foram feitos ajustes de cor, brilho e contrastes nas imagens obtidas e posterior análise morfométrica com o programa computacional ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Quanto à morfologia, foram analisados principalmente os fotorreceptores, células do EPR e a integridade da barreira hematorretiniana.

Para a análise morfométrica, a retina foi dividida em região superior e inferior ao disco óptico. Foram feitas medidas da espessura da Camada Nuclear Externa (CNE) e a contagem do número de núcleo de células do EPR a cada 200µm a partir do disco óptico

2.6 PROCEDIMENTO TUNEL (TDT-MEDIATED DUTP NICK-END LABELING)

Após serem desparafinados e re-hidratados, os cortes foram submetidos ao procedimento TUNEL usando o Kit Apoptag® Plus Peroxidase *in situ* (Chemicon, Temecula, CA) segundo protocolo do fabricante. Em resumo, os cortes foram imersos em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em Tampão Fosfato Salino (PBS 0.01M, pH 7,4) por 15 minutos e incubados em uma solução contendo deoxinucleotidil transferase (TdT), e nucleotídeos, por 60 minutos a 37°C. Depois

disso, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à peroxidase de rábano. O sinal foi desenvolvido usando o substrato de peroxidase 3-3´Diamonibenzidina (DAB). Em seguida, os cortes foram contra-corados com eosina, desidratados em bateria crescente de etanol e montados em meio Entellan®.

2.7 HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes foram desparafinados e re-hidratados. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em PBS. Para as reações de imuno-histoquímica, os sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados com Albumina Sérica Bovina a 5% em PBS. Os cortes foram em seguida, incubados “overnight” a 4°C com isolectina GS-IB₄ de *Griffonia simplicifolia* biotina-XX conjugada (1:20 Invitrogen) e anti-PEDF policlonal de coelho (1:50, Santa Cruz Biotechnology). A marcação dos anticorpos primários foi feita com o anticorpo secundário anti-coelho policlonal de cabra biotinilado. Os cortes foram desenvolvidos usando peroxidase de rábano conjugada à avidina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) com DAB como substrato. Os cortes foram contra-corados com Azul de Toluidina e Hematoxilina, respectivamente, desidratados e montados em meio Entellan®.

2.8 INJEÇÃO DE PEROXIDASE DE RÁBANO (HRP) E MONTAGEM GLOBAL DA RETINA

Os camundongos foram anestesiados e receberam uma injeção de 0,3mL de solução salina contendo Peroxidase de Rábano Tipo I (Sigma Aldrich) na veia cava caudal. Após quinze minutos, os animais receberam uma sobre dose de pentobarbital sódico e os olhos foram enucleados. Para a preparação da montagem global da retina, os globos oculares foram fixados em Paraformaldeído a 4% em Tampão Fosfato a 0,1M (pH 7,4) durante 1 hora. As retinas foram dissecadas em modelo de montagem global mediante a realização de quatro cortes radiais, sendo um em cada pólo (superior, inferior, nasal e temporal). Posteriormente imersas na solução fixadora durante uma hora à temperatura ambiente, lavadas em PBS e processadas para a revelação da peroxidase segundo protocolo modificado de Hanker-Yates [33]. As retinas foram montadas em meio aquoso (solução 1:1 de

glicerol e tampão carbonato, pH 9, contendo 0,04% de p-fenilenodiamina) para visualização em microscópio de luz.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos em médias e erro padrão da média. Os valores foram processados para análise estatística usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis independentes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

As lesões retinianas variaram em número e intensidade nos grupos e períodos avaliados. De maneira geral, as alterações localizaram-se no EPR, segmentos externos e internos dos fotorreceptores e na CNE, sendo mais severas na retina superior entre 200 a 1000 μ m a partir do disco óptico. As regiões periféricas da retina, correspondentes à *ora serrata*, se mantiveram intactas em todos os grupos.

3.1 MORFOLOGIA

Os animais do grupo controle, avaliados imediatamente após a exposição à luz, apresentaram vacuolizações intracitoplasmáticas nas células do EPR e na matriz intercelular dos segmentos externos dos fotorreceptores, além de uma desorganização dos segmentos internos. O grupo que recebeu a dieta rica em ω -3 LCPUFAs apresentou lesões mais atenuadas no EPR e segmentos externos dos fotorreceptores, e os segmentos internos se mantiveram intactos (Figura 1 A e B).

Nos períodos subseqüentes, não houve diferenças evidentes entre os grupos controle e suplementados. Os achados evoluíram gradativamente, partindo de lesões focais com perdas de células, picnose nuclear, até uma total redução da CNE e segmentos, observada em alguns animais (Figura 1C). Nos animais cuja degeneração foi mais acentuada, foram observados aglomerados de debris

nucleares de coloração escura presentes na CNE (Figura 1D). As alterações celulares encontradas no EPR variaram de hipertrofia celular, sugestivo de degeneração hidrópica, até áreas com total redução do número destas células. Nestas áreas, ocorreu a perda da integridade da membrana de Bruch, caracterizada pela formação de aderências do tecido coroidal ao EPR (Figura 1C).

3.2 ESPESSURA DA CNE E QUANTIDADE DE CÉLULAS DO EPR

Imediatamente após a exposição à luz, não houve diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, nos períodos subsequentes, a espessura da CNE dos grupos suplementados com a dieta rica em ω -3 LCPUFAs foi similar ou menor que as medidas dos animais que receberam a dieta controle (Figura 2).

Na retina dorsal, logo após o término da exposição à luz, o grupo alimentado com a dieta controle teve uma menor quantidade de células do EPR que o grupo suplementado. Nos tempos seguintes, houve a redução do número de células dos dois grupos expostos. Após 90 dias da exposição, houve uma redução significativa do número de células do EPR do grupo suplementado em relação ao controle sem exposição (Figura 3). Na retina ventral, houve redução significativa do número de células do grupo suplementado em relação ao grupo com dieta controle somente 90 dias após a exposição à luz (Figura 3).

