

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto

Atividade neuroprotetora da FrPbAll
isolada da peçonha da aranha *Parawixia
bistriata* em ratos submetidos a um
modelo de glaucoma experimental
agudo.

1886

1889

1905

Juliana Rosa Tostes

Ribeirão Preto, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tostes, J.R.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Atividade neuroprotetora da FrPbAll isolada da peçonha da aranha
Parawixia bistriata em ratos submetidos a um modelo de glaucoma
experimental agudo.**

Juliana Rosa Tostes

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

RIBEIRÃO PRETO

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Tostes, Juliana Rosa

Atividade neuroprotetora do composto FrPbAll isolado da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* em ratos submetidos a um modelo de glaucoma experimental agudo.

Ribeirão Preto, 2009.

110p.:29 cm

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Santos, Wagner Ferreira

1.Glaucoma. 2.Venenos de aranhas. 3.Neuroproteção. 4.GABA.
5.Transporte de GABA.



Capa: Nus de Edgar Degas

“Mulher penteando seu cabelo”-1886

“A saída do banho”-1889

“Mulher secando seu cabelo”-1905

Um dos grandes mestres do impressionismo, o francês Edgar Degas (1834-1917), sofreu com uma grave doença nos olhos. Porém isso não sustenta a piada pronta de que os impressionistas pintavam de forma distorcida porque não enxergavam direito. Mas esses problemas de visão afetaram, sim a obra tardia desse artista. Um estudo recente publicado no *Archives of Ophthalmology*, revista médica americana, utilizou técnicas de manipulação de imagem em computador para elucidar a influência das deficiências de visão nas pinturas de Degas. De autoria do médico Michael Marmor, professor de oftalmologia na Universidade de Stanford, a pesquisa mostra como certas características que poderiam ser interpretadas como arroubos vanguardistas talvez sejam uma resposta a limitações físicas.

Marmor recorreu a programas de computador para reconstituir a visão que Degas teria de seus próprios quadros. Degas sofria de degeneração macular, doença que afeta o centro da retina, embaçando progressivamente a visão. Os primeiros sinais do problema – que deixaria o artista cego no fim da vida – surgiu nos anos 1880. Os trabalhos posteriores apresentam um sombreamento mais grosseiro. Distorcendo os quadros de Degas de acordo com o progresso presumido da doença, o pesquisador descobriu um fenômeno curioso: na visão nublada de Degas, os delineamentos grosseiros se tornam mais suaves. “As obras parecem melhores quando observadas através da visão anormal”, conclui o estudo.

Revista Veja

Edição 2006

02 de Maio de 2006

DEDICATÓRIA

A minha mãe Marlene, que sempre me apontou os caminhos éticos pessoais e profissionais, pelo exemplo de amor, fibra, competência, equilíbrio e amizade por me guiar pela vida e ser meu alicerce.

Ao meu pai Osmar, por estar sempre ao meu lado, sendo um verdadeiro exemplo e por me instruir pelos caminhos da vida com perfeição.

Ao meu irmão Francisco pelo carinho e amor dedicados a mim e por me apoiar as vezes que a mãe ou o pai não apóiam.

Ao meu companheiro Marcelo, meu eterno amor, a quem serei sempre grata, por todo carinho, compreensão, dedicação, amor e incentivo.

Ao meu tio "Quim" (in memorian), que foi um grande homem, um idealista que lutou muito pelos seus sonhos sem desanimar e sempre sorrindo.

Tostes, J.R.

*Aos meus avôs, Joaquim e Sebastião (in memoriam), que com certeza estariam
comemorando comigo mais esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Esse mestrado, como é comum das travessias, não seguiu pelos caminhos antes planejados, mas me presenteou com dificuldades, desencontros, surpresas e novos rumos. A grande dádiva desse trajeto foi revelada nos pequenos atos de sincera generosidade que tantas pessoas me concederam. Se algum dia eu acreditei que tomar esse caminho havia sido uma decisão só minha, hoje sei que essa possibilidade me foi doada por muitas pessoas que, cada uma ao seu modo, cuidam de mim, torcem por mim e principalmente acreditam em mim.

Agradeço:

A Deus por ter me concedido a maravilhosa oportunidade de viver com saúde e paz.

A minha mãe Marlene por me surpreender sempre, simplesmente sendo a melhor mãe do mundo dedicando-se a mim incondicionalmente apesar de todas as suas ocupações.

Ao meu querido pai Osmar e ao meu grande irmão Francisco pela força, apoio e amor dedicados a mim durante toda a minha vida e especialmente durante o mestrado.

Ao meu companheiro Marcelo que há onze anos caminha comigo, ensinando-me a acreditar no amor, a cultivar e desenvolver a paciência, e a sonhar com o nosso futuro, enfim completando-me e fazendo de mim uma mulher muito feliz, além de acreditar em mim e me apoiar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos pela valiosa orientação durante esses sete anos, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelo voto de confiança quando cheguei.

Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto da FMRP-USP, pela maravilhosa colaboração.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra da FMRP-USP, pelas valiosas sugestões e discussões.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da FCFRP-USP, pela abertura do laboratório para o isolamento dos compostos.

Ao Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira da FMRP-USP, pela abertura do laboratório para o uso do sistema de imagens.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão da FFCLRP-USP, pelo grande apoio, e pela abertura do laboratório.

A inestimável Alexandra pela valiosa amizade, colaboração e dedicação sem limites durante todo o percurso (pelas correções, almoços e conselhos) por ter confiado em mim e pela disposição. Serei sempre muitíssimo grata.

A Helene ao Zé e a Dri pela grande amizade, pelas longas conversas, pelo ombro amigo nas horas em que não foi possível segurar as lágrimas.

Ao André e a Ká pela amizade, pelos inúmeros momentos de descontração e alegria que vocês me proporcionaram.

Ao querido amigo Amauri pelo grande apoio profissional, mas principalmente por ter sido meu conselheiro e amigo, diariamente na histologia. Lembrar-me-ei das aulas de etiqueta, de todos os seus ensinamentos e da sua pessoa, com muito carinho.

Ao querido Toninho (*in memoriam*), pelos ensinamentos de histologia, conselhos, sorriso e carinho para comigo sempre me defendendo quando era preciso me lembrarei da sua pessoa sempre com muito carinho, que Deus te de muito conforto e paz.

A todos os amigos do laboratório de neurobiologia e peçonhas que já se foram Renato (pelos inúmeros ensinamentos sobre cirurgias e contagens), Márcia, Cris, Erica e Lú, e aos alunos de iniciação Juzinha, Lívea, Murilo, Bruno Marcela e Marcelí obrigada pelas risadas, conversas e favores.

As minhas queridas tias e amigas: Lê, Clemar, a tia madrinha Dri, e a tia Vera, pela coragem com que vocês lidam com a vida, e pela delicadeza e amor com que vocês me tratam, desde que nasci e principalmente durante o mestrado em que vocês torceram por mim, pelos inúmeros conselhos sempre bem vindos, e pelos inúmeros favores concedidos serei eternamente grata.

Ao tio Valteir por ser meu companheiro na fé, pela amizade, pelas conversas alegres e pelos lanches ao meu tio Luciano pela amizade, pelos favores, pelos churrasquinhos sempre aconchegantes e pelas caronas sempre tão bem vindas.

Ao tio Quim (*in memoriam*) pelo incentivo e pelo exemplo de dedicação, perseverança, e de lutar sempre para realizar os próprios sonhos.

A minha priminha quase filha Ana Júlia por ter me feito tão feliz desde o dia que nasceu, e por ser a minha companheira nos aniversários das crianças. Ter cuidado dessa princesinha, em muitos momentos, me fez relembrar como é bom ser criança.

A querida tia Sandra por ter ajudado a cuidar de mim durante a minha infância. As minhas primas Beatriz e Mariana, obrigada pelos momentos alegres e também pelos frustrantes que tivemos na nossa infância, quando brincávamos juntas. Também por terem me ajudado a estudar genética de populações para a prova de seleção do mestrado. Que ajuda valiosa na concretização desse meu sonho.

A minha avó Elza pelo acalento das histórias, principalmente de suas histórias de vida, pelas maravilhosas conversas onde você sempre me aconselhou e pelo seu amor.

A minha avó Tereza por ser a minha segunda mãe ter ajudado a me criar com tanto carinho, pelo exemplo de mulher forte e batalhadora.

A minha amiga irmã Mariela por ser um anjo que Deus colocou em minha vida que sempre me ampara, protege e me faz levantar nas horas mais difíceis, não tenho palavras para expressar o quanto é importante para mim, desde que entrou na minha vida há 12 anos não sabíamos das incríveis alegrias e tristezas que estavam adiante.

Nem sabíamos o quanto precisaríamos umas das outras, pois sempre me ajudou (com a dissertação então nunca vou me esquecer do incondicional apoio com as digitações irmã), me ouviu, se entristeceu e preocupou com os meus problemas, e acima de tudo sempre me apoiou.

A minha grande amiga Lailah (muleke), como, se não bastasse me acompanhar desde a época em que brincávamos de casinha há uns 15 anos atrás quando a amizade começou, ter me acompanhado em inúmeras viagens, no interminável curso de inglês (6 anos) estudando arduamente sofrendo comigo de bicicleta e me ouvindo há 400 km de distância, pois você sempre esteve disposta quando foi preciso, muito obrigada por tudo que você fez e representa para mim.

