UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Psicologia

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

MARCUS VINICIUS DE ALMEIDA AGUIAR

**Estudo da atividade neuroprotetora da Parawixina10, molécula isolada da
peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar
submetidos à modelo de glaucoma agudo.**

Ribeirão Preto

2016

MARCUS VINICIUS DE ALMEIDA AGUIAR

**Estudo da atividade neuroprotetora da Parawixina10, molécula isolada da
peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar
submetidos à modelo de glaucoma agudo.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.
Orientador: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos
(Biologia).

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2016

Ficha Catalográfica:

Aguiar, Marcus Vinicius de Almeida

Estudo da atividade neuroprotetora da Parawixina10, molécula isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar submetidos à modelo de glaucoma agudo / Marcus Vinicius de Almeida Aguiar; orientador Wagner Ferreira dos Santos.

--Ribeirão Preto, 2016.

p. 73.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1 - *Parawixia bistrata*; 2 - Glaucoma; 3 – Neuroproteção; 4 – Glutamato, 5- Rato Wistar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcus Vinicius de Almeida Aguiar

Estudo da atividade neuroprotetora da Parawixina10, molécula isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar submetidos à modelo de glaucoma agudo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico à minha família, mãe Marcia, pai Emir (in memoriam) aos meus irmãos Maria Gabriela e Eduardo Augusto pela compreensão, amor e por acreditarem em mim.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, por me receber em seu laboratório, pelos inúmeros ensinamentos, conselhos e sua orientação nesse trabalho.

Ao Dr. José Luiz Liberato que sempre me ajudou muito durante todo o Mestrado, mais ainda nessa reta final, sua presença foi essencial para a realização desse trabalho.

Ao IC Marcus Celani por todo auxílio nas técnicas cirúrgicas e histológicas.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas, Lívea Godoy, Eduardo Primini, Thiago Bronhara que estavam sempre dispostos a ajudar quando precisei. Ao Alberth, Marcelí, Aline, Tamiris e Sâmia pelo companheirismo nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do departamento de Física e Química da FCFRP-USP, pelas etapas de isolamento da Parawixina¹⁰ que foram realizadas em seu laboratório.

Ao Dr. André Luiz Andreotti Dagostin técnico do Laboratório de Biofísica de Membranas, sob a orientação do professor Dr. Wamberto Antonio Varanda, Departamento de Fisiologia, FMRP – USP.

Aos Professores Doutores Reginaldo Pereira da Silva e Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Centro de Ciências Biológicas (CCB) UFPE, por toda disposição e auxílio com técnicas em eletrofisiologia.

Ao programa de Pós-graduação em Psicobiologia (FFCLRP-USP), seu coordenador Dr. Cesar Alexis Galera e a secretária Renata Beatriz V. Del Moro.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo pelo privilégio de estudar aqui.

A todos os outros amigos e colegas que não foram mencionados especificamente, por serem muitos, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

À minha namorada Rafaela Borsato, pela paz de espírito que tenho por tê-la ao meu lado.

À minha mãe Marcia que em muitos momentos foi mãe e pai e se dedicou ao máximo para a educação de seus três filhos. E aos meus irmãos Maria Gabriela e Eduardo Augusto pelo apoio.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Fotografias de um espécime da aranha <i>Parawixia bistriata</i>	21
Figura 2 Esquema mostrando a retina e sua organização em camadas.	25
Figura 3 Esquema mostrando processos de excitotoxicidade	29
Figura 4 Imagens do procedimento experimental de indução de glaucoma agudo.....	37
Figura 5 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar. Comparativo entre grupos NAÏVE, VE ISQ e VE ISQ/REP.	42
Figura 6 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar. Comparativo com SHAM de 60 e 75 min, VE ISQ e VE ISQ/REP.	43
Figura 7 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar. Retinas ISQ pré-tratadas com Pwx10 nas concentrações de 0,5 , 1,0 e 2,0 µg/µL	46
Figura 8 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar. Retinas ISQ e ISQ/REP pré-tratadas com Riluzole.	46
Figura 9 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos do grupo NAÏVE, SHAM 60 e SHAM 75	48
Figura 10 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos dos grupos VE ISQ e VE ISQ/REP.	48
Figura 11 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos dos grupos Riluzole ISQ e ISQ/REP.	49
Figura 12 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 de 0,5 µg/µL ISQ e ISQ/REP.	50
Figura 13 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 de 1,0 µg/µL ISQ e ISQ/REP.	51
Figura 14 Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC e DAPI. Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 de 2,0 µg/µL ISQ e ISQ/REP	51

Figura 15 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ.....	54
Figura 16 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CNI das retinas de ratos submetidos à ISQ.....	55
Figura 17 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP..	57
Figura 18 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CNI das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP..	58
Figura 19 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios marcados com FJC+ na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ..	60
Figura 20 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios marcados com FJC+ na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP.....	61

TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos e concentrações. . 38

Tabela 2. Intensidade de células FJC+, na CCG após ISQ e ISQ/REP..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ALFAC	Álcool/formol/ácido acético (Fixador histológico)
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ArgTX	Argiotoxina
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
CA1	Área 1 do Corno de Ammon
Ca ²⁺	Íon cálcio
CA3	Área 3 do Corno de Ammon
CCG	Camada de células ganglionares
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade de São Paulo, <i>Campus</i> de Ribeirão Preto
CF	Camada de fotorreceptores
CFN	Camada de fibras do nervo óptico
Cl ⁻	Íon cloro
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COS	Células do tipo CV-1 originárias de macacos, transportando material genético viral do tipo SV40 (do inglês <i>cells CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material</i>)
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAAC1	Carreador de aminoácido excitatório 1 (do inglês <i>excitatory amino acid carrier 1</i>)
EEAT 1- 5	Transportadores de aminoácidos excitatórios, subtipos de 1 a 5 (do inglês <i>excitatory amino acid transporter</i>)
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EPR	Epitélio pigmentar da retina

FDA	Food and Drug Administration
FJC	Fluoro Jade do tipo C
FJC+	Marcação positiva para Fluoro Jade do tipo C
GABA	Ácido Gama-Amino Butírico
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato (do inglês <i>Glutamate Aspartate Transporter</i>)
GLT-1	Transportador de glutamato do tipo 1 (do inglês <i>Glutamate Transporter 1</i>)
H.E	Hematoxilina de Harris e Eosina
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
ISQ	Isquemia
ISQ/REP	Isquemia seguida por reperfusão
JSTXs	Jorotoxina
K ⁺	Íon potássio
L-Glu	L-Glutamato
Mg ²⁺	Íon magnésio
mGluR 1-8	Receptores metabotrópicos de glutamato, subtipos 1 a 8
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
Na ⁺	Íon sódio
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Bomba de sódio-potássio ATPase
NCX	Carreador de cálcio - sódio
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase
PhTXs	Philanthotoxina
PIO	Pressão intra-ocular
PTZ	Pentilenotetrazol
Pwx10	Parawixina10
RLZ	Riluzole
SCCR	Sinaptosoma corticocerebral de ratos
SFR	Camada segmentar dos fotorreceptores

SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Ácido trifluoroacético
VE	Veículo

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Quilodalton
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µg/µL	Razão microgramas por microlitros
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
Da	Daltons
g	Grama
g/kg	Razão grama por quilograma
g/mL	Razão grama por mililitro
K_M	Constante de afinidade
m/z	Razão massa / carga
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
UV	Ultravioleta
v/v	Razão volume / volume
V_{max}	Velocidade máxima de reação
xg	Número de vezes a força da gravidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Peçonhas de aranhas	19
1.2	A peçonha da aranha <i>Parawixia bistrata</i> (Araneae: Araneidae).....	20
1.2.1	Peçonha Bruta e Desnaturada.....	21
1.2.2	Parawixina1 (PbTx 1.2.3).....	22
1.2.3	Parawixina2.....	23
1.2.4	Parawixina10 (PbTx 10).....	24
1.3	A Retina.....	24
1.4	A Lesão isquêmica e a excitotoxicidade	27
1.5	O Glaucoma.....	29
1.6	O Glaucoma Experimental	30
1.7	Neuroproteção	31
1.8	Relevância	32
1.9	Hipótese	32
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral.	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Coleta dos espécimes de <i>Parawixia bistrata</i> , extração das glândulas e reservatórios de veneno	34
3.3	Isolamento Pwx10 da peçonha de <i>P. bistrata</i>	34
3.4	Etapas de isolamento em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	35

3.5	Espectrometria de massa	35
3.6	Cirurgia: Glaucoma Experimental Agudo - Isquemia/Reperusão.....	36
3.7	Drogas.....	37
3.8	Histologia	38
3.8.1	Coloração com Hematoxilina-Eosina (H-E)	38
3.8.2	Fluoro-Jade C (FJC)	39
3.9	Captura das imagens	39
3.10	Análise Qualitativa	40
3.11	Análise Semi-Quantitativa.....	40
3.12	Análise Quantitativa	40
3.13	Análise Estatística	41
4	RESULTADOS	41
4.1	Análise Qualitativa	41
4.1.1	Retinas submetidas à Isquemia e Isquemia/Reperusão.....	41
4.1.2	Retinas tratadas submetidas à Isquemia e Isquemia/Reperusão	43
4.1.3	Fluoro-Jade C	46
4.2	Análise Semi-Quantitativa.....	52
4.3	Análise Quantitativa	52
4.3.1	Retinas submetidas à Isquemia	53
4.3.2	Retinas submetidas à Isquemia/Reperusão	55
4.3.3	Análise Quantitativa dos neurônios marcados com FJC.....	58
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

Aguiar, M.V.A. Estudo da atividade neuroprotetora da Parawixina10, molécula isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar submetidos a modelo de glaucoma agudo. 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Peçonhas de aranhas são uma rica fonte de moléculas, dentre as quais se destacam os peptídeos neuroativos, que atuam no tecido nervoso de insetos e mamíferos, tais como receptores colinérgicos e glutamatérgicos. A retina constitui um neuroepitélio, uma das membranas do segmento posterior do olho, é uma extensão do sistema nervoso central. A lesão isquêmica nesse tecido desencadeia um processo de degeneração celular, sendo os neurônios os principais afetados. Várias patologias oculares, como o glaucoma, estão associadas a uma degeneração neuronal secundária à isquemia, na qual o excesso de *L*-glutamato (*L*-Glu) extracelular é lesivo aos neurônios. A peçonha da aranha *Parawixia bistriata* contém componentes com grande potencial neuroprotetor, como a Parawixina10 (Pwx10), que atua potencializando o transporte de *L*-Glu e glicina para o meio intracelular. Neste contexto, diante da necessidade de se buscar novas terapias para o tratamento de neuropatologias e de se entender a lesão isquêmica, a Pwx10 surge como potencial fármaco neuroprotetor. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial neuroprotetor da Pwx10, em um modelo de isquemia retiniana aguda, com e sem reperfusão, em ratos Wistar. Durante os experimentos de isquemia (ISQ), a pressão intra-ocular (PIO) foi aumentada para 120 mmHg, e mantida por 45 minutos. Nos experimentos em que houve reperfusão (ISQ/REP), após a isquemia, a pressão foi reduzida aos níveis normais e mantida por mais 15 minutos, de forma a restaurar o fluxo sanguíneo e os níveis basais da PIO. As drogas utilizadas para tratamento foram injetadas por via intravítrea, 15 minutos antes do início da isquemia. Após a cirurgia foram realizados os processos histológicos que envolvem técnicas de H-E e Fluoro-Jade C. Em seguida, foram analisadas as densidades de células viáveis na camada nuclear interna (CNI) e camada de células ganglionares (CCG). Os resultados mostraram que os tratamentos com a Pwx10 protegeram as células da CNI tanto em ISQ como ISQ/REP. Comparada com o Riluzole, a Pwx10 foi mais eficaz em CCG ISQ em 15% e CNI ISQ/REP em 23%. Portanto, a Pwx10 apresenta efeitos neuroprotetores em ratos Wistar submetidos à isquemia retiniana aguda, seguida por reperfusão ou não.

Palavras chave: *Parawixia bistriata*, Glaucoma, Neuroproteção, *L*-Glutamato, rato Wistar.

ABSTRACT

Aguiar, M.V.A. Study of the neuroprotective activity of Parawixina10, isolated molecule from the spider venom *Parawixia bistriata* (Araneae : Araneidae) in Wistar rats submitted to experimental glaucoma. 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Spider venoms are a rich source of molecules, among which stand out the neuroactive peptides that act on the nervous tissue of insects and mammals, such as cholinergic and glutamatergic receptors. The retina is a neuroepithelium, a membrane lining the cavity of the eyeball, it being an extension of the central nervous system. Ischemic injury that tissue triggers a cell degeneration process, and the neurons affected major. Various eye diseases such as glaucoma, are associated with neuronal degeneration secondary to ischemia in which excess *L*-glutamate (*L*-Glu) extracellular is harmful to neurons. The venom of *Parawixia bistriata* spider contains components with high neuroprotective potential, as Parawixina10 molecule (Pwx10), which operates enhancing the transport of *L*-Glu and glycine to the intracellular medium. In this context, on the need to seek new therapies for the treatment of these diseases and to understand the ischemic injury, Pwx10 emerges as potential neuroprotective drug. Therefore the aim of this study was to evaluate the neuroprotective potential of Pwx10 on an acute retinal ischemia model, with and without reperfusion in rats. During the experiments ischemia (ISC), the intraocular pressure (IOP) was increased to 120 mmHg and maintained at this level for 45 minutes. In experiments in which there was reperfusion (I/R) after the period of ischemia, the pressure was reduced to normal levels and maintained there for 15 minutes in order to restore blood flow and baseline IOP. The drugs used for the treatment were intravitreally injected 15 minutes before the onset of ischemia. After surgery were performed histological techniques involving procedures H-E and Fluoro-Jade C. Then, viable cell densities in the inner nuclear layer were analyzed (INL) and ganglion cell layer (GCL). The results showed that the treatments with Pw10 protected the INL cells both in ISC as IR. Compared with Riluzole, the Pwx10 was more effective in GCL ISC 15% and INL I/R 23%. Therefore, Pwx10 shows neuroprotective effects in Wistar rats with acute retinal ischemia followed by reperfusion or not.