3.3 MIGRAÇÃO E ATIVAÇÃO DE MICRÓGLIAS

Foram encontradas micróglia ativadas nos segmentos dos fotorreceptores e espaço subretiniano nos grupos avaliados logo após a exposição à luz. O fenótipo destas células é caracterizado pela localização fora das camadas plexiformes da retina e a redução de seus processos citoplasmáticos. Nos animais que receberam a ração suplementada ocorreu uma resposta mais atenuada, com uma menor quantidade de células nos segmentos dos fotorreceptores e no espaço subretiniano (Figura 4).

Os animais do grupo de dieta controle apresentaram uma redução gradual do número de processos citoplasmáticos na CNE e nos segmentos dos fotorreceptores,

assim como o aumento proporcional de células com fenótipo quiescente, caracterizadas pela localização nas camadas plexiformes e por possuírem processos citoplasmáticos finos e alongados. Já os grupos suplementados com ω -3 LCPUFAs apresentaram maior quantidade de células ativadas e uma presença de maior número de células na CNE e segmentos dos fotorreceptores. Entretanto no período de 90 dias após a exposição, foi possível observar um aumento significativo no número de células ativadas, e a presença de grande quantidade de micróglia nos segmentos e CNE no grupo suplementado.

3.4 APOPTOSE DE FOTORRECEPTORES

O grupo de dieta controle apresentou, logo após a exposição à luz, uma grande quantidade de células em apoptose na CNE, com maior concentração na retina superior. O grupo tratado deste dia apresentou marcação significativamente menor do número de células em apoptose em relação ao controle (Figura 5). Dos períodos experimentais subseqüentes, ocorreu uma diminuição no número de células marcadas, não havendo diferenças entre os grupos.

3.5 IMUNOMARCAÇÃO DO PEDF

Foi observada a presença do PEDF em toda a espessura da retina e no interior do EPR, sendo mais evidente na Camada Plexiforme Externa (CPE), nos segmentos internos dos fotorreceptores e no citoplasma do EPR (Figura 6). Imediatamente após a exposição à luz, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Nos tempos subseqüentes à exposição à luz, ocorreu uma marcação mais evidente da retina dos animais suplementados, principalmente aos 90 dias (Figura 7).

3.6 VASOS SANGUÍNEOS DA RETINA

Entre os grupos experimentais, não foram observadas diferenças de calibre, quantidade ou trajeto dos vasos sanguíneos, assim como não foi possível distinguir áreas de neovascularização (Figura 8).

4 DISCUSSÃO

4.1 DEGENERAÇÃO INDUZIDA PELA LUZ

A fototoxicidade é um fenômeno bastante conhecido por provocar lesões nos tecidos oculares, especialmente a retina [34]. É bem caracterizado que os fotorreceptores e células do EPR de ratos [14] entram em apoptose, servindo como modelo para estudos sobre a DMAI.

As lesões produzidas pela luz na retina de mamíferos depende de diversos fatores como o comprimento de onda utilizado [35], tempo de exposição, prévia adaptação ao escuro [36], pigmentação dos olhos, espécie, linhagem e idade [37].

O modelo de degeneração empregado no nosso estudo (exposição à luz de média intensidade com adaptação prévia ao escuro) pode representar situações reais vivenciadas por seres humanos habitantes de regiões com grande incidência de luz, como os trópicos. Os resultados mostraram que foi eficiente para desencadear a apoptose de fotorreceptores e lesões intra e extracelulares do EPR, servindo de modelo para estudos posteriores para avaliação da eficácia de novas substâncias neuroprotetores e outros mecanismos que venham elucidar o processo de degeneração fototóxica.

Em comparação com outros estudos de fotodegeneração [34, 38], as lesões encontradas em nosso estudo presente nos fotorreceptores e EPR mostraram-se bem atenuadas. Além disso, não houve neovascularização em nenhum dos grupos estudados. Isto pode ser explicado pela escolha de um modelo de exposição à luz menos agressivo e pelo uso de uma linhagem de camundongo aparentemente

menos susceptível à degeneração fototóxica do que outras utilizadas, como o BALB/C. Wenzel et al. [39], compararam a susceptibilidade à degeneração induzida pela luz de três linhagens distintas de camundongos, BALB/C, B6CF1 e C57BL/6. Este estudo demonstrou que o B6CF1, uma linhagem resultante do cruzamento do BALB/C com o C57BL/6, obteve um fenótipo intermediário com relação à susceptibilidade à degeneração induzida pela luz. Isto pode estar relacionado com a diminuição da capacidade do EPR de regenerar a rodopsina e conseqüentemente a redução da taxa de fótons absorvidos pela retina. O camundongo SWISS é uma das linhagens de animais albinos com grande variabilidade genética [40], tendo possivelmente variações gênicas nos alelos do gene *RPE65*, responsável pela codificação da proteína do mesmo nome que participa no processo de regeneração da rodopsina.

4.2 EFEITOS DA DIETA RICA EM Ω -3 LCPUFAS

Nossos resultados podem ser divididos em dois momentos: imediatamente após a exposição à luz e nos períodos de 7 a 90 dias.