Keywords: *Parawixia bistriata*, glaucoma, neuroprotection, glutamate, Wistar rat.

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, plantas e animais apresentam estratégias para evitar a predação, defender seu território ou capturar presas, utilizando compostos bioativos, como toxinas, para tal feito. Esses compostos podem apresentar sabor desagradável provocando náusea ou causar irritação, dor, paralisia ou mesmo a morte (Cromer & McIntyre, 2008; Min *et al.*, 2013).

Peçonhas e venenos animais são fontes de moléculas bioativas. Dentre estas, podemos destacar as neuroativas, as quais atuam no tecido nervoso de insetos e mamíferos, principalmente em receptores e transportadores glutamatérgicos. Normalmente os animais que as possuem usam-nas para sobreviverem, como artefato de captura e morte de suas presas. Esses compostos bioativos são encontrados e têm sido isolados predominantemente de caracóis marinhos, aranhas, escorpiões, serpentes, sapos e alguns insetos (Escoubas & Rash 2004; Norton & McDonough, 2008; Min *et al.*, 2013).

Compostos neuroativos de origem natural podem ser usados como ferramentas biológicas para se entender sistemas de neurotransmissão e como modelos de drogas, para o tratamento de neuropatologias.

Em doenças neurodegenerativas como glaucoma, esclerose lateral amiotrófica (ELA), epilepsia, mal de Alzheimer e acidente vascular encefálico (AVE), ocorre a excitotoxicidade (Maragakis & Rothstein, 2001), ou seja, ativação excessiva de alguns receptores, induzindo eventos que levam a morte celular. Sendo assim, para tentar desenvolver tratamentos para essas neuropatologias, tem sido constante a busca por substâncias, cujos mecanismos minimizem os danos causados pelo excesso de *L*-glutamato (*L*-Glu).

Neste sentido, uma das maneiras de reduzir a excitotoxicidade consiste no uso de inibidores da liberação de *L*-Glu ou no uso de agentes que estimulam a recaptação do *L*-Glu, como o Riluzole, usado no tratamento da ELA que, além de aumentar a recaptação do *L*-Glu,

também inibe sua liberação. Portanto, atuando em receptores e transportadores (Mu, Azbill, & Springer, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido feitos a fim de se identificarem compostos neuroativos naturais presentes em peçonhas e venenos de diferentes espécies, que podem ser usados em uma variedade de aplicações médicas, em especial nas doenças neurodegenerativas. Poliaminas naturais advindas de toxinas de aranhas e vespas são amplamente usadas como compostos e ferramentas em estudos com receptores do tipo AMPA (Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) devido a sua capacidade para inibir seletivamente tais receptores. Estas poliaminas incluem as philanthotoxinas (PhTXs), toxinas de aranha Joro (JSTXs) e argiotoxinas (ArgTXs) (Poulsen *et al.*, 2014).

Neste contexto, diante da necessidade de se buscarem novas terapias para o tratamento dessas patologias, a peçonha da aranha *Parawixia bistriata* surge como potencial fonte de fármacos neuroprotetores.

1.1 Peçonhas de aranhas

Atualmente, foram descritas mais de 44.000 espécies de aranhas (Platnick., 2014) cujas peçonhas são constituídas de moléculas com grande variedade de massa molecular (0,1- 40 kDa). Essas peçonhas são constituídas por uma mistura heterogênea de sais inorgânicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular (alcalóides, acilpoliaminas, nucleosídeos sulfatados, aminas e aminoácidos), polipeptídeos e um pequeno número de proteínas com alta massa molecular (King., 2004).

As aranhas usam sua peçonha para paralisar ou matar sua presa, atuar na pré-digestão do alimento e participar do mecanismo de defesa contra predadores (Rash & Hodgson., 2002). As peçonhas das aranhas fornecem uma gama de proteínas bioativas, como as neurotoxinas,

que atuam nos canais iônicos e receptores do sistema neuromuscular de insetos e mamíferos (Rash & Hodgson., 2002).

A paralisia típica causada em insetos pela peçonha das aranhas sugere que as toxinas contêm peptídeos que afetam os canais iônicos neuroniais e o sistema excitatório de suas presas. Dentre os moduladores dos canais de íons de vertebrados e invertebrados, caracterizados a partir da peçonha de aranhas, os moduladores de canais de cálcio dependentes de voltagem são os mais abundantes (Klint *et al.*, 2014).

Poulsen e colaboradores (2014) sugerem que poliaminas presentes em peçonhas de vespas e aranhas apresentam capacidade seletiva, atuando como bloqueadores de canais iônicos e em receptores do tipo AMPA.

O estudo das neurotoxinas presentes na peçonha de aranhas é de grande importância para a pesquisa e deve ser realizado devido ao seu potencial terapêutico, como também para melhorar a nossa compreensão do funcionamento normal de eventos patológicos e ampliar o conhecimento dos mecanismos moleculares da neurotransmissão (Min *et al.*, 2013).

1.2 A peçonha da aranha *Parawixia bistrata* (Araneae: Araneidae)

A *Parawixia bistrata* é uma aranha semicolonial encontrada na América Central e do Sul, principalmente na região sudeste do Brasil. Esta aranha possui hábitos noturnos e se agrupa em ninhos (Levi., 1992).

A peçonha da *P. bistrata* apresenta uma grande quantidade de compostos neuroativos; prova disso são os estudos feitos em nosso laboratório, com a peçonha bruta, peçonha desnaturada e frações purificadas (Parawixinas 1, 2, 10 e 11), que apresentaram resultados importantes e relevantes.

Figura 1. Fotografias representativas de um espécime fêmea da aranha *Parawixia bistriata* (A) vista frontal, (B) vista dorsal. Fonte: Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas.

1.2.1 Peçonha Bruta e Desnaturada

Em um bioensaio com térmitas (*Sintermes sp*), a peçonha bruta de *P. bistriata* quando injetada por via retal causou paralisia irreversível (Fontana *et al.*, 2000).

Quando esta peçonha bruta foi injetada por via intracerebroventricular (i.c.v), em ratos Wistar, causou crises pró-convulsivas, as quais foram diferentes daquelas causadas pelo ácido caínico (Rodrigues *et al.*, 2001).

Rodrigues (2004) demonstrou que a injeção por via i.c.v da peçonha bruta desnaturada dessa aranha, assim como frações mais purificadas, aboliu crises tônico-clônicas induzidas por injeção de picrotoxina, PTZ e bicuculina em ratos.

Rodrigues et al. (2004) demonstraram que o componente principal de uma fração (7.1) isolada da peçonha de *P. bistriata*, quando injetado por via i.c.v, em ratos, apresenta ação pró-convulsivante. A sua estrutura foi definida como um nucleosídeo de inosina. O composto isolado dessa fração inosina5'-monofosfato induziu paralisia em cupins.

Estudos utilizando sinaptossomas do córtex cerebral de ratos (SCCR) demonstraram que a peçonha desnaturada provoca uma potente inibição da recaptação do GABA, e estimula acentuadamente a recaptação do L-Glu (Fontana *et al.*, 2003).

1.2.2 Parawixina1 (PbTx 1.2.3)

A Parawixina1, anteriormente denominada como PbTx 1.2.3, isolada da peçonha de *P. bistrata*, estimula a captação de *L*-Glu em SCCR de maneira dependente de dose, e medeia esse efeito aumentando a velocidade máxima de reação (V_{max}) para a captação de *L*-Glu, sem alterar a K_M (Fontana *et al.*, 2003). Isso sugere que o componente ativo pode atuar diretamente ou indiretamente, aumentando o carreamento ou, alternativamente, aumentando o número de moléculas funcionais transportadas na superfície da célula. Observou-se, também, um efeito neuroprotetor da Parawixina1, tanto para isquemia quanto para isquemia/reperfusão de retinas de ratos, no modelo de glaucoma experimental em ratos. Quando testada em células COS (células imortalizadas derivadas de rim de macacos africanos), expressando os subtipos de transportadores de *L*-Glu, este composto estimulou o aumento da captação do *L*-Glu pelo subtipo EAAT2 (Fontana *et al.*, 2003).

Considerando-se reduzir os efeitos colaterais geralmente apresentados por bloqueadores de *L*-Glu e buscando novas alternativas terapêuticas, os potenciais efeitos farmacológicos da Parawixina1, a qual demonstrou ser um potente estimulador da recaptação desse neurotransmissor em SCCR, sugerem que esta pode vir a ser um poderoso modelo de fármaco neuroprotetor contra danos neurais causados por processos epileptogênicos (Fontana *et al.*, 2007) e aquelas devido às alterações do sistema glutamatérgico (Torres-Salazar & Fahlke 2007).

Fontana *et al.*, (2015) em modelo usando quimera de transportadores EAAT2 e EAAT3 demonstraram que a Parawixina1 atua facilitando o movimento do domínio dos transportadores, aumentando o transporte de *L*-Glu.

1.2.3 Parawixina2

Outra fração da peçonha de *P. bistrata*, a Parawixina2, anteriormente denominada FrPbAII, mostrou-se um potente inibidor da captação do GABA em SCCR, como também em sinaptossomas preparados com retinas de ratos (Beleboni *et al.*, 2006). Outros resultados de nosso laboratório demonstraram que a injeção por via i.c.v da Parawixina2 inibe significativamente crises convulsivas em ratos induzidas por bicuculina (Rodrigues *et al.*, 2004). Essa fração mostrou-se neuroprotetora em ratos submetidos ao modelo de glaucoma experimental. A Parawixina2 protegeu retinas de ratos com isquemia/reperfusão, reduzindo a morte celular e mantendo a morfologia normal de todas as camadas de células retinianas (Beleboni *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram que essa fração também apresenta efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes (Liberato *et al.*, 2006). Beleboni e colaboradores (2006) mostraram que essa fração atua primariamente e diretamente nos transportadores de GABA e glicina, característica que a torna uma importante ferramenta no estudo da neuroproteção via sistema GABAérgico.

Gelfuso *et al.*, (2007) demonstraram que a Parawixina2 foi eficaz contra crises convulsivas induzidas i.c.v. por injeção aguda de diversos convulsivantes químicos. Ainda, foi demonstrado que essa molécula inibiu crises convulsivas em modelo subcrônico de injeção de PTZ em ratos Wistar (Gelfuso *et al.*, 2013).

Um análogo deste composto encontra-se no mercado e é vendido por empresas farmacêuticas como a Enzo Life Sciences e a Santa Cruz Biotechnology (<http://www.enzolifesciences.com/> e <http://www.scbt.com/>) e é usado como inibidor seletivo da captação de GABA e glicina.

1.2.4 Parawixina10 (PbTx 10)

A fração Parawixina10 (PbTx10; Pwx10) atua seletivamente nos transportes de *L*-Glu e glicina, e poderá possibilitar, no futuro, melhor entendimento do funcionamento desses neurotransmissores e das neuropatologias com eles envolvidas (Fachim *et al.*, 2011).

Fachim e colaboradores (2011) demonstraram o efeito neuroprotetor da Pwx10 em ratos submetidos à microinjeção intra-hipocampal de NMDA. O tratamento com Pwx10 mostrou efeito neuroprotetor, sendo mais pronunciado quando o composto foi administrado a partir de 1h após o NMDA, em regiões do hipocampo analisadas (CA1, CA3 e hilo).

Portanto, a peçonha de *P. bistriata* contém componentes com grande potencial anticonvulsivante e neuroprotetor altamente relevantes. Isto nos estimula a continuidade de estudos da mesma, na sua caracterização química e biológica e na busca de novos compostos neuroativos, os quais possam se tornar fármacos ou modelos para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

1.3 A Retina

A retina é uma extensão do sistema nervoso central (SNC) que recebe as informações vindas do exterior. Extensão essa especializada em capturar a luz e convertê-la em estímulos que são, então, transmitidos ao cérebro através dos axônios do nervo óptico (Agudo-Barriuso *et al.*, 2013).

A retina é um neuroepitélio, uma das membranas do segmento posterior do olho e é derivada da mesma vesícula primordial, da qual se origina o diencéfalo (Machado 2000). A estrutura da retina é extremamente complexa e dividida em camadas. Na retina do rato, podemos diferenciar 10 camadas: epitélio pigmentar da retina (EPR), camada de fotorreceptores (CF), membranas limitantes externa (MLE) e interna (MLI), camadas nucleares externa (CNE) e interna (CNI), camadas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI), camada de células

ganglionares (CCG) e camada de fibras do nervo óptico (CFN) (Fitzpatrick & Mooney, 2012).

Figura 2. Esquema mostrando os tipos celulares básicos que compõem a retina e sua organização em camadas. Fonte: (<http://www.anatomiadocorpo.com/wp-content/uploads/2016/06/anatomia-retina.jpg>)

Dentro das camadas da retina o estímulo luminoso é convertido em sinal elétrico. Os axônios das células ganglionares, localizadas na camada mais interna da retina, formam o nervo óptico que transporta o sinal até o lóbulo occipital do cérebro para as áreas 17, 18 e 19 que são responsáveis de processar esta informação.

As células bipolares constituem a “ponte” entre os fotorreceptores a as células ganglionares. Essa célula não apenas retransmite o sinal emitido pelo fotorreceptor, mas atua conjuntamente por um sistema complexo de ativação, no refinamento desse sinal. As sinapses das células bipolares são excitatórias e mediadas pelo *L-Glu*. Nestas células podemos encontrar os receptores metabotrópicos e ionotrópicos para o *L-Glu*. Os interneurônios, célula

amácrina e horizontal estão localizados na CNI. As células amácrinas fazem sinapse na junção da célula bipolar com a ganglionar, na CPI, essa sinapse é inibitória, preponderando o GABA e a glicina. As células horizontais são neurônios de segunda ordem envolvidos na modulação da informação transmitida entre os fotorreceptores e a células bipolares. (Pascale, Drago & Govoni, 2012).

O aminoácido *L*-Glu é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e da retina de mamíferos (Collingridge & Lester, 1989).

O *L*-Glu se liga a receptores que podem ser classificados em dois tipos: ionotrópicos, cujo funcionamento consiste na abertura integral de canais iônicos para íons específicos, e os metabotrópicos, que são acoplados a proteínas G e modulam a produção de mensageiros intracelulares (Nakanishi *et al.*, 1998).

Dentre os receptores ionotrópicos encontram-se os subtipos: NMDA, AMPA e cainato (Ozawa, Kamiya & Tsuzuki 1998). Dentre os metabotrópicos, encontram-se oito subtipos distribuídos em três grupos, da seguinte forma: mGluR1 e mGluR5 no grupo I; mGluR2 e mGluR3 no grupo II; mGluR3, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 no grupo III (Ozawa, Kamiya & Tsuzuki, 1998).

O *L*-Glu normalmente é removido da fenda sináptica, rapidamente, por transportadores glutamatérgicos dependentes de íons de sódio, localizados em neurônios e glia (Lin *et al.*, 2009). Já foram identificados 5 transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT1-5) em seres humanos (Danbolt, 2001). Todos os transportadores de *L*-Glu encontrados em seres humanos possuem seus correspondentes na retina de ratos, sendo que o transportador GLAST (EAAT1 em humanos) está localizado em células de Müller e astrócitos, enquanto o GLT-1 (EAAT2) é expresso em maior quantidade nas células bipolares e nos cones. O EAAC1 (EAAT3) está presente em células horizontais, algumas células amácrinas e células ganglionares; já o EAAT5 é mais encontrado em bastonetes (Rauen *et al.*, 1998; Pow &

Barnett, 2000). Os astrócitos da retina também expressam o EAAT4, principalmente próximo à camada de fibras do nervo óptico (Ward *et al.*, 2004).

A ação destes transportadores impede a ocorrência da excitotoxicidade, ou seja, evita o acúmulo de *L*-Glu na fenda sináptica, que poderia levar a uma incessante ativação de receptores glutamatérgicos e constante liberação de substâncias no interior dos neurônios e para o meio extracelular, que acabariam contribuindo para a lesão no tecido (Choi & Rothman, 1990; Maragakis & Rothstein, 2001).

1.4 A Lesão isquêmica e a excitotoxicidade

A isquemia retiniana ocorre como consequência de várias doenças, tais como glaucoma, neuropatia óptica isquêmica anterior, oclusão da artéria retiniana, retinopatia diabética, acidente vascular encefálico (AVE), dentre outras (Jeng *et al.*, 2007).

A isquemia resulta da ausência ou insuficiência do fluxo sanguíneo, reduzindo os níveis de oxigênio e substratos, incluindo a glicose (Osborne *et al.*, 2004). Como as taxas de glicólise e fosforilação oxidativa diminuem, os níveis de adenosina trifosfato (ATP) caem, causando deterioração da função da membrana celular e desequilíbrio iônico, iniciando as cascatas que finalmente levam à morte neuronal (Osborne *et al.*, 2004).

Com a redução da energia na célula, ocorre falência das bombas dependentes de ATP, como a Na^+/K^+ -ATPase e subsequente despolarização dos neurônios, induzindo a liberação de neurotransmissores, principalmente o *L*-Glu (Osborne *et al.*, 2004).

Devido à redução do transporte ativo pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase, a repolarização dos neurônios, após despolarização, é inibida, causando desbloqueio dos sítios de íons de Mg^{2+} , nos receptores NMDA, conforme descrito por Osborne *et al.*, (2004). Assim, os receptores NMDA são despolarizados, o influxo de íons de Ca^{2+} aumenta, e ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios (Louzada-Júnior *et al.*, 1992; Meldrum, 2000). Também são

ativados receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA/cainato, levando ao influxo de íons de Ca^{2+} , de Na^+ , de Cl^- e água, que contribuem para o edema (Choi & Rothman, 1990).

Além disso, em neurônios isquêmicos, também ocorrem alterações nas proteínas de membranas NCX, responsáveis pelo transporte de íons de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. De acordo com Choi (2005) os níveis de íons de Ca^{2+} intracelular permanecem elevados, mesmo com a restauração do fluxo sanguíneo e de gradientes de íons de Na^+ , devido à clivagem da NCX pela enzima calpaína, impossibilitando o transporte de íons de Ca^{2+} para o exterior da célula.

Este aumento nos níveis intracelulares de íons de Ca^{2+} resulta na ativação de várias enzimas dependentes da ação deste cátion para atividade plena, como por exemplo, proteína quinase C e óxido nítrico sintase (NOS). Estas enzimas produzem alterações que levam à desregulação de mecanismos homeostáticos celulares e da integridade estrutural, levando à morte da célula. Além disso, pode ocorrer a liberação citoplasmática de fatores promotores de morte celular, como o citocromo C e iniciação da morte celular por apoptose (Osborne *et al.*, 2004).

Mesmo com reperfusão após isquemia, a lesão não diminui, ao contrário, ela aumenta, pois a reoxidação durante este período causa superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, desencadeando um desequilíbrio entre a produção e a remoção destas espécies reativas, uma vez que o sistema de defesa antioxidante se torna insuficiente (Chen & Tang 2011).

Os processos citados combinam-se promovendo a morte de neurônios, a qual pode ocorrer mais rapidamente, devido à necrose, ou pode ser mais tardia, causada por apoptose (Kawaguchi, Furuya & Patel, 2005). A necrose é caracterizada por alguns fatores como vacuolização do citoplasma, quebra da membrana plasmática e produção de resposta inflamatória. Na morte por apoptose, caracterizada pela fragmentação do DNA, é necessária a

atividade de caspases e, devido à formação de corpos apoptóticos, o sistema imune não é ativado (Lipton, 1999).

Figura 3. Esquema mostrando processos de excitotoxicidade. Fonte: (<http://www.nanocell.org.br/wp-content/uploads/2014/12/excitotoxicidade.png>)

Para minimizar os danos que ocorrem durante a isquemia, podem ser feitas intervenções farmacológicas nas principais vias causadoras da morte celular, por exemplo, impedindo a entrada de íons e água para o interior do neurônio, prevenindo a produção excessiva de radicais livres, reduzindo os processos inflamatórios, reduzindo a neurotransmissão excitatória ou reforçando a neurotransmissão inibitória (Szabadfi *et al.*, 2010).

1.5 O Glaucoma

Há um grupo de doenças heterogêneas, mas clinicamente semelhantes, conhecidos como neuropatias ópticas glaucomatosas, que induzem alterações típicas como a degeneração lenta e progressiva das células ganglionares e os seus axônios. O glaucoma é uma das principais

causas de cegueira no mundo, perdendo apenas para a catarata (Gauthier & Liu, 2016). Embora todos os mecanismos ainda não tenham sido desvendados, hoje já são conhecidos os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa patologia, sendo eles, idade, pressão intra-ocular (PIO) elevada, espessura da córnea e origem étnica (Quigley, 2011). Isso evidencia a necessidade de maior investigação dos mecanismos envolvidos na degeneração das células ganglionares da retina, nervo óptico e cérebro, e no descobrimento de novas possibilidades para o tratamento do glaucoma (Chang & Goldberg, 2012).

1.6 O Glaucoma Experimental

O glaucoma é a principal causa de cegueira irreversível no mundo todo. Mais de 60 milhões de pessoas ao redor do mundo são afetados e estima-se que aproximadamente 8 milhões sofrem de cegueira bilateral causada por esta doença (Quigley, 2011). Logo, o desenvolvimento de modelos experimentais é de grande importância, para pesquisa e descoberta de novos medicamentos e tratamentos, que ajudem a minimizar tais danos.

Vários artigos descrevem metodologias de indução do glaucoma utilizando modelos animais, tais como aumento da PIO (Louzada-Júnior *et al.*, 1992; Osborne *et al.*, 2004), oclusão de artéria cerebral (Kalesnykas *et al.*, 2008), lesão no nervo óptico (Yoles & Schwartz, 1998) e cauterização da veia episcleral (Hernández, Urcola & Vecino, 2008).

Neste trabalho de mestrado, o glaucoma experimental que será utilizado consiste no aumento da pressão na câmara anterior do olho a fim de bloquear o suprimento capilar para a retina, conforme descrito por Hughes (1991), Louzada-Jr *et al.*, (1992) e modificado por Guizzo *et al.*, (2005), ou seja, é um modelo de hipertensão intra ocular agudo (HIOA).

A reperfusão, neste modelo de glaucoma experimental, consiste no restabelecimento do suprimento sanguíneo e dos níveis normais da PIO. Durante esta fase, segundo Louzada-Jr. *et al.*, (1992), há um aumento do dano tecidual se comparado à fase de isquemia, o qual pode ser

verificado entre 15 e 20 minutos de reperfusão. Tal dano tecidual parece ser mediado por *L*-Glu, tanto direta como indiretamente, através de receptores NMDA (Louzada-Júnior *et al.*, 1992). Células que tinham sofrido somente danos reversíveis na isquemia podem ser lesadas durante a reperfusão, tornando mais agravante o quadro da doença (Osborne *et al.*, 2004).

Para o tratamento do glaucoma, geralmente são utilizados alguns medicamentos que reduzem a PIO, como, por exemplo, agonistas colinérgicos e bloqueadores adrenérgicos (Soltau & Zimmerman, 2002). No entanto, mesmo pacientes com PIO reduzida sofrem perda visual devido ao glaucoma. Isso tem motivado a pesquisa de substâncias neuroprotetoras, que já tenham se mostrado eficazes no tratamento de alguma outra doença do SNC, e que possam ser capazes também de reduzir a morte de células ganglionares.

1.7 Neuroproteção

Em doenças neurodegenerativas como glaucoma, ELA, epilepsia, mal de Alzheimer e AVE, ocorre a excitotoxicidade (Maragakis & Rothstein, 2001). Sendo assim, para tentar desenvolver tratamentos para essas neuropatologias, tem sido constante a busca por substâncias, cujos mecanismos minimizem os danos causados pelo excesso de *L*-Glu.

Neste sentido, uma das maneiras de reduzir a excitotoxicidade consiste no uso de inibidores da liberação de *L*-Glu, como alguns agentes testados em estudos pré-clínicos de isquemia ou em ensaios clínicos de AVE, tais como antagonistas competitivos e não competitivos dos receptores NMDA e AMPA, na tentativa de limitar o tamanho e a gravidade da lesão isquêmica (Danbolt, 2001; Ginsberg, 2008).

Além desta, uma alternativa é o uso de agentes que estimulam a recaptação do *L*-Glu, como o Riluzole, usado no tratamento da ELA, que além de aumentar a recaptação do *L*-Glu, também inibe sua liberação. Portanto, atuando em receptores e transportadores (Azbill, Mu & Springer, 2000; Fumagalli *et al.*, 2008).

A neuroproteção tem por objetivo prevenir a degeneração secundária à lesão, minimizar o dano e maximizar a recuperação do tecido nervoso pós-insulto. Têm sido o alvo da pesquisa médica para doenças degenerativas progressivas que acometem o sistema nervoso (SN), uma vez que essas doenças não têm causa única e não podem ser tratadas até sua remissão. De fato, as similaridades entre as doenças degenerativas do SN propiciam novas estratégias para detecção e tratamento, como, por exemplo, utilizar a retina como parâmetro para a detecção de perda neuronal na doença de Alzheimer (Sivak, 2013).

1.8 Relevância

As peçonhas de aranhas, escorpiões, caracóis marinhos, anêmonas do mar e serpentes, têm sido excelentes fontes de diversidade de compostos, para a descoberta de drogas e como ferramentas farmacológicas para elucidar a estrutura, função e propriedades fisiológicas de canais iônicos (Gui *et al.*, 2014).

Os fármacos utilizados atualmente não são totalmente seguros, apresentando efeitos colaterais graves. Por isso se faz necessária a busca por novos fármacos que apresentem potenciais de seletividade e especificidade.

Neste contexto, diante da necessidade de se buscarem novas terapias para o tratamento dessas patologias, a Pwx10 surge como potencial fármaco neuroprotetor.