As lesões em fotorreceptores e EPR, na fase inicial pós-exposição, mostraram-se atenuadas no grupo suplementado com a dieta rica em ω -3 LCPUFAs, bem como o número de células do EPR foi semelhante ao observado no grupo controle sem exposição. Além disso, o reduzido número de fotorreceptores em apoptose indica um efeito neuroprotetor da dieta. Provavelmente, o DHA (principal componente do suplemento em nosso estudo) foi responsável por este efeito. Diversos estudos demonstraram a eficácia do uso do DHA na inibição do processo de apoptose dos fotorreceptores, por meio de diferentes mecanismos como a inibição de fatores pró-apoptóticos, como o BAX e Caspase 3, e pela síntese da NPD1, a qual modula a expressão de fatores de necrose e reduz a expressão de genes pró-inflamatórios e aumenta a concentração de fatores anti-apoptóticos. [18, 24, 25, 26, 27] Em nosso estudo, houve a ativação de menor número de micróglia nos animais suplementados avaliados imediatamente após a exposição à luz, assim como uma redução da migração de células para a CNE e segmentos, corroborando com o que foi observado por Ebert et al. [28].

Nos períodos de 7 a 90 dias após a exposição à luz, a suplementação dietética com ω -3 LCPUFAs mostrou-se ineficiente ou até prejudicial para a retina. Nossos achados indicam que as retinas dos animais suplementados apresentavam sinais de estresse oxidativo mais acentuados que os grupos que receberam a dieta controle. Estudos sugerem que o DHA associado a fosfolipídios aumenta a fluidez das membranas dos segmentos externos dos fotorreceptores, o que leva ao aumento da taxa de regeneração da rodopsina e conseqüente formação de substâncias tóxicas e radicais livres que aumentam o estresse oxidativo [41]. Apesar de estudos mostrarem que o estresse oxidativo oriundo do excesso de DHA na retina pode induzir a morte de fotorreceptores, a apoptose destas células não foi observada nos períodos de 7 a 90 dias [30,31,42]. A presença de grande quantidade de processos citoplasmáticos de micróglia nos segmentos externos dos fotorreceptores, a 90 dias pós-exposição à luz, indica que o excesso de DHA atuou como um agente pró-inflamatório nesta região.

Em estudos realizados com camundongos transgênicos portando o gene *fat-1* derivado do *C. elegans*, o qual codifica uma desaturase que converte ácidos graxos ω -6 em ω -3, Tanito et al. [30] concluíram que a alta concentração de DHA nos segmentos externos dos fotorreceptores favoreceu o aumento da peroxidação dos LCPUFAs, levando à elevação do estresse oxidativo e conseqüente aumento de células em apoptose. Além disso, [32] observaram que a peroxidação do DHA gera uma lipoproteína, denominada Carboxietil-pirrole (CEP), que tem ação oxidante e imunogênica sobre a retina.

Estudos têm demonstrado que o PEDF, além da sua potente ação anti-angiogênica, exerce funções neurotróficas e [43,44], e em conjunto com outros mitógenos, como o Fator de Crescimento do Fibroblasto 2 (FGF-2) e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), promove a proliferação de células progenitoras do hipocampo [45]. Em nossos resultados, o aparente aumento da expressão do PEDF nos animais suplementados, pode estar associado a uma resposta endógena ao estresse oxidativo, como uma tentativa de restabelecer a homeostase.

Nossos resultados demonstram, portanto, que o DHA possui um efeito dual sobre a retina. Acreditamos que novos estudos possam determinar o limiar de

concentração deste ácido graxo na retina, para que sejam estabelecidos níveis seguros para o uso desta substância em seres humanos e animais.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa REUNI pelo apoio financeiro.

Referências

1. Ofri R, Narfström K. Light at the end of the tunnel? Advances in understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. *The Veterinary Journal* 2007; 174:10-22.
2. Buch H, Nielsen NV, Vinding T, Jensen GB, Prause JU, La CM 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology* 2005; 112:787-798.
3. Preising MN, Heegard S. Recent advances in early-onset severe retinal degeneration: more than just basic research. *Trends Mol Med* 2004; 10(2):51-54.
4. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; 368:1795-1809.
5. Thompson DA et al. Genetics and Phenotypes of *RPE65* Mutations in Inherited Retinal Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 2000; 41(13):4293-4299.
6. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV. Age-related macular degeneration – emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Annals of Med* 2006; 38 (7):450-471.
7. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL III, Chew, EY. Age-Related Macular Degeneration. *Lancet* 2008; 372,:1835-1845.
8. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2008; 358:2606-2617.
9. Taylor HR, Munoz B, West S, Bressler NM, Bressler SB, Rosenthal FS. Visible light and risk of age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol* 1990; 122:750-7.
10. Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:523-31.
11. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein BE, Knudtson MD. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:750-7.
12. Villegas-Pérez MP, Salinas M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Bernal JM, Cánovas I, Aguilera ME, Vidal-Sanz M. Quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult rats and mice. *Ophthalmic Res* 2005; 37(S1):31-.

13. Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Iseli HP, Wenzel A. Why study rod cell death in retinal degenerations and how? *Documenta Ophthalmologica* 2003; 106:25–29.
14. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF, Aguzzi A, Remé C. The absence of *c-fos* prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration *in vivo*. *Nature Medicine* 1997; 3:346-349.
15. Cingolani C, Rogers B, Lu L, et al. Retinal degeneration from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:660-669.
16. Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Remé CE. Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci* 2001; 42(2):476-480.
17. Gordon WC, Bazan NG. Retina. In: Harding, JJ. *Biochemistry of the Eye*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1997. p.144-275.
18. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(22):8491-8496.
19. Hunt S. Prävention von Retinopathien durch ω -3-Fettsäuren? *Ophthalmologie* 2007; 104:727-729.
20. Sangiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Davis MD, Ferris FL, Gensler GR, Kurinij N, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Sperduto RD. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(5):671-679.
21. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-Difranco C, Moser A, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson CA, Anderson EJ, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ. Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Arch Ophthalmol* 2004a; 122(9):1297-1305.
22. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-Difranco C, Moser A, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson CA, Anderson EJ, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ. Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses. *Arch Ophthalmol* 2004b; 122(9):1306-1314.
23. Sangiovanni JP, Chew EY, Agrón E, Clemons TE, Ferris FL, Gensler G, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Klein R, Sperduto RD. The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS report no. 23. *Arch Ophthalmol* 2008; 126(9):1274-1279.
24. Sangiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Ret Eye Res* 2005; 24:87-138.
25. Mizota A, Sato E, Tani M, Adachi-Usami E, Nishikawa M. Protective effects of dietary docosahexaenoic acid against kainate-induced retinal degeneration in rats. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci* 2001; 42(1):216-221.
26. Moriguchi K, Yuri T, Yoshizawa K, Kiuchi K, Takada H, Inoue Y, Hada T, Matsumura M, Tsubura A. Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Experimental Eye Research* 2003; 77(2):167-176.