1.9 Hipótese

Considerando os danos causados pelo excesso de *L*-Glu no espaço extracelular, decorrente da isquemia e/ou isquemia e reperfusão gerada a partir do aumento da pressão-intraocular (PIO) ocasionada pelo glaucoma experimental, levando a excitotoxicidade, bem como a atividade da Pwx10 em aumentar a recaptação desse neurotransmissor, a hipótese desse estudo é de que esta molécula apresenta um efeito neuroprotetor neste modelo experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.

Analisar os possíveis efeitos de diferentes concentrações da Pwx10, utilizando um modelo de glaucoma agudo, com e sem reperfusão, em ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Quantificar as células viáveis e analisar morfológicamente as lesões, decorrentes do glaucoma experimental agudo, nas retinas dos ratos, de cada grupo experimental, pela histologia (H-E e Fluoro-Jade C);

Comparar o efeito da Pwx10 com os efeitos do Riluzole.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram estabelecidos conforme as diretrizes para uso de animais em pesquisa, constante na lei Nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Esta criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e regulamentou os comitês de ética na experimentação animal (CEUAs). Portanto, este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (protocolo: 2016.5.270.59.2).

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando aproximadamente 300g, que foram adquiridos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, “Campus” de Ribeirão Preto. Os animais foram acondicionados em caixas de acrílico (41cm X 34cm) de 1394 cm², sendo dois animais por caixa e alojados no Biotério de Manutenção do Departamento de Biologia, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura máxima de 26 °C e mínima de 22 °C, umidade máxima de 65% e mínima de 50% controladas, com disponibilidade de água e comida *ad libitum*.

3.2 Coleta dos espécimes de *Parawixia bistrata*, extração das glândulas e reservatórios de veneno

Os espécimes de *P.bistrata* foram coletados em perímetro rural de municípios vizinhos a Ribeirão Preto (SP) e levados ao laboratório. Posteriormente, foram extraídos de cada aranha suas glândulas e reservatórios de veneno, sendo estes acondicionados em microtubos de 1,5 mL(do tipo *Eppendorf*), mantidos a -70 °C, até posterior utilização.

3.3 Isolamento Pwx10 da peçonha de *P. bistrata*

Aproximadamente 3000 glândulas e reservatórios de veneno foram extraídos, macerados e homogeneizados em solução de água deionizada/acetonitrila (H₂O/ACN; 1:1, v/v), formando extratos. Estes extratos foram centrifugados em uma microcentrífuga (Centrífuga Eppendorf 5417 R, rotor F-45-30-11, Alemanha) a 10.600 xg, durante 3 min a uma temperatura de 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e ultrafiltrado em filtro Microcon de 3000 NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*) (Millipore, EUA) em centrifugação a 7.700 xg, à 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5417 R, rotor F-45-30-11, Alemanha). O filtrado resultante, constituído apenas por moléculas com massa molecular inferior a 3000 Da, foi liofilizado e pesado.

3.4 Etapas de isolamento em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

O extrato liofilizado (240 mg) foi solubilizado em 20 mL de H₂O/ACN (9:1, v/v) e filtrado em membrana de acetato de celulose (poro de 0,45 µm, Millipore, EUA). Em seguida, alíquotas de 1,0 mL deste filtrado (12 mg/mL) foram injetadas em CLAE (modelo LC-6A, Shimadzu, Japão) equipado com detector de UV-visível (modelo SPD-6A, Shimadzu, Japão). Para separação dos compostos, foi utilizada uma coluna Shim-pack ODS-C18 em escala preparativa (250 x 20 mm, 5 µm; Shimadzu, Japão). O protocolo desenvolvido para o isolamento da Pwx10 utilizou como fases móveis H₂O com 0,07% de ácido trifluoroacético (TFA) - bomba A; e ACN com 0,07% de TFA - bomba B. O fluxo foi de 9,0 mL/min e os gradientes de eluição foram: de 0 a 10 min: isocrático a 1% de B; de 10 a 40 min: gradiente linear até 30% de B; de 40 a 45 min: gradiente linear até 100% de B (limpeza da coluna).

3.5 Espectrometria de massa

Cada fração obtida foi injetada individualmente no espectrômetro de massas (Micromass, modelo Quattro-LC quadripolo, Reino Unido) com ionização por *eletrospray* (IES+-EM; 10 kL/min) usando-se uma seringa acoplada a uma bomba de injeção (Holliston, modelo 1746,

EUA). O intervalo de varredura utilizado foi de 50-1500 m/z. Uma vez constatada a pureza do composto, este foi ressuspenso em solução salina a 0,9% para realização dos ensaios biológicos.

As etapas de isolamento da fração foram realizadas em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, no Departamento de Físico-Química, da FCFRP-USP.

3.6 Cirurgia: Glaucoma Experimental Agudo - Isquemia/Reperusão

O modelo de glaucoma utilizado neste estudo foi o de aumento de pressão na câmara anterior do olho de ratos Wistar machos (peso 300 g), induzida por um sistema semelhante ao descrito por Louzada-Júnior e colaboradores, (1992) e Guizzo e colaboradores (2005), o qual inclui uma agulha do tipo escalpe (27G) acoplada a um manômetro. O rato, depois de anestesiado com uretana (1,2 g/kg) injetada por via intraperitoneal (i.p), foi contido em uma mesa cirúrgica e, em seguida, se iniciou o aumento da pressão no olho esquerdo (experimental), sendo o olho direito contralateral, o controle. Durante os experimentos de isquemia, a pressão ocular foi aumentada para 120 mmHg, e mantida neste patamar por 45 minutos, controlada por um manômetro. Imediatamente após este período, o animal foi eutanasiado por decapitação. Nos experimentos em que houve reperusão, a pressão foi reduzida aos níveis normais e o animal foi mantido por mais 15 minutos após a isquemia, quando então este foi eutanasiado como descrito anteriormente. As drogas utilizadas para tratamento foram injetadas por via intravítrea através de uma agulha gengival(30G), 15 minutos antes do início da isquemia e no volume de 2,0 µL para todos os tratamentos.

Figura 4. Imagens representativas do procedimento experimental de indução de glaucoma agudo. Rato posicionado em decúbito ventral (A). Em detalhe (B), incisão de agulha do tipo escalpe 27G (1) acoplada a um manômetro que eleva pressão em 120 mmHg e incisão de agulha do tipo gengival 30G (2), para os pré-tratamentos. Fonte: Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas.

3.7 Drogas

As drogas utilizadas neste estudo e suas respectivas concentrações foram:

- Pwx10, nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;
- Riluzole (Sigma- Aldrich, EUA), uma droga que aumenta a recaptação de *L*-Glu (Azbill, Mu & Springer 2000; Fumagalli *et al.*, 2008).
- Além de um grupo veículo (VE) tratado apenas com água milli-Q.

O anestésico utilizado foi a uretana (AcrosOrganics, Bélgica), na concentração de 0,25 g/mL, diluída em solução salina. As concentrações das drogas e Pwx10 estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos e concentrações.

Grupos	Tratamentos	ISQ	ISQ/REP	Histologia	
				H-E	FJC
NAÏVE	Olho saudável (direito)	-	-	X	X
SHAM	Inserção da agulha sem o aumento da PIO	X	X	X	X
VE	Água milli-Q (veículo)	X	X	X	X
RILUZOLE	Riluzole [23,45 µg/µL]	X	X	X	X
Pwx10 0,5	Parawixina10 [0,5 µg/µL]	X	X	X	X
Pwx10 1,0	Parawixina10 [1,0 µg/µL]	X	X	X	X
Pwx10, 2,0	Parawixina10 [2,0µg/µL]	X	X	X	X

Grupos, n=6. ISQ = isquemia, n=3. ISQ/REP = isquemia seguida por reperfusão, n=3. H-E = hematoxilina-eosina. FJC = Fluoro-Jade C. X = sim. - = não.

3.8 Histologia

3.8.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina (H-E)

Para verificar as características estruturais da retina e quantificar as células viáveis foi realizada a coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina (H-E). Esta técnica consiste na marcação de componentes ácidos, como os núcleos, pela hematoxilina e de componentes básicos, como o citoplasma, pela eosina.

Os olhos experimentais (esquerdos) e os contralaterais foram enucleados rapidamente, imersos em solução de ALFAC (85 mL de álcool a 80%, 10 mL de formaldeído a 37% e 5mL de ácido acético) por um período de 18 horas e, em seguida, mantidos em uma solução de álcool a 80% por até 4 dias. Depois de fixados, as córneas e os cristalinos foram removidos, restando uma estrutura em formato de cálice os *eyecups*, que foram destinados à diafanização e desidratação. Para inclusão em parafina, os *eyecups* foram colocados em uma posição na qual a abertura ficava para os lados, na forma de um “C”, usando-se como referência parte do tecido muscular, localizado na parte supranasal. Após a montagem dos blocos de parafina, as

retinas foram cortadas transversalmente a 7 µm de espessura e os cortes, dispostos nas lâminas com albumina e mantidos em estufa a 37 °C por, no mínimo, 24 horas. Os cortes passaram pelo processo de desparafinização e hidratação e, em seguida corados com H-E.

3.8.2 Fluoro-Jade C (FJC)

Para avaliar a degeneração dos neurônios, foi utilizado o marcador FJC. Foi utilizado um protocolo baseado em Schumed *et al.*, (2005), com algumas modificações realizadas por Chidlow *et al.*, (2009). Secções de 7 µm de espessura foram distendidas em lâminas com albumina. Depois foram mantidas em estufa a 37 °C por, no mínimo, 24 horas. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol; um de etanol mais xilol; reidratados em um banho de etanol a 100% e um banho a 70% e um em água milli-Q, por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para uma solução de permanganato de potássio a 0,06% por 10 minutos, lavados em água milli-Q e incubados, durante 15 minutos, em 0,0001% de solução de Fluoro-Jade C. Esta solução foi obtida adicionando 1,0 mL da solução estoque de Fluoro-Jade C (0,001% de Fluoro-Jade C em água milli-Q) à 99 mL da solução de 0,1% de ácido acético em água milli-Q. As lâminas foram lavadas em três banhos de água milli-Q e montadas com uma solução na proporção de 1:3 (v/v) de Fluorshield com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, devido à afinidade pelo material genético citoplasmático é utilizado como marcador nuclear) (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1% de ácido acético.

3.9 Captura das imagens

Para os cortes destinados à coloração H-E, de cada grupo experimental (n=6) foram feitas 5 capturas de imagens por retina, das lâminas destinadas à marcação por FJC 3 imagens por retina foram examinadas, utilizando objetiva de 40x. As imagens foram obtidas utilizando-se um sistema de captura constituído por uma câmera digital colorida (DFC300 FX, Leica Microsystems, Alemanha), conectada a um microscópio de epifluorescência (DM 5000 B,

Leica Microsystems, Alemanha) e ambos conectados a um microcomputador (com processador Intel® Core™ 2-DUO, EUA).

3.10 Análise Qualitativa

Além da organização das camadas, os aspectos morfológicos analisados nas retinas coradas com H-E, após o insulto isquêmico, foram:

Picnose nuclear: ocorre devido a alterações caracterizadas por intensa contração e condensação da cromatina, tornando o núcleo reduzido de volume e hipercorado (Faria, 1977; Filho, 2004);

Vacuolização: ocorre devido ao acúmulo de água nos mitocôndrios, transformando-os em vesículas, e por penetração de água no retículo endoplasmático, dilatando os canais que o formam (Faria, 1977);

Edema extracelular: consiste no acúmulo de líquido no interstício, aumentando o espaço entre as células (Filho, 2004).

3.11 Análise Semi-Quantitativa

A análise das retinas marcadas com FJC foi feita de forma subjetiva, observando-se o aspecto das células FJC+ e o grau de marcação da camada analisada. Para obter um valor estimado dessas observações, utilizou-se uma escala de medidas semi-quantitativas. Essa escala considerou a intensidade de células marcadas com FJC e foi representada como --- = ausência de reatividade, +-- = pouca reatividade, ++- = reatividade moderada e +++ = reatividade intensa. Essa forma de análise foi baseada na escala usada para outros tipos de imunistoquímica (Martinez *et al.*, 2007).

3.12 Análise Quantitativa

Após a obtenção das imagens de retinas coradas com H.E (5 imagens/rato) e coradas com FJC (3 imagens/rato), a contagem das células foi feita manualmente, de forma mascarada, utilizando o “software Image J” (“*National Institutes of Health*”, EUA). As áreas das camadas foram medidas com o auxílio do software Q- Win (Leica Microsystems, Alemanha) e a quantidade de células viáveis por área analisada foi expressa em densidade média (células/mm² ± S.E.M).

Sendo que para análise das imagens do material marcado com FJC foi utilizado um quadro (*frame*) com a mesma região de interesse, para todas as contagens das células da CCG.

3.13 Análise Estatística

Para a análise de dados foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Student Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism (versão 5.0, GraphPad Software, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Analise Qualitativa

4.1.1 Retinas submetidas à Isquemia e Isquemia/Reperusão

Algumas alterações que indicam degeneração tecidual e são comumente encontradas em retinas submetidas à ISQ e ISQ/REP foram observadas. Em todas as retinas dos ratos submetidos a ISQ e ISQ/REP observou-se graus de desorganização, em relação ao controle.