27. German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem* 2006; 98(5):1507-20.
28. Ebert S, Weigelt K, Walczak Y, Drobnik W, Mauerer R, Hume DA, Weber BHF, Langmann T. Docosahexaenoic acid attenuates microglia activation and delays early retinal degeneration. *Journal of Neurochemistry* 2009; 110:1863-1875.
29. Bazan NG. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *TRENDS in Neuroscience* 2006; 29(5):263-271.
30. Tanito M, Brush RS, Elliott MH, Wicker LD, Henry KR, Anderson RE. High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. *J Lipid Res* 2009; 50(5):807-819.
31. Suh M, Sauvé Y, Merrells KJ, Kang JX, Ma DW. Supranormal electroretinogram in fat-1 mice with retinas enriched in docosahexaenoic acid and n-3 very long chain fatty acids (C24-C36). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 2009; 50(9):4394-4401.
32. Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, Salomon RG. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2003; 278:42027-42035.
33. Raviola G, Freddo TF. A simple staining method for blood vessels in flat preparations of ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19(12):1518–1521.
34. Remé CE. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 2005; 46(8):2671-2682.
35. Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP. Apoptosis in the retina: The silent death of vision. *News Physiol. Sci* 2000; 15:120-125.
36. Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT. Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol* 2002, 75:547-553.
37. LaVail MM, Gorrin GM. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. *Experimental Eye Research* 1987; 44(6):877-889.
38. Kubota S, Kurihara T, Ebinuma M, Kubota, M, Yuki K, Sasaki M, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. 2010; 177(4):1725-1731.
39. Wenzel A, Grimm C, Remé CE. Molecular mechanisms of lightinduced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:275–306.
40. Chia R, Achilli F, Festing MFW, Fisher EMC. The origins and uses of mouse outbreed stocks. *Nat Genet* 2005; 37(11):181-1186.
41. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal Light Damage: Mechanisms and Protection. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010; 29:113-134.
42. Li F, Marchette LD, Brush RS, Elliott MH, Le YZ, Henry KA, Anderson AG, Zhao C, Sun X, Zhang K, Anderson RE. DHA does not protect ELOVL4 transgenic mice from retinal degeneration. *Mol Vis* 2009; 13(15):1185-1193.

43. Tobran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:628-636.
44. Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Gene transfer of PEDF attenuates ischemic brain damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Neurochem* 2008; 106:1841-1854.
45. Namba T et al. Pigment Epithelium-Derived Factor Up-regulation induced by memantine, an n-methyl-d-aspartate receptor antagonist, is involved in increased proliferation of hippocampal progenitor cells. *Neuroscience* 2010; 167:372-383.