Na figura 5 são apresentadas fotomicrografias representativas das retinas de ratos Wistar, as quais foram comparadas: grupo NAÏVE, VE ISQ e VE ISQ/REP, fica evidente a desorganização celular nas CCG e CNI e edema (seta verde) apresentado de moderado a grave em VE ISQ e VE ISQ/REP. Estão destacadas na figura 5, núcleos picnóticos indicados

com setas vermelhas, células com vacuolização citoplasmática com seta azul e regiões com espaços entre as células nas CCG e CNI caracterizando assim o edema, setas verdes.

Figura 5. Fotomicrografias de campo claro representativas de retinas de ratos Wistar. Comparativo entre grupos NAÏVE (A) n = 6, VE ISQ (B) e VE ISQ/REP (C) n = 3. Coloração HE. Aumento de 400x. Setas vermelhas = núcleos picnóticos; Seta azul = célula vacuolizada; Setas verdes = edema. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

Após 15 minutos de reperfusão, núcleos picnóticos foram observados nas CNI e CCG e edema na CNI. As retinas dos ratos do grupo ISQ/REP apresentaram algumas células vacuolizadas, além de desorganização das camadas. Nas retinas dos ratos que foram injetados com VE [figura 6 ISQ (C) e ISQ/REP (D)], a CCG foi a mais afetada na maioria das retinas dos ratos dos grupos experimentais. Essa camada ainda apresentou variações nos tamanhos dos núcleos. A CNI apresentou muitos núcleos picnóticos e as células estavam deslocadas em alguns casos.

Figura 6. Fotomicrografias de campo claro representativas de retinas de ratos Wistar. Comparativo com SHAM de 60 (A) e 75 min (B), VE ISQ (C) e VE ISQ/REP (D) n = 3. Coloração HE. Aumento de 400x. Setas vermelhas = núcleos picnóticos; Seta azul = célula vacuolizada; Setas verdes = edema. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

4.1.2 Retinas tratadas submetidas à Isquemia e Isquemia/Reperusão

Nas figuras de 7 a 9 estão apresentadas imagens representativas das retinas dos ratos, dos grupos experimentais avaliados neste estudo. As análises qualitativas mostraram que houve uma variação no tamanho e no formato dos núcleos das células presentes na CCG, entre os diferentes tratamentos.

As retinas dos animais tratados com a Pwx10 na concentração de 0,5 µg/µL apresentaram poucos núcleos picnóticos, em comparação com os animais que receberam VE e sinais de edema na CCG e CNI tanto em ISQ (figura 7A) como ISQ/REP (figura 7B). Nas mesmas retinas também foi verificado vacuolização celular na CCG dos ratos submetidos a ISQ/REP (figura 7B).

O tratamento com Pwx10 na concentração de 1,0 µg/µL resultou em redução do número de núcleos picnóticos nas CNI e CCG mais acentuado em ISQ/REP (figura 7D). A CNI apresentou pouco edema e mostrou-se mais conservada após ISQ (figura 7C).

As retinas de ratos pré-tratados com Pwx10 na concentração de 2,0 µg/µL apresentaram menos núcleos picnóticos nas CNI e CCG após ISQ (figura 7E) e ISQ/REP (figura 7F) comparados com VE (figuras 6C e 6D). A CNI mostrou-se bastante conservada após ISQ (figura 7E) e ISQ/REP (figura 7F).

Figura 7. Fotomicrografias de campo claro representativas de retinas de ratos Wistar. Retinas ISQ pré-tratadas com Pwx10 nas concentrações de 0,5 (A e B), 1,0 (C e D) e 2,0 (E e F) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n = 6). Coloração HE. Aumento de 400x. Setas vermelhas = núcleos picnóticos; Setas azuis = células vacuolizadas; Setas verdes = edema. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

As retinas de ratos pré-tratados com o Riluzole apresentaram alguns núcleos picnóticos nas CNI e CCG após ISQ (figura 8A) e ISQ/REP (figura 8B). Nas CCG e CNI apresentaram edema moderado após ISQ (figura 8A) e mais acentuado após ISQ/REP (figura 8B).

Figura 8. Fotomicrografias de campo claro representativas de retinas de ratos Wistar. Retinas ISQ (A) e ISQ/REP (B) (n = 3) pré-tratadas com Riluzole. Coloração HE. Aumento de 400x. Seta vermelha = núcleos picnóticos; Setas verdes = edema. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

Todos os pré-tratamentos feitos com a Pwx10 nas três concentrações, as retinas dos ratos apresentaram aspecto muito semelhante ao apresentado nos animais tratados com o Riluzole. Sendo que Pwx10 na concentração de 0,5 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram maior organização das camadas CCG e CNI e pouco edema, já a Pwx10 na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou uma maior densidade de células na CNI em ISQ.

4.1.3 Fluoro-Jade C

Para avaliar degeneração específica de neurônios, foi realizada a técnica de histoquímica Fluoro-Jade C. Para fins de confirmação, as imagens analisadas apresentavam células viáveis

foi feito em conjunto com a marcação de FJC a marcação com DAPI e suas imagens foram sobrepostas. Nas figuras de 9 a 14 estão apresentadas imagens representativas das retinas dos ratos, de cada grupo experimental.

As retinas dos grupos NAÏVE (figuras 9 A, B e C) não apresentaram neurônios marcados com FJC, já as retinas de ratos SHAM 60 (figuras 9 D, E e F) e SHAM 75 (figuras 9 G, H e I) apresentaram moderada marcação de neurônios com FJC+.

Os ratos que receberam VE, tanto do grupo ISQ (figuras 10 A, B e C) quanto do grupo ISQ/REP (figuras 10 D, E e F), apresentaram grande quantidade de neurônios FJC+ na CCG.

Figura 9. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos do grupo NAÏVE (n = 6) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) SHAM 60 (n = 3) marcado com FJC (D), marcado com DAPI (E) e sobreposição de imagens (F) e SHAM 75 (n = 3) marcado com FJC (G), marcado com DAPI (H) e sobreposição de imagens (I). Aumento de 400x. Seta branca indicando células em degeneração. CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

Figura 10. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos dos grupos VE ISQ (n = 3) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) e VE ISQ/REP (n = 3) marcado com FJC (D), marcado com DAPI (E) e sobreposição de imagens (F). Aumento de 400x. Setas brancas apontando para pontos mais fluorescentes, indicando células em degeneração. Grupo VE (n = 6). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

As retinas dos ratos do grupo ISQ tratados com Riluzole (figuras 11 A, B e C) apresentaram menor quantidade de neurônios FJC+ comparado com o grupo VE (figuras 10 A, B e C) na CCG e intenso em CNI. A retina de animais do grupo ISQ/REP pré-tratados com Riluzole (figura 11 D, E e F) apresentaram menor quantidade de neurônios FJC+, tanto na CCG quanto na CNI, comparado com o grupo VE (figura 10 D, E, e F).

Figura 11. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos dos grupos Riluzole ISQ (n = 3) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) e Riluzole ISQ/REP (n = 3) marcado com FJC (D), marcado com DAPI (E) e sobreposição de imagens (F). Aumento de 400x. Grupo Riluzole (n = 6). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

Animais pré-tratados com Pwx10 na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não apresentaram neurônios FJC+ na CCG em animais ISQ (figuras 12 A, B e C). E apresentaram pouca marcação FJC+ nos animais ISQ/REP (figuras 12 D, E e F).

Figura 12. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ ($n = 3$) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) e Pwx10 na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ/REP ($n = 3$) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C). Aumento de 400x. Grupo Pwx10 a 0,5 ($n = 6$). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

As retinas dos ratos tratados com Pwx10 na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram menor marcação FJC+ para neurônios na CCG, após ISQ (figuras 13 A, B e C) e ISQ/REP (figuras 13 D, E e F). As retinas dos ratos tratados com Pwx10 na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram menos marcação de células FJC+ na CCG e CNI, tanto para ISQ (figuras 14 A, B e C) como após ISQ/REP (figura 14 D, E e F).

Figura 13. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ ($n = 3$) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) e Pwx10 na concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ/REP ($n = 3$) marcado com FJC (D), marcado com DAPI (E) e sobreposição de imagens (F). Aumento de 400x. Setas brancas apontando para pontos mais fluorescentes, indicando células em degeneração. Grupo Pwx10 a 1,0 ($n = 6$). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

Figura 14. Fotomicrografias representativas de secções de retinas de ratos Wistar marcadas com FJC (verde) e DAPI (azul). Retinas dos ratos dos grupos Pwx10 na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ ($n = 3$) marcado com FJC (A), marcado com DAPI (B) e sobreposição de imagens (C) e Pwx10 na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ISQ/REP ($n = 3$) marcado com FJC (D), marcado com DAPI (E) e sobreposição de imagens (F). Aumento de 400x. Setas brancas apontando para pontos mais fluorescentes, indicando células em degeneração. Grupo Pwx10 a 2,0 ($n = 6$). CCG, camada de células ganglionares; CPI, camada plexiforme interna; CNI, camada nuclear interna; CPE, camada plexiforme externa; CNE, camada nuclear externa.

4.2 Análise Semi-Quantitativa

Para a análise semi-quantitativa das retinas marcadas com FJC, um valor foi atribuído de acordo com os aspectos das camadas nucleares. Foi analisada somente a CCG. As retinas dos animais dos grupos NAÏVE e Pwx10 0,5 ISQ não apresentaram marcação de neurônios em degeneração, já as retinas dos animais dos grupos SHAM 60 e SHAM 75 apresentaram pouca reatividade. E as retinas dos animais dos grupos VE ISQ e VE ISQ/REP apresentaram de moderada a intensa reatividade ao FJC.

Os demais grupos apresentaram pouca reatividade, sendo eles o Pwx10 0,5 ISQ/ REP, Pwx10 nas concentrações de 1,0 e 2,0, tanto em ISQ quanto ISQ/REP e as retinas tratadas com Riluzole ISQ e ISQ/REP(Tabela 2).

Tabela 2. Intensidade de células FJC+, na CCG após ISQ e ISQ/REP.

Grupos	CCG	
	ISQUEMIA	ISQUEMIA/REPERFUSÃO
NAÏVE	---	---
SHAM 60	+--	
SHAM 75		+--
VEÍCULO	++-	+++
Pwx10 0,5	---	+--
Pwx10 1,0	+--	+--
Pwx10 2,0	+--	+--
RILUZOLE	+--	+--

Nota: Análise semi-quantitativa de células FJC+ nas retinas de ratos Wistar. Foram analisadas 3 imagens por grupo. A escala contém as seguintes categorias: --- = ausência de reatividade, +-- = pouca reatividade, ++- = reatividade moderada e +++ = reatividade intensa.

4.3 Análise Quantitativa

4.3.1 Retinas submetidas à Isquemia

Nos experimentos de isquemia, as médias da densidade celular mostraram que houve diferença entre os tratamentos na CCG [$F_{(6,98)}=17,00$; $p<0,0001$] e na CNI [$F_{(6,104)}=18,64$; $p<0,0001$].

Na CCG após ISQ (figura 15) as retinas dos ratos dos grupos SHAM 60 apresentaram uma redução da densidade celular de 28,67% comparado com o grupo NAÏVE.

As retinas dos ratos que receberam veículo (VE) apresentaram uma diminuição na densidade celular de 47,68%, em relação às retinas do grupo NAÏVE e uma perda de 19,01% em relação às retinas do grupo SHAM 60. Os tratamentos com Pwx10 na dose de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, protegeram 16,1% na CCG, quando comparado com o grupo VE ISQ. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 12,7% a mais de proteção, quando comparadas com as do grupo VE ISQ. O tratamento com a Pwx10 na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protegeu significativamente 22,0% da CCG, quando comparadas ao grupo VE ISQ. O Riluzole protegeu significativamente 22,6% da CCG, em comparação com o grupo VE ISQ

A análise dos dados mostrou que o tratamento com a Pwx10 nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi efetivo em proteger a CCG da neurodegeneração decorrente do processo de isquemia, apresentando uma neuroproteção de 16,1, 12,7 e 22,0%, respectivamente, em relação ao grupo VE ISQ (figura 15).

Figura 15. Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ se referem ao grupo VE ISQ. Grupo NAÏVE ($n = 6$), SHAM 60, VE ISQ, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 ($n = 3$).

Na CNI após ISQ (figura 16) as retinas dos ratos dos grupos SHAM 60 apresentaram uma redução da densidade celular de 7,23%, comparado com o grupo NAÏVE.

As retinas dos ratos do grupo VE ISQ apresentaram uma diminuição na densidade celular de 32,46%, em relação às retinas do grupo NAÏVE e uma perda de 25,23% em relação às retinas do grupo SHAM 60. O tratamento com Pwx10 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou uma pequena neuroproteção se comparado com o grupo VE ISQ de 0,05% na CNI. Por outro lado, as retinas tratadas com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 22,7% a mais de proteção, quando comparadas com as do grupo VE ISQ. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 6,0% de células a mais, quando comparadas ao grupo VE ISQ. O Riluzole protegeu significativamente em 24,6% a CNI, em comparação a CNI do grupo VE ISQ

A análise dos dados mostrou que o tratamento com a Pwx10 nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi efetivo em proteger a CNI da neurodegeneração decorrente do processo de ISQ, apresentando uma neuroproteção de 0,05, 22,7 e 6,0%, respectivamente, em relação ao grupo VE ISQ (figura 16). Sendo que os ratos tratados com a concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 não apresentaram diferença significativa quando comparada aos grupos NAÏVE e Riluzole.