APÊNDICE

Figuras

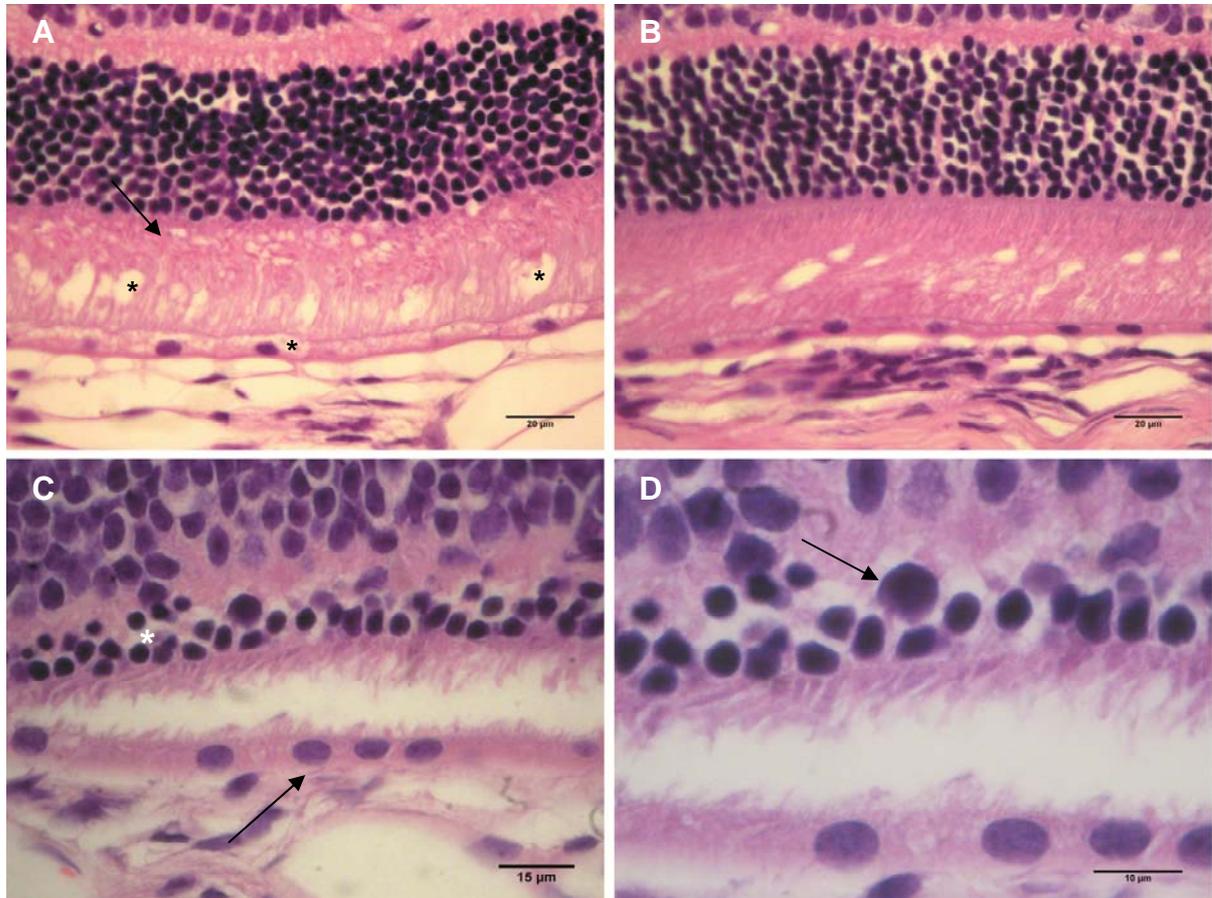


Figura 1. Fotomicrografia de luz da região externa de retinas avaliadas logo após a exposição à luz e a 60 dias após a fotoexposição. **A.** retina de animal alimentado com dieta controle apresentando desorganização dos segmentos internos dos fotorreceptores (seta), vacuolizações na matriz intercelular dos segmentos externos e intracitoplasmáticas no EPR (asteriscos). **B.** retina de animal suplementado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs, com segmentos internos intactos, e vacuolizações em menor número. **C.** retina de animal suplementado, 60 dias após exposição à luz evidenciando-se a redução da espessura da CNE (asterisco) e aderência do tecido coroidal ao EPR (seta). **D.** Maior aumento da fotomicrografia C, evidenciando-se debris nucleares na CNE (seta). Coloração em H.E. EPR: Epitélio Pigmentar da Retina, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3), CNE: Camada Nuclear Externa.

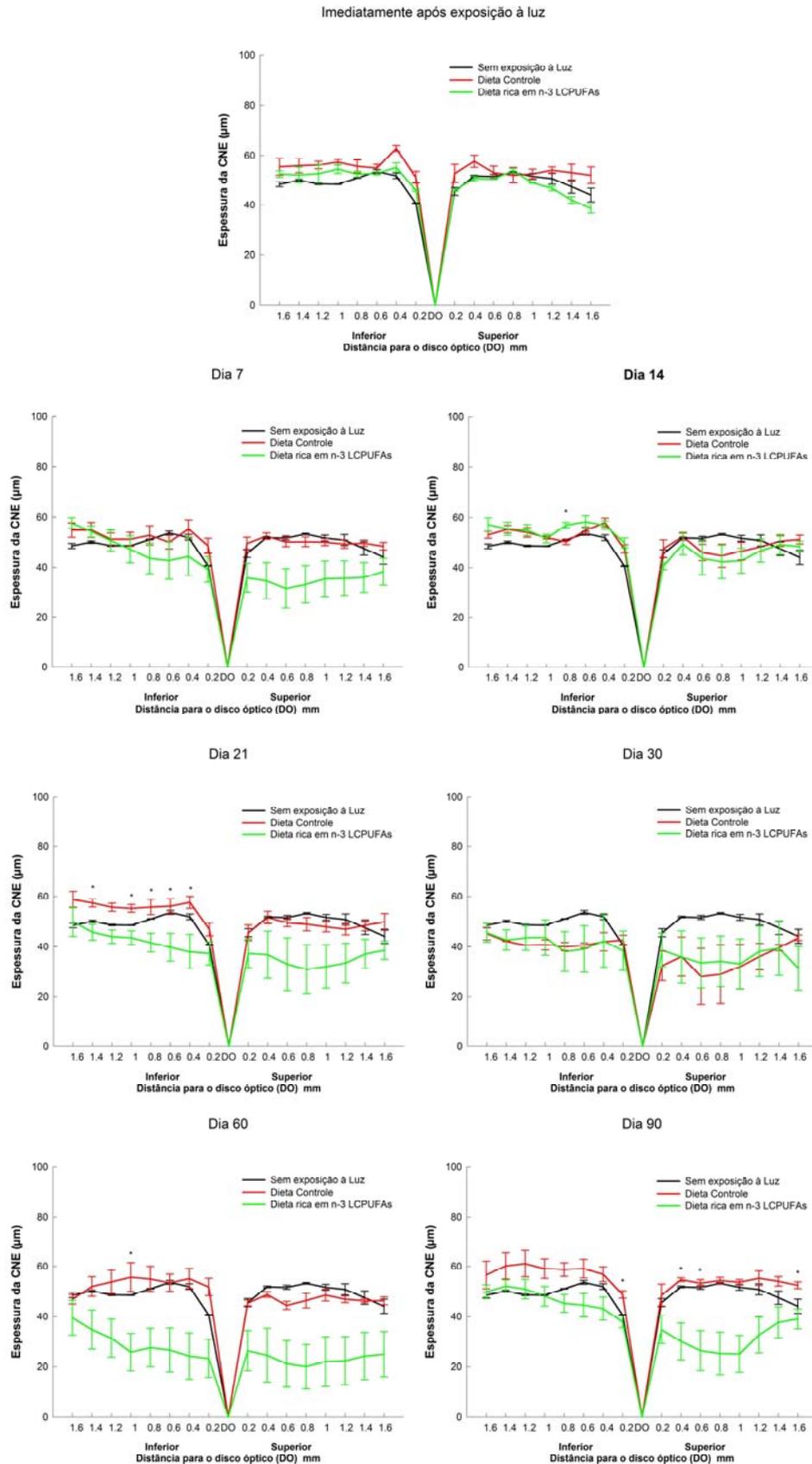


Figura 2. Comparação das espessuras da Camada Nuclear Externa entre o grupo controle sem exposição à luz, grupo alimentado com dieta controle e o suplementado com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) nos tempos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição à luz. * $P < 0.05$ entre os grupos de dieta controle e dieta rica em n-3 LCPUFAs.