Figura 16. Gráfico representativo da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CNI das retinas de ratos submetidos à ISQ. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas *** $p < 0,001$, se referem ao grupo VE ISQ. Grupo NAÏVE ($n = 6$), SHAM 60, VE ISQ, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 ($n = 3$).

4.3.2 Retinas submetidas à Isquemia/Reperfusão

Nos experimentos de ISQ/REP, as médias das densidades celulares mostraram que houve diferença entre os tratamentos na CCG [$F_{(6,101)}=47,56$; $p < 0,0001$], na CNI [$F_{(6,102)}=71,47$; $p < 0,0001$].

Na CCG após ISQ/REP (figura 17) as retinas dos ratos dos grupos SHAM 75 apresentaram uma redução da densidade celular de 54,34%, quando comparado com o grupo NAÏVE.

As retinas dos ratos do grupo VE ISQ/REP apresentaram uma diminuição na densidade celular de 58,08%, em relação às retinas dos ratos do grupo NAÏVE e uma diminuição de 3,74% em relação às retinas dos ratos do grupo SHAM 75. Os tratamentos com Pwx10 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram neuroproteção se comparado com o grupo VE ISQ/REP de 13,5% na CNI. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 14,1% a mais de proteção, quando comparadas com as do grupo VE ISQ/REP. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protegeram significativamente 32,1%, das retinas dos ratos, quando comparadas ao grupo VE ISQ/REP. O Riluzole protegeu 16,1% da CNI, em comparação com o grupo VE ISQ/REP.

Comparando o efeito neuroprotetor das drogas testadas, sob a densidade de células nas CCG o Riluzole apresentou efeito neuroprotetor de 2,65 e 2,06% a mais que as concentrações 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10, respectivamente, não sendo significativo e apresentou 15,95% menor, quando comparado com o efeito neuroprotetor de Pwx10 na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 17. Gráfico representativo da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ referente ao grupo VE ISQ ### $p < 0,001$ referente ao grupo Riluzole. Grupo NAÏVE ($n = 6$), SHAM 75, VE ISQ/REP, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 ($n = 3$).

Na CNI após ISQ/REP (figura 18) as retinas dos ratos dos grupos SHAM 75 apresentaram uma redução da densidade celular de 80,9% comparado com o grupo saudável NAÏVE.

As retinas dos ratos do grupo VE ISQ/REP apresentaram uma diminuição na densidade celular de 84,6%, em relação às retinas dos ratos do grupo NAÏVE e uma diminuição na densidade celular de 3,7% em relação às retinas dos ratos do grupo SHAM 75. Os ratos tratados com Pwx10 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram neuroproteção comparado aos ratos do grupo VE ISQ/REP de 75,9% na CNI. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 52,8% a mais de proteção, quando comparadas com as do grupo VE ISQ/REP. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protegeram significativamente 56,6%,

das retinas quando comparadas ao grupo VE ISQ/REP. O Riluzole protegeu 52,9% de CNI, em comparação com o grupo VE ISQ/REP.

Comparando o efeito neuroprotetor das drogas testadas, sob a densidade de células nas CNI a concentração de 0,5 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 apresentaram maior efeito neuroprotetor que o Riluzole, sendo 23,05 e 3,73%, respectivamente. Já comparando os ratos tratados com Riluzole com o tratamento dos ratos da concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 seu efeito foi apenas 0,16% maior, não apresentando diferenças estatísticas significativas com relação a esses tratamentos. Sendo que os ratos tratados com a concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo NAÏVE.

Figura 18. Gráfico representativo da estimativa da densidade média de neurônios viáveis na CNI das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas: *** $p < 0,001$ referente ao grupo VE ISQ/REP, ### $p < 0,001$ referente ao grupo Riluzole. Grupo NAÏVE ($n = 6$), SHAM 75, VE ISQ/REP, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 ($n = 3$).

4.3.3 Análise Quantitativa dos neurônios marcados com FJC

A presença de células das retinas marcadas com FJC+ estão representadas nas figuras 19 e 20. Foram contabilizadas apenas as células da CCG. As retinas dos ratos dos grupos NAÏVE

e SHAM apresentaram baixa intensidade de neurônios em degeneração após ISQ e ISQ/REP. Já os animais do grupo VE apresentaram marcação intensa após ISQ e ISQ/REP. Os demais grupos apresentaram pouca marcação na CCG.

Nos experimentos de ISQ, as médias da densidade celular mostraram que houve diferença entre os tratamentos na CCG [$F_{(6,59)}=7,279$; $p<0,0001$].

Comparando com o grupo VE ISQ, as retinas dos ratos do grupo NAÏVE apresentaram 11,62% de células marcadas com FJC+. As retinas dos ratos do grupo SHAM 60 apresentou 24,83% de células marcadas FJC+. Em relação às retinas dos ratos do grupo VE ISQ o grupo de ratos tratados com Pwx10 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou neuroproteção de 84,5%, apresentando 15,5% de células FJC+. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 72,1% de neuroproteção, quando comparadas com as dos ratos do grupo VE ISQ, apresentando 27,9% de células FJC+. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram neuroproteção de 81,4% quando comparadas ao grupo VE ISQ apresentando 18,6% de células FJC+. O Riluzole protegeu 59,7% de células da CCG em comparação com o grupo VE ISQ apresentando marcação de 40,3% de FJC+.

Comparando o efeito neuroprotetor das drogas testadas, no modelo de ISQ sob a presença de células marcadas com FJC+, nas CCG as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 apresentaram um maior efeito neuroprotetor de 24,8, 12,4 e 21,7%, respectivamente, se comparado com os animais tratados do grupo Riluzole. Sendo que todas as concentrações de Pwx10 não apresentaram diferença significativa quando comparada ao grupo NAÏVE.

Figura 19. Gráfico representativo da estimativa da densidade média de neurônios marcados com FJC+ na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas *** $p < 0,001$, se referem ao grupo VE ISQ. Grupo NAÏVE (n = 6), SHAM 60, VE ISQ, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 (n = 3).

Nos experimentos de ISQ/REP, as médias da densidade celular mostraram que houve diferença entre os tratamentos na CCG [$F_{(6,59)} = 11,72$; $p < 0,0001$].

Comparando com o grupo VE ISQ/REP, as retinas dos ratos do grupo NAÏVE apresentaram 7,58% de células marcadas com FJC+. As retinas dos ratos do grupo SHAM 75 apresentou 24,26% de células marcadas FJC+. Em relação com as retinas dos ratos do grupo VE ISQ/REP o grupo de ratos tratados com Pwx10 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentou neuroproteção de 81,8%, apresentando 18,2% de células FJC+. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram 83,8% de neuroproteção, quando comparadas com as retinas dos ratos do grupo VE ISQ/REP, apresentando 16,2% de células FJC+. As retinas dos ratos tratados com Pwx10 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tiveram uma proteção significativa de 73,7% quando comparadas ao grupo VE ISQ/REP apresentando 26,3% de células FJC+. O Riluzole protegeu 67,5% de células da

CCG dos ratos tratados em comparação com o grupo VE ISQ/REP apresentando marcação de 32,5% FJC+.

Comparando o efeito neuroprotetor das drogas testadas, no modelo de ISQ/REP sob a presença de células marcadas com FJC+ nas CCG as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Pwx10 apresentaram um maior efeito neuroprotetor de 14,3, 16,3, 6,2%, respectivamente, se comparado com os ratos do grupo Riluzole. Sendo que todas as concentrações de Pwx10 não apresentaram diferença significativa quando comparada ao grupo NAÏVE.

Figura 20 Gráfico da estimativa da densidade média de neurônios marcados com FJC+ na CCG das retinas de ratos submetidos à ISQ/REP. Os dados estão representados como médias $\pm$ E.P.M dos grupos experimentais, sendo que as significâncias estatísticas *** $p < 0,001$, se referem ao grupo VE ISQ/REP. Grupo NAÏVE ($n = 6$), SHAM 75, VE ISQ/REP, Riluzole, Pwx10 0,5, Pwx10 1,0 e Pwx10 2,0 ($n = 3$).

5 DISCUSSÃO

Artrópodes são um dos grupos de animais mais antigos da terra, de uma forma muito eficiente os compostos químicos presentes em seus venenos são responsáveis por esse sucesso, resultado de um processo evolutivo intenso e elaborado, os venenos produzidos por artrópodes têm em seu repertório uma gama de moléculas biologicamente ativas. Quando inoculadas em mamíferos estas moléculas induzem efeitos diversos, incluindo ações no sistema nervoso central (Mortari & Siqueira Cunha, 2013).

No SNC de mamíferos, os compostos de veneno podem inibir ou estimular estruturas com afinidade e especificidade, tais como: Canais de ions, receptores, transportadores e neurotransmissores. Devido a estas propriedades, tais compotos têm estimulado estudos em busca de ferramentas para ajudar a compreender mecanismos neurais, bem como na prospecção de novos fármacos para injúrias que acometem o SNC (Mortari & Siqueira Cunha, 2013).

Diante deste contexto, pesquisadores do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas da FFCLRP-USP isolaram da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*, dentre outros compostos neuroativos, a Pwx10. Esta molécula, quando administrada por via intracerebroventricular, bloqueou crises convulsivas induzidas por ácido kainico e PTZ, bem como apresentou ação na inibição da neurotransmissão excitatória de *L*-Glu. Além de não induzir alterações locomotoras em experimentos em ratos Wistar, submetidos ao teste do *rotaroad*, comumente relatados após a administração de antagonistas do receptor glutamatérgico (Fachim *et al.*, 2011). Fachim e colaboradores (2011) observaram, em estudos *in vitro*, que a Pw10 exerce sua ação potencializando a retirada do *L*-Glu do espaço extracelular, provavelmente por meio dos transportadores específicos deste neurotransmissor.

O *L*-Glu é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central dos mamíferos. Contudo, a sua acumulação nos espaços extracelulares causa morte celular de

neurônios através de mecanismos de excitotoxicidade devido principalmente ao aumento da permeabilidade ao íon de cálcio (Bai *et al.*, 2013), os quais desencadeiam o processo de apoptose.

O transportador de *L*-Glu EAAT2 em humanos e seu homólogo GLT-1 em ratos é expresso em todo o cérebro, na medula espinhal, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, e é responsável por aproximadamente 95% do transporte de *L*-Glu no SNC, demonstrando sua função central na manutenção da homeostase do *L*-Glu extracelular (Mortensen *et al.*, 2015).

A excitotoxicidade mediada pelo *L*-Glu tem uma contribuição importante para a morte das células ganglionares da retina em glaucoma e condições relacionadas com a isquemia, tanto em pacientes humanos, quanto em animais experimentais de glaucoma (Bai *et al.*, 2013).

Tendo em vista esses fatos, o principal objetivo deste estudo foi investigar a atividade da Pwx10 no modelo experimental de glaucoma agudo com e sem reperfusão em ratos Wistar, avaliando as alterações histopatológicas associadas a estes modelos. Ainda, comparar os efeitos da Pwx10 com os efeitos do Riluzole, um neuroprotetor utilizado, principalmente, no tratamento da ELA e em outras doenças neurodegenerativas.

Estudos com isquemia da retina se beneficiam pelo acesso facilitado que o experimentador tem ao tecido nervoso, contornando uma série de complicações advindas de outros métodos, para o estudo do processo isquêmico no tecido nervoso (Louzada-Júnior *et al.*, 1992; Osborne *et al.*, 2004).

Devido ao processo de isquemia inúmeras reações ocorrem em resposta como redução de ATP, desequilíbrio iônico, liberação de neurotransmissores, geração de radicais livres e envolvimento do sistema imune resultando em um quadro de degeneração tecidual que pode causar a morte de neurônios da CCG. Com isso, o meio extracelular que circunda estes neurônios sofre alterações, provocando uma segunda lesão, mais lenta e progressiva, que

atinge os neurônios adjacentes. Este fato pode explicar porque a terapia de redução da PIO, no glaucoma, às vezes é ineficiente no controle da redução do campo visual em pacientes (Weinreb, 2007). Em estudos Celiker e colaboradores (2016) apontam que não só camadas de células ganglionares e suas extensões axonais, mas também todas as camadas da retina, incluindo os fotorreceptores são afetados pelo glaucoma.

Estudos imunocitoquímicos têm mostrado que elevados níveis de *L*-Glu são encontrados em células bipolares, células ganglionares da retina, fotorreceptores e células amácrinas (Pow, 2001).

Schneider *et al.*, (2014) apontam que a família de transportadores excitatórios de aminoácidos (EAATs) são cruciais para a captação de *L*-Glu da retina e consequentemente, para a transmissão do sinal durante percepção visual. EAAT1/GLAST medeia a captação de *L*-Glu nas células de Muller (Rauen *et al.*, 2004), enquanto EAAT2/GLT-1 é o responsável pelo transporte de *L*-Glu em fotorreceptores, células bipolares e amácrinas. Experimentos com animais nocaute demonstraram efeitos profundos sobre o sinal visual após a remoção EAAT1/GLAST, mas apenas ligeira mudança na transmissão em animais nocaute para EAAT2/GLT-1. Esses dados indicam que o EAAT1/GLAST é o principal transportador de *L*-Glu da retina que controla a transmissão do sinal sináptica, enquanto EAAT2/GLT-1 em sua maioria desempenha um papel na neuroproteção contra excitotoxicidade do *L*-Glu (Harada *et al.*, 1998).