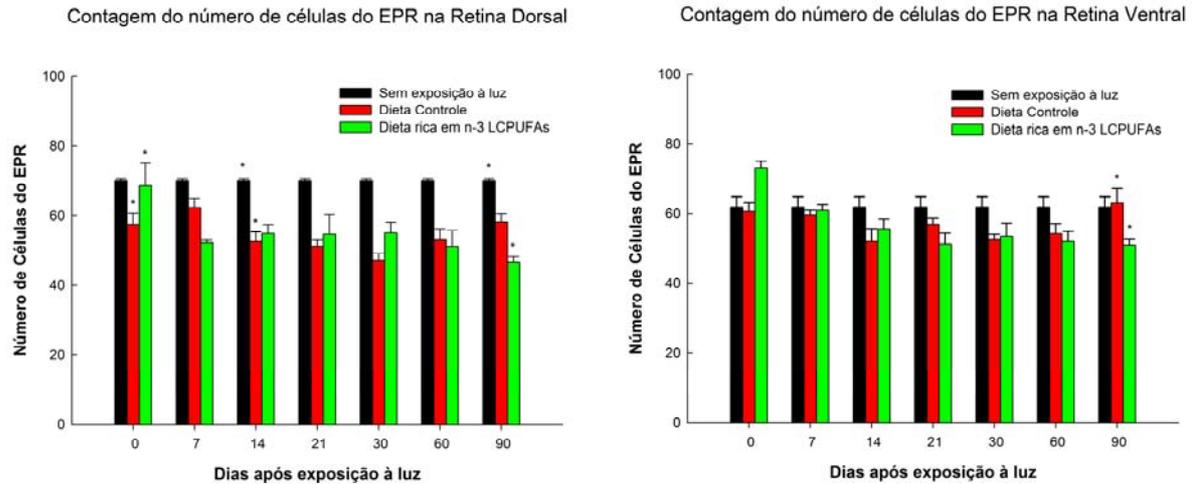


Figura 3. Comparação do número de células do Epitélio Pigmentar da Retina, dorsal e ventralmente ao disco óptico, entre o grupo controle sem exposição à luz, grupo alimentado com dieta controle e o suplementado com ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3) nos tempos de 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias após a exposição à luz. * $P < 0.05$.

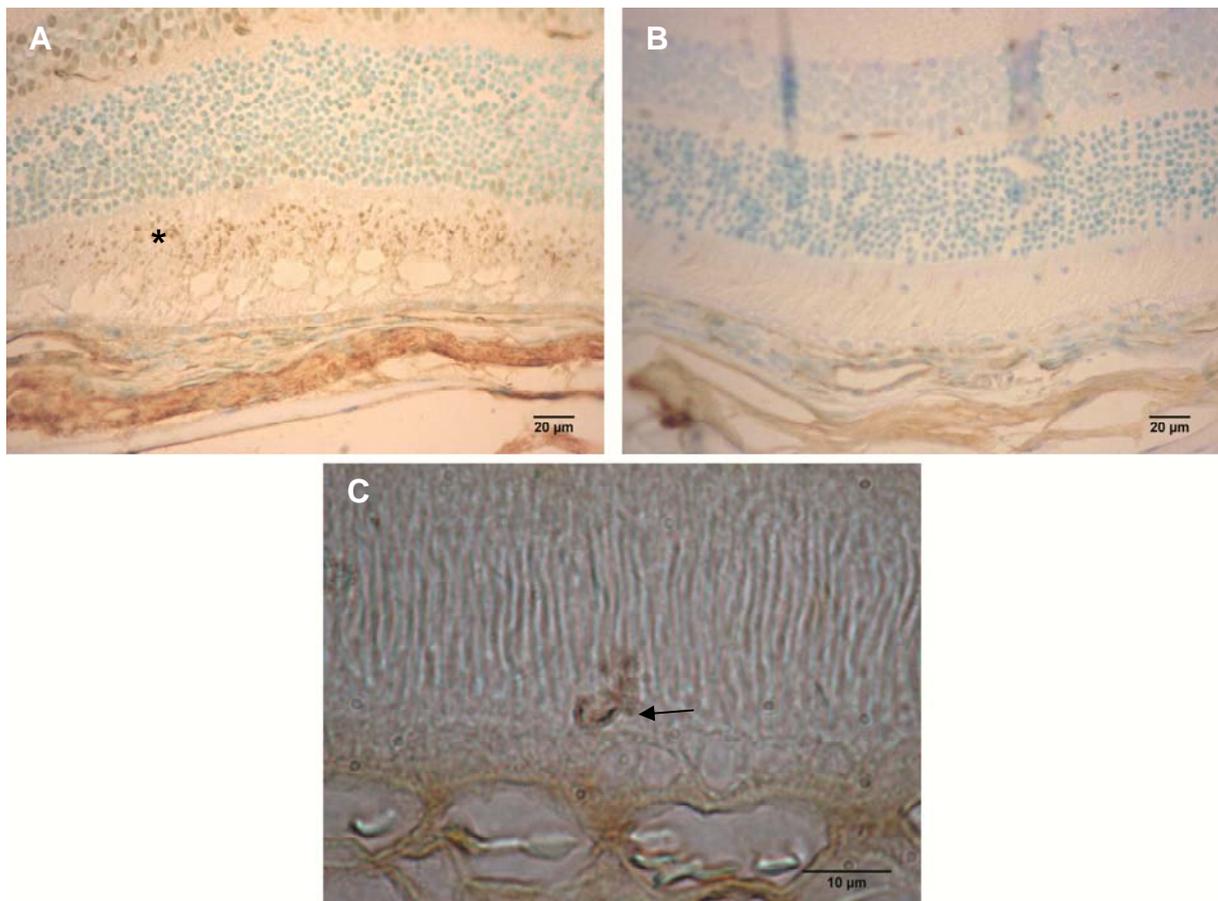


Figura 4. Fotomicrografia de reação histoquímica para a marcação de processos citoplasmáticos de micróglia da retina de animais avaliados imediatamente após exposição à luz. **A.** retina do grupo de dieta controle, apresentando uma grande quantidade de processos citoplasmáticos de micróglia ativadas nos segmentos dos fotorreceptores (asterisco). **B.** retina do grupo alimentado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs, apresentando uma menor quantidade de processos citoplasmáticos nos segmentos dos fotorreceptores. **C.** retina do grupo controle evidenciando-se processos citoplasmáticos de micróglia no espaço subretiniano (seta). A e B: contra-coloração com Azul de Toluidina, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3).

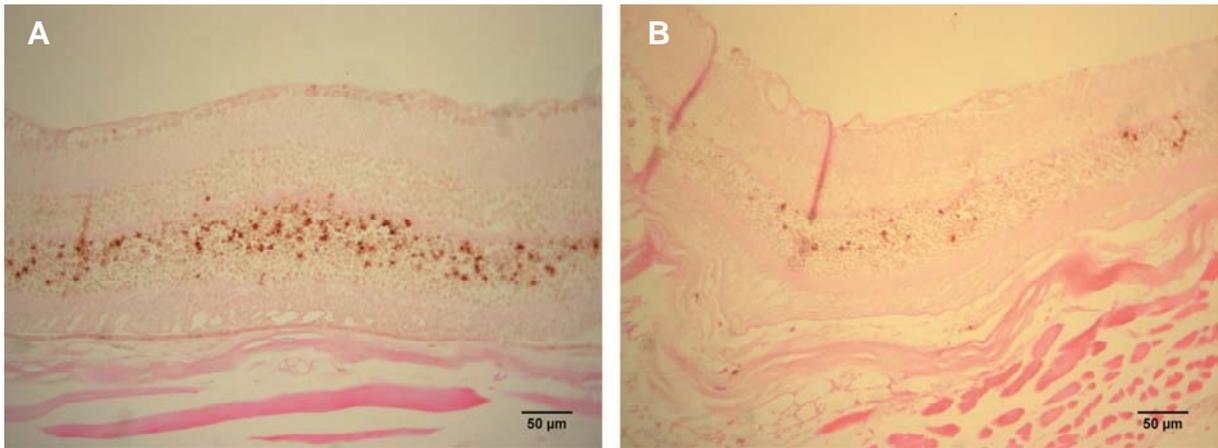


Figura 5. Marcação de células em apoptose pelo método TUNEL na retina de animais avaliados imediatamente após exposição à luz. **A.** retina representativa do grupo controle apresentando uma grande quantidade de núcleos em processo de apoptose na CNE. **B.** retina representativa do grupo suplementado com dieta rica em ω -3 LCPUFAs apresentando uma menor quantidade de núcleos marcados na CNE. CNE: Camada Nuclear Externa, ω -3 LCPUFAs: ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). Contra-coloração com Eosina.

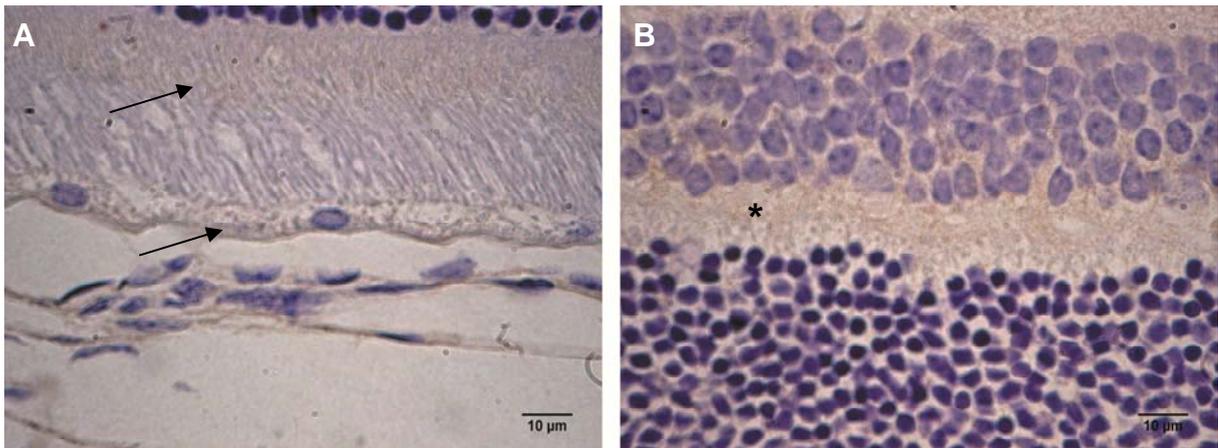


Figura 6. Fotomicrografia de marcação imuno-histoquímica de PEDF na retina de animais avaliados logo após exposição à luz. **A.** presença de PEDF no citoplasma do EPR e nos segmentos internos dos fotorreceptores (setas). **B.** marcação mais evidente do PEDF na camada plexiforme externa da retina (asterisco). Contra-coloração com Hematoxilina.