Transportadores do tipo EAAT3/EAAC1 podem ser encontrado em células amácrinas, células horizontais e ganglionares, com localização predominantemente não-sináptica de forma que um papel importante na neurotransmissão glutamatérgica parece improvável (Wiessner *et al.*, 2002). Transportadores do tipo EAAT4 foram identificados em astrócitos e no epitélio da camada pigmentar da retina, pode servir como um sistema de *back-up* impedindo que o *L*-Glu escape para além dos limites da retina. Transportador EAAT5 é

expresso em fotorreceptores, células amácrinas e células bipolar, sabe-se que exibem baixas taxas de transporte de *L*-Glu e grandes condutâncias de ânions. Portanto, tem sido sugerido agir principalmente como canal de íons para cloro ativado por *L*-Glu (Schneider *et al.*, 2014).

Os resultados do presente trabalho indicam que o pré-tratamento com as concentrações de Pwx10 foi efetivo em reduzir o dano nas CCG e CNI causado pelo glaucoma tanto ISQ como ISQ/REP. As análises histológicas com marcação de H.E indicam que houve proteção significativa das células em ambas as camadas da retina dos ratos tratados com Riluzole e com as diferentes concentrações da Pwx10.

Comparando os resultados da neuroproteção apresentada pela Pwx10 com os do Riluzole, não houveram diferenças significativas com relação a neuroproteção na maioria dos demais tratamentos. Observa-se que os efeitos neuroprotetores do Riluzole apresentam um certo padrão em proteger ambas as camadas. Já as concentrações de Pwx10 oscilam nas respostas neuroprotetoras mais eficaz dependendo da camada, do tipo do modelo experimental, se com reperfusão ou não. Sendo a Pwx10 de 0,5 µg/µL mais eficiente em proteger a CNI na ISQ/REP, a Pwx10 de 1,0 µg/µL mais eficiente em proteger a CNI em modelo de glaucoma ISQ e a Pwx10 de 2,0 µg/µL apresenta maior resposta de neuroproteção em CCG, em modelo de ISQ/REP.

O FJC tem uma alta afinidade com moléculas de neurodegeneração (Schmued *et al.*, 2005). Assumindo que o FJC+ marca células em processo de morte em nosso trabalho ficou evidente sua marcação em células CCG na ISQ e ISQ/REP, corroborando com os resultados da quantificação com H.E, nos quais observou-se que essas camadas apresentaram grande perda celular, principalmente nos ratos dos grupos VE.

Com relação aos tratamentos das células marcadas com FJC+ todas as concentrações de Pwx10, foram efetivas em proteger acima de 70% das células das retinas tanto em modelo de

ISQ como em ISQ/REP, comparando com animais tratados com Riluzole, os quais apresentaram máximo de proteção de 67% nessa análise.

A Pwx10 apresentou efeitos neuroprotetores em ambas camadas analisadas como nos modelos testado e podem ser atribuídos à propriedade intrínseca desta molécula em potencializar a captação de *L*-Glu, possivelmente por meio dos transportadores deste neurotransmissor.

Tais resultados levantam questões sobre o funcionamento da molécula Pwx10, se atua bloqueando transportadores EAAT1/GLAST, aumentando e/ou estimulando a atividade dos transportadores EAAT 2/GLT-1. EAAT4 ou EAAT5.

Diante desses fatos relacionando os efeitos da Pwx10 em subunidades de transportadores, no glaucoma experimental agudo, não foi possível realizar imunomarcação. Entretanto os dados obtidos sugerem que o efeito neuroprotetor da Pwx10, na isquemia retiniana esta relacionado ao sistema glutamatérgico, seja atuando em transportadores presentes na glia, retirando *L*-Glu da fenda sináptica ou atuando como bloqueadores de receptores NMDA.

A neuroproteção pode ser definida para o glaucoma como qualquer intervenção, que impeça a morte de células da CCG (Doozandeh & Yazdani, 2016).

Baseado nas análises a Pwx10 provou ser neuroprotetora no modelo de glaucoma, por proteger a CCG.

6 CONCLUSÕES

Corroborando a hipótese levantada, os resultados deste estudo mostram que a Pwx10 apresentou efeito neuroprotetor sobre células das camadas da retina, contra o insulto isquêmico. Esse achado pode ser somado ao efeito neuroprotetor apresentado por este composto neuroativo em outros modelos como, em atividade anticonvulsivante em ratos submetidos a *status epilepticus*, colaborando para um melhor entendimento de seu mecanismo de ação.

Estudos complementares ainda precisam ser realizados para obtermos uma melhor compreensão dos efeitos neuroprotetores da Pwx10, bem como seu exato mecanismo de ação. No entanto, se comparados com os efeitos apresentados pelo Riluzole, único fármaco neuroprotetor liberado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da ELA, esta molécula pode ser apontada como uma ferramenta bastante interessante para o desenvolvimento de novos fármacos e terapias, para o tratamento de glaucoma e outras doenças neurodegenerativas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- . Renato Guizzo, . Marcelo Araujo Rodrigues Cairrao, . Joaquim Coutinho-Netto, . Antonio Renato Meirelles e Silva, . Norberto Cysne Coimbra, and . Wagner Ferreira dos Santos. 2005. "Neuroprotection in Acute Ischemia and Ischemia/Reperfusion in Rat Retina." *International Journal of Pharmacology* 1 (4): 369–75. doi:10.3923/ijp.2005.369.375.
- Agudo-Barriuso, M, M P Villegas-Pérez, J Miralles de Imperial, and M Vidal-Sanz. 2013. "Anatomical and Functional Damage in Experimental Glaucoma." *Current Opinion in Pharmacology* 13 (1): 5–11. doi:10.1016/j.coph.2012.09.006.
- Azbill, R D, X Mu, and J E Springer. 2000. "Riluzole Increases High-Affinity Glutamate Uptake in Rat Spinal Cord Synaptosomes." *Brain Research* 871 (2): 175–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899284>.
- Bai, Ning, Tomomi Aida, Michiko Yanagisawa, Sayaka Katou, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina, and Kohichi Tanaka. 2013. "NMDA Receptor Subunits Have Different Roles in NMDA-Induced Neurotoxicity in the Retina." *Molecular Brain* 6 (1). Molecular Brain: 34. doi:10.1186/1756-6606-6-34.
- Beleboni, Renê Oliveira, Renato Guizzo, Andréia Cristina Karklin Fontana, Andrea Baldocchi Pizzo, Ruither Oliveira Gomes Carolino, Leonardo Gobbo-Neto, Norberto Peporine Lopes, Joaquim Coutinho-Netto, and Wagner Ferreira Dos Santos. 2006. "Neurochemical Characterization of a Neuroprotective Compound from Parawixia Bistriata Spider Venom That Inhibits Synaptosomal Uptake of GABA and Glycine." *Molecular Pharmacology* 69 (6): 1998–2006. doi:10.1124/mol.105.017319.
- Celiker, Hande, Nursen Yuksel, Seyhun Solakoglu, Levent Karabas, Fadime Aktar, and Yusuf Caglar. 2016. "Neuroprotective Effects of Memantine in the Retina of Glaucomatous Rats: An Electron Microscopic Study." *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 11 (2): 174. doi:10.4103/2008-322X.183934.
- Chang, Elma E, and Jeffrey L Goldberg. 2012. "Glaucoma 2.0: Neuroprotection, Neuroregeneration, Neuroenhancement." *Ophthalmology* 119 (5): 979–86. doi:10.1016/j.ophtha.2011.11.003.
- Chen, Baihua, and Luosheng Tang. 2011. "Protective Effects of Catalase on Retinal Ischemia/reperfusion Injury in Rats." *Experimental Eye Research* 93 (5): 599–606. doi:10.1016/j.exer.2011.07.007.
- Chidlow, Glyn, John P M Wood, Ghafar Sarvestani, Jim Manavis, and Robert J. Casson. 2009. "Evaluation of Fluoro-Jade C as a Marker of Degenerating Neurons in the Rat Retina and Optic Nerve." *Experimental Eye Research* 88 (3). Elsevier Ltd: 426–37. doi:10.1016/j.exer.2008.10.015.
- Choi, D W, and S M Rothman. 1990. "The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death." *Annual Review of Neuroscience* 13: 171–82. doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.001131.
- Choi, Dennis W. 2005. "Neurodegeneration: Cellular Defences Destroyed." *Nature* 433 (7027): 696–98. doi:10.1038/433696a.
- Collingridge, G L, and R A Lester. 1989. "Excitatory Amino Acid Receptors in the Vertebrate Central Nervous System." *Pharmacological Reviews* 41 (2): 143–210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2558391>.
- Cromer, Brett A, and Peter McIntyre. 2008. "Painful Toxins Acting at TRPV1." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 51 (2): 163–73. doi:10.1016/j.toxicon.2007.10.012.
- Danbolt, N C. 2001. "Glutamate Uptake." *Progress in Neurobiology* 65 (1): 1–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436>.

- Doozandeh, Azadeh, and Shahin Yazdani. 2016. "Neuroprotection in Glaucoma." *Journal of Ophthalmic and Vision Research* 11 (2): 209. doi:10.4103/2008-322X.183923.
- Escoubas, Pierre, and Lachlan Rash. 2004. "Tarantulas: Eight-Legged Pharmacists and Combinatorial Chemists." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 43 (5): 555–74. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.007.
- Fachim, Helene Aparecida, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, Adriana Colsera Pereira, René Oliveira Beleboni, Leonardo Gobbo-Neto, Norberto Peporine Lopes, Joaquim Coutinho-Netto, and Wagner Ferreira dos Santos. 2011. "Neurobiological Activity of Parawixin 10, a Novel Anticonvulsant Compound Isolated from Parawixia Bistriata Spider Venom (Araneidae: Araneae)." *Epilepsy & Behavior: E&B* 22 (2). Elsevier Inc.: 158–64. doi:10.1016/j.yebeh.2011.05.008.
- Faria, José Lopes. 1977. *Anatomia Patológica Geral*. 2ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Filho, G. B. 2004. *Bogliolo Patologia Geral*. 3º. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Fitzpatrick, David, and Richard D. Mooney. 2012. "Sensation and Sensory Processing." In *Neuroscience*, 841.
- Fontana, a C, M a Cairrão, a J Colusso, W F Santos, and J Coutinho-Netto. 2000. "Paralizing Activity of the Parawixia Bistriata Crude Venom in Termites: A New Bioassay." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 38 (1): 133–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669018>.
- Fontana, Andr??ia C K. 2015. "Current Approaches to Enhance Glutamate Transporter Function and Expression." *Journal of Neurochemistry* 134 (6): 982–1007. doi:10.1111/jnc.13200.
- Fontana, Andréia Cristina Karklin, Renato Guizzo, Renê de Oliveira Beleboni, Antonio Renato Meirelles E Silva, Norberto Cysne Coimbra, Susan G Amara, Wagner Ferreira dos Santos, and Joaquim Coutinho-Netto. 2003. "Purification of a Neuroprotective Component of Parawixia Bistriata Spider Venom That Enhances Glutamate Uptake." *British Journal of Pharmacology* 139 (7): 1297–1309. doi:10.1038/sj.bjp.0705352.
- Fontana, Andréia Cristina Karklin, Renê de Oliveira Beleboni, Marcin Wlodzimierz Wojewodzic, Wagner Ferreira Dos Santos, Joaquim Coutinho-Netto, Nina Julie Grutle, Spencer D Watts, Niels Christian Danbolt, and Susan G Amara. 2007. "Enhancing Glutamate Transport: Mechanism of Action of Parawixin1, a Neuroprotective Compound from Parawixia Bistriata Spider Venom." *Molecular Pharmacology* 72 (5): 1228–37. doi:10.1124/mol.107.037127.
- Fumagalli, Elena, Marcella Funicello, Thomas Rauen, Marco Gobbi, and Tiziana Mennini. 2008. "Riluzole Enhances the Activity of Glutamate Transporters GLAST, GLT1 and EAAC1." *European Journal of Pharmacology* 578 (2–3): 171–76. doi:10.1016/j.ejphar.2007.10.023.
- Gauthier, Angela C, and Ji Liu. 2016. "Neurodegeneration and Neuroprotection in PD.pdf" 89: 73–79.
- Gelfuso, Erica a, José L Liberato, Alexandra O S Cunha, Márcia R Mortari, Renê O Beleboni, Norberto P Lopes, and Wagner F Dos Santos. 2013. "Parawixin2, a Novel Non-Selective GABA Uptake Inhibitor from Parawixia Bistriata Spider Venom, Inhibits Pentylenetetrazole-Induced Chemical Kindling in Rats." *Neuroscience Letters* 543 (May). Elsevier Ireland Ltd: 12–16. doi:10.1016/j.neulet.2013.02.074.
- Gelfuso, Erica Aparecida, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, Marcia Renata Mortari, Jose Luiz Liberato, Karina Haddad Paraventi, Rene Oliveira Beleboni, Joaquim Coutinho-Netto, Norberto Peporine Lopes, and Wagner Ferreira dos Santos. 2007. "Neuropharmacological Profile of FrPbAII, Purified from the Venom of the Social Spider Parawixia Bistriata (Araneae, Araneidae), in Wistar Rats." *Life Sciences* 80 (6): 566–72. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.002.