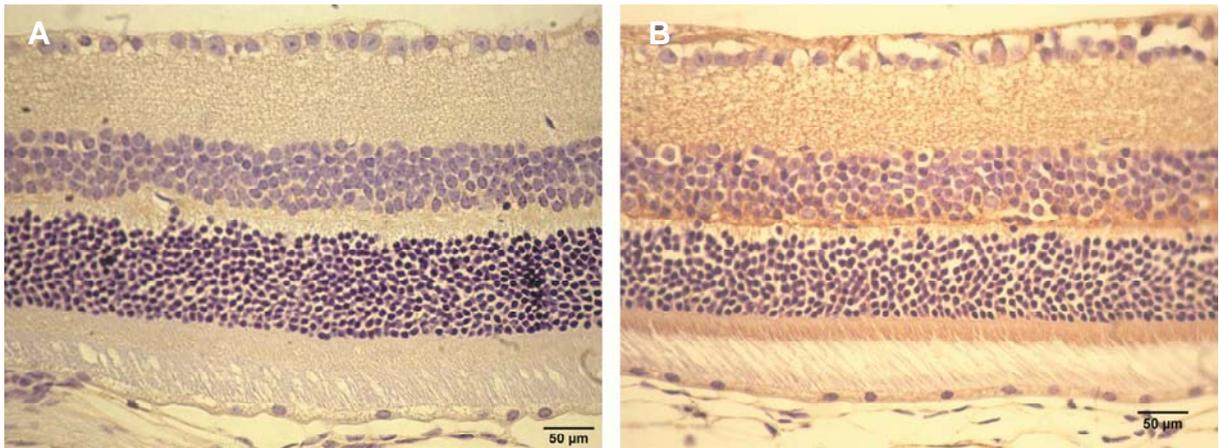


Figura 7. Fotomicrografia de marcação imuno-histoquímica de PEDF na retina de animais alimentados com dieta rica em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3). **A.** retina de animal avaliado logo após a exposição. **B.** retina de animal avaliado 90 dias após a exposição à luz, evidenciando-se marcação mais intensa do tecido retiniano. Contra-coloração com Hematoxilina.

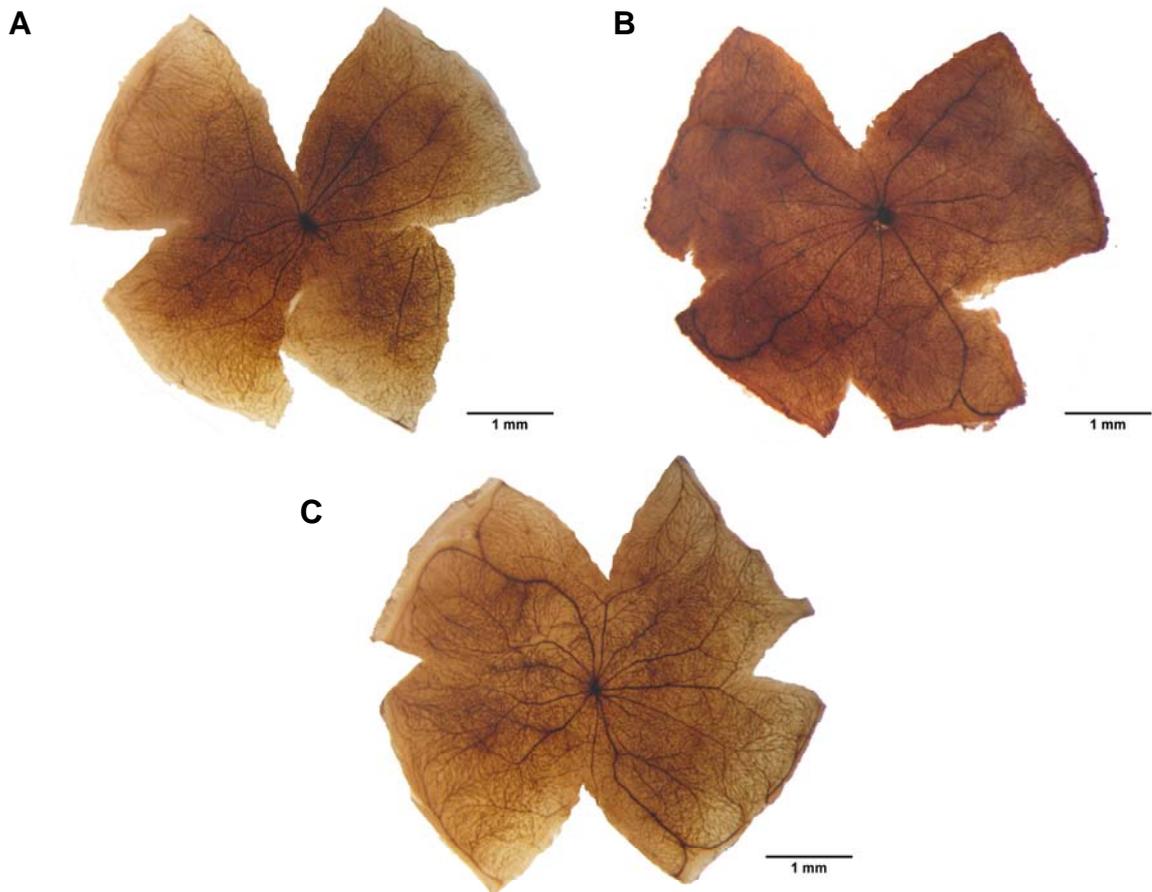


Figura 8. Fotografia estereoscópica de montagem global da retina para demonstração intravascular da peroxidase de rábano. **A.** Retina representativa do grupo controle sem exposição à luz. **B.** retina de animal do grupo alimentado com dieta controle a 90 dias pós exposição. **C.** retina de animal do grupo suplementado com dieta rica em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (ω -3).

ANEXO