- Ginsberg, Myron D. 2008. "Neuroprotection for Ischemic Stroke: Past, Present and Future." *Neuropharmacology* 55 (3): 363–89. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.12.007.
- Gui, Junhong, Boyi Liu, Guan Cao, Andrew M. Lipchik, Minervo Perez, Zoltan Dekan, Mehdi Mobli, et al. 2014. "A Tarantula-Venom Peptide Antagonizes the TRPA1 Nociceptor Ion Channel by Binding to the S1-S4 Gating Domain." *Current Biology* 24 (5). Elsevier Ltd: 473–83. doi:10.1016/j.cub.2014.01.013.
- Harada, T, C Harada, M Watanabe, Y Inoue, T Sakagawa, N Nakayama, S Sasaki, et al. 1998. "Functions of the Two Glutamate Transporters GLAST and GLT-1 in the Retina." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8): 4663–66.
- Hernández, María, J Haritz Urcola, and Elena Vecino. 2008. "Retinal Ganglion Cell Neuroprotection in a Rat Model of Glaucoma Following Brimonidine, Latanoprost or Combined Treatments." *Experimental Eye Research* 86 (5): 798–806. doi:10.1016/j.exer.2008.02.008.
- Hughes, W F. 1991. "Quantitation of Ischemic Damage in the Rat Retina." *Experimental Eye Research* 53 (5): 573–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743256>.
- Jeng, Yung-Yue, Nien-Ting Lin, Pen-Heng Chang, Yuan-Ping Huang, Victor Fei Pang, Chen-Hsuan Liu, and Chung-Tien Lin. 2007. "Retinal Ischemic Injury Rescued by Sodium 4-Phenylbutyrate in a Rat Model." *Experimental Eye Research* 84 (3): 486–92. doi:10.1016/j.exer.2006.11.001.
- Kalesnykas, G, T Tuulos, H Uusitalo, and J Jolkkonen. 2008. "Neurodegeneration and Cellular Stress in the Retina and Optic Nerve in Rat Cerebral Ischemia and Hypoperfusion Models." *Neuroscience* 155 (3): 937–47. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.038.
- Kawaguchi, Masahiko, Hitoshi Furuya, and Piyush M Patel. 2005. "Neuroprotective Effects of Anesthetic Agents." *Journal of Anesthesia* 19 (2): 150–56. doi:10.1007/s00540-005-0305-5.
- King, Glenn F. 2004. "The Wonderful World of Spiders: Preface to the Special Toxicon Issue on Spider Venoms." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 43 (5): 471–75. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.001.
- Klint, Julie K, Géza Berecki, Thomas Durek, Mehdi Mobli, Oliver Knapp, Glenn F King, David J Adams, Paul F Alewood, and Lachlan D Rash. 2014. "Isolation, Synthesis and Characterization of ω -TRTX-Cc1a, a Novel Tarantula Venom Peptide That Selectively Targets L-Type Cav Channels." *Biochemical Pharmacology* 89 (2): 276–86. doi:10.1016/j.bcp.2014.02.008.
- Levi, H W. 1992. "Spiders of the Orb-Weaver Genus *Parawixia* in America (Araneae : Araneidae)." *Bulletin of The Museum of Comparative Zoology* 153: 1–46. <http://biostor.org/reference/614>.
- Liberato, José Luiz, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, Márcia Renata Mortari, Erica Aparecia Gelfuso, René De Oliveira Belebony, Joaquim Coutinho-Netto, and Wagner Ferreira dos Santos. 2006. "Anticonvulsant and Anxiolytic Activity of FrPbAII, a Novel GABA Uptake Inhibitor Isolated from the Venom of the Social Spider *Parawixia Bistriata* (Araneidae: Araneae)." *Brain Research* 1124 (1): 19–27. doi:10.1016/j.brainres.2006.09.052.
- Lin, Yuan, Guilian Tian, Kenny Roman, Chalonda Handy, Joseph B Travers, Chien-Liang Glenn Lin, and Robert L Stephens. 2009. "Increased Glial Glutamate Transporter EAAT2 Expression Reduces Visceral Nociceptive Response in Mice." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296 (1): G129–34. doi:10.1152/ajpgi.90556.2008.
- Lipton, P. 1999. "Ischemic Cell Death in Brain Neurons." *Physiological Reviews* 79 (4):

- 1431–1568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508238>.
- Louzada-Júnior, P, J J Dias, W F Santos, J J Lachat, H F Bradford, and J Coutinho-Netto. 1992. "Glutamate Release in Experimental Ischaemia of the Retina: An Approach Using Microdialysis." *Journal of Neurochemistry* 59 (1): 358–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351929>.
- Machado, Angelo B. M. 2000. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª. São Paulo: Atheneu.
- Maragakis, N J, and J D Rothstein. 2001. "Glutamate Transporters in Neurologic Disease." *Archives of Neurology* 58 (3): 365–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255439>.
- Martinez, Giuseppa, Giuseppe Musumeci, Carla Loreto, and Maria Luisa Carnazza. 2007. "Immunohistochemical Changes in Vulnerable Rat Brain Regions after Reversible Global Brain Ischaemia." *Journal of Molecular Histology* 38 (4): 295–302. doi:10.1007/s10735-007-9102-9.
- Meldrum, B S. 2000. "Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology." *The Journal of Nutrition* 130 (4S Suppl): 1007S–15S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736372>.
- Min, Jia-Wei, Wan-Hong Liu, Xiao-Hua He, and Bi-Wen Peng. 2013. "Different Types of Toxins Targeting TRPV1 in Pain." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 71 (September). Elsevier Ltd: 66–75. doi:10.1016/j.toxicon.2013.05.016.
- Mortari, Márcia Renata, and Alexandra Olimpio Siqueira Cunha. 2013. "New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods." *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*, 91–117. doi:dx.doi.org/10.5772/ 52382.
- Mortensen, Ole V., Jos?? L. Liberato, Joaquim Coutinho-Netto, Wagner F. Dos Santos, and Andr??ia C K Fontana. 2015. "Molecular Determinants of Transport Stimulation of EAAT2 Are Located at Interface between the Trimerization and Substrate Transport Domains." *Journal of Neurochemistry* 133 (2): 199–210. doi:10.1111/jnc.13047.
- Mu, X, R D Azbill, and J E Springer. 2000. "Riluzole and Methylprednisolone Combined Treatment Improves Functional Recovery in Traumatic Spinal Cord Injury." *Journal of Neurotrauma* 17 (9): 773–80. doi:10.1089/neu.2000.17.773.
- Nakanishi, S, Y Nakajima, M Masu, Y Ueda, K Nakahara, D Watanabe, S Yamaguchi, S Kawabata, and M Okada. 1998. "Glutamate Receptors: Brain Function and Signal Transduction." *Brain Research. Brain Research Reviews* 26 (2–3): 230–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651535>.
- Norton, Raymond, and Stefan McDonough. 2008. "Peptides Targeting Voltage-Gated Calcium Channels." *Current Pharmaceutical Design* 14 (24): 2480–91. doi:10.2174/138161208785777478.
- Osborne, Neville N, Robert J Casson, John P M Wood, Glyn Chidlow, Mark Graham, and José Melena. 2004. "Retinal Ischemia: Mechanisms of Damage and Potential Therapeutic Strategies." *Progress in Retinal and Eye Research* 23 (1): 91–147. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.12.001.
- Ozawa, S, H Kamiya, and K Tsuzuki. 1998. "Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System." *Progress in Neurobiology* 54 (5): 581–618. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550192>.
- Pascale, Alessia, Filippo Drago, and Stefano Govoni. 2012. "Protecting the Retinal Neurons from Glaucoma: Lowering Ocular Pressure Is Not Enough." *Pharmacological Research* 66 (1). Elsevier Ltd: 19–32. doi:10.1016/j.phrs.2012.03.002.
- Platnick, NI. n.d. "The World Spider Catalog, Version 15. American Museum of Natural History, New York." <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
- Poulsen, Mette H, Simon Lucas, Kristian Strømgaard, and Anders S Kristensen. 2014.

- “Evaluation of PhTX-74 as Subtype-Selective Inhibitor of GluA2-Containing AMPA Receptors.” *Molecular Pharmacology* 85 (2): 261–68. doi:10.1124/mol.113.089961.
- Pow, D V, and N L Barnett. 2000. “Developmental Expression of Excitatory Amino Acid Transporter 5: A Photoreceptor and Bipolar Cell Glutamate Transporter in Rat Retina.” *Neuroscience Letters* 280 (1): 21–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696802>.
- Pow, David V. 2001. “Amino Acids and Their Transporters in the Retina.” *Neurochemistry International* 38 (6): 463–84. doi:10.1016/S0197-0186(00)00114-5.
- Quigley, Harry A. 2011. “Glaucoma.” *Lancet (London, England)* 377 (9774): 1367–77. doi:10.1016/S0140-6736(10)61423-7.
- Rash, Lachlan D, and Wayne C Hodgson. 2002. “Pharmacology and Biochemistry of Spider Venoms.” *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 40 (3): 225–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711120>.
- Rauen, T, W R Taylor, K Kuhlbrodt, and M Wiessner. 1998. “High-Affinity Glutamate Transporters in the Rat Retina: A Major Role of the Glial Glutamate Transporter GLAST-1 in Transmitter Clearance.” *Cell and Tissue Research* 291 (1): 19–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394040>.
- Rauen, Thomas, Michael Wiessner, Robert Sullivan, Aven Lee, and David V Pow. 2004. “A New GLT1 Splice Variant: Cloning and Immunolocalization of GLT1c in the Mammalian Retina and Brain.” *Neurochemistry International* 45 (7): 1095–1106. doi:10.1016/j.neuint.2004.04.006.
- Rodrigues, M C, R Guizzo, W F dos Santos, and N G Cairasco. 2001. “A Comparative Neuroethological Study of Limbic Seizures Induced by Parawixia Bistriata Venom and Kainic Acid Injections in Rats.” *Brain Research Bulletin* 55 (1): 79–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427341>.
- Rodrigues, Marcelo Cairrão Araujo, Renê De Oliveira Beleboni, Joaquim Coutinho-Netto, Wagner Ferreira dos Santos, and Norberto Garcia-Cairasco. 2004. “Behavioral Effects of Bicuculline Microinjection in the Dorsal versus Ventral Hippocampal Formation of Rats, and Control of Seizures by Nigral Muscimol.” *Epilepsy Research* 58 (2–3): 155–65. doi:10.1016/j.eplesyres.2004.02.001.
- Rodrigues, Marcelo Cairrão Araujo, Renato Guizzo, Leonardo Gobbo-Neto, Richard John Ward, Norberto Peoporine Lopes, and Wagner Ferreira dos Santos. 2004. “The Biological Activity in Mammals and Insects of the Nucleosidic Fraction from the Spider Parawixia Bistriata.” *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 43 (4): 375–83. doi:10.1016/j.toxicon.2004.01.009.
- Schmued, Larry C, Chris C Stowers, Andrew C Scallet, and Lulu Xu. 2005. “Fluoro-Jade C Results in Ultra High Resolution and Contrast Labeling of Degenerating Neurons.” *Brain Research* 1035 (1): 24–31. doi:10.1016/j.brainres.2004.11.054.
- Schneider, Nicole, S?nke Cordeiro, Jan Philipp Machtens, Simona Braams, Thomas Rauen, and Christoph Fahlke. 2014. “Functional Properties of the Retinal Glutamate Transporters GLT-1c and EAAT5.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (3): 1815–24. doi:10.1074/jbc.M113.517177.
- Sivak, Jeremy M. 2013. “The Aging Eye: Common Degenerative Mechanisms between the Alzheimer’s Brain and Retinal Disease.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (1): 871–80. doi:10.1167/iovs.12-10827.
- Soltau, Joern B, and Thom J Zimmerman. 2002. “Changing Paradigms in the Medical Treatment of Glaucoma.” *Survey of Ophthalmology* 47 Suppl 1 (August): S2-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204696>.
- Szabadfi, Krisztina, Laszlo Mester, Dora Reglodi, Peter Kiss, Norbert Babai, Boglarka Racz, Krisztina Kovacs, et al. 2010. “Novel Neuroprotective Strategies in Ischemic Retinal Lesions.” *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2): 544–61.

- doi:10.3390/ijms11020544.
- Torres-Salazar, Delany, and Christoph Fahlke. 2007. "Neuronal Glutamate Transporters Vary in Substrate Transport Rate but Not in Unitary Anion Channel Conductance." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 34719–26. doi:10.1074/jbc.M704118200.
- Ward, Michelle M, Andrew I Jobling, Theresa Puthussery, Lisa E Foster, and Erica L Fletcher. 2004. "Localization and Expression of the Glutamate Transporter, Excitatory Amino Acid Transporter 4, within Astrocytes of the Rat Retina." *Cell and Tissue Research* 315 (3): 305–10. doi:10.1007/s00441-003-0849-3.
- Weinreb, Robert N. 2007. "Glaucoma Neuroprotection: What Is It? Why Is It Needed?" *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien D'ophtalmologie* 42 (3): 396–98. doi:10.3129/can_j_ophtalmol.i07-045.
- Wiessner, Michael, Erica L Fletcher, Frauke Fischer, and Thomas Rauen. 2002. "Localization and Possible Function of the Glutamate Transporter, EAAC1, in the Rat Retina." *Cell and Tissue Research* 310 (1): 31–40. doi:10.1007/s00441-002-0612-1.
- Yoles, E, and M Schwartz. n.d. "Potential Neuroprotective Therapy for Glaucomatous Optic Neuropathy." *Survey of Ophthalmology* 42 (4): 367–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9493279>.