As amigas: Lucy, Larissa, Andressa, Marcela (Xum) Regiane e Márcia (mara), pelos conselhos, pelo carinho, pela disposição (pelos inúmeros favores a mim dedicados) e acima de tudo pela amizade.

A minha segunda família: A Sônia pelo carinho e por ser uma sogra que não é feita de açúcar amargo e ao Ângelo (*in memoriam*). Serei eternamente grata por ter conhecido e convivido com esse grande homem. Obrigada pelo exemplo de vida e por suas brincadeiras comigo. André (por ser irmão e pai do Marcelo) e Karina (que além de ser minha cunhada, uma grande amiga desde a época da faculdade é minha conselheira, companheira). Ao Dudu e a Amandinha obrigada por fazerem os meus finais de semana e férias mais felizes e alegres. A Cinira pela alegria e comidinhas caseiras e ao Didi pela companhia, pelas conversas produtivas e inteligentes e por cumprir o papel de meu avô tão bem.

As amigas do colégio Cecília Meireles, pelo companheirismo e ajuda na realização do meu trabalho. A Yara e a Marta pela compreensão, amizade e carinho para comigo principalmente nos últimos dias da realização desse trabalho onde eu precisei de muita compreensão.

Ao meu querido amigo Cláudio pela compreensão com a minha ausência durante o término dessa dissertação e principalmente por ser um grande companheiro na pedagogia me ajudando-me nas atividades e me lembrando dos prazos, juntos somos uma dupla infalível.

A equipe de corrida da academia Sport Center os quais me incentivaram para esse maravilhoso esporte, obrigada pela companhia nos treinos e competições.

A querida amiga Beatriz Segatto minha conselheira pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos do laboratório de Neurologia experimental: Antônio Renato, Sil e Drica. Pela atenção e carinho dedicados a mim durante os 5 anos em que usei o sistema de imagens do laboratório.

A querida Renata Vicentini pela grande ajuda burocrática com os inúmeros detalhes do mestrado, pela amizade e pelos e mails e conselhos na sua sala.

A Universidade de São Paulo pelo prazer de estudar aqui durante 6 anos!

Ao Cnpq e a Fapesp pelo apoio financeiro.

Está totalmente fora de minha concepção deixar a vida passar e não lutar. Acredito sim que as vezes é preciso aceitá-la da forma que ela é, porém não é proibido modificá-la a nosso favor. Afinal, nem tudo que vimos era exatamente o que queríamos ver, por isso temos de ser fortes, nem tudo que temos é exatamente o que devíamos ou queríamos ter, por isso somos fúteis e ainda sonhamos.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Sabino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem esquematizando a retina.....	01
Figura 2- Diagrama esquematizando a disposição dos neurotransmissores na retina.....	04
Figura 3 - Esquema mostrando as intervenções terapêuticas para a neurodegeneração causada pela isquemia retiniana.....	07
Figura 4 - Fotografias de espécimes da aranha <i>Parawixia bistriata</i>	16
Figura 5- Fluxograma ilustrando as etapas do isolamento do composto FrPbAll.....	22
Figura 6- Fluxograma ilustrando as etapas da parte experimental do trabalho.....	26
Figura 7 - Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia e coradas com H/E.....	29
Figura 8- Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia e coradas com H/E.....	30
Figura 9- Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia e coradas com H/E.....	31
Figura 10 - Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia com reperusão e coradas com H/E.....	33
Figura 11- Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia com reperusão e coradas com H/E.....	34
Figura 12- Fotografias das secções das retinas de ratos wistar submetidos a isquemia com reperusão e coradas com H/E.....	35
Figura 13- Gráfico representativo das densidades neuronias médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperusão.....	37

Figura 14- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	38
Figura 15- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	39
Figura 16- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	40
Figura 17- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	41
Figura 18- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	42
Figura 19- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	43
Figura 20- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	44
Figura 21- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	44
Figura 22- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	46

Figura 23- De Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.....	47
Figura 24- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão.	48
Figura 25- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	50
Figura 26- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	51
Figura 27- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.	52
Figura 28- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	53
Figura 29- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	54
Figura 30- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.	55

Figura 31- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	56
Figura 32- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	57
Figura 33- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	58
Figura 34- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	59
Figura 35- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	60
Figura 36- Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-5-isoxazolpropionato

ATP: Adenosina trifosfato

CEUA: Comitê de ética para o uso de animais

CLAD: Cromatógrafo líquido de alto desempenho

CNE: Camada nuclear externa

CPE: Camada plexiforme externa

CNI: Camada nuclear interna

CPI: Camada plexiforme interna

CCG: Camada de células ganglionares

DZP: Diazepam

FrPbAll: Composto isolado da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*

GABA_A: Receptor de GABA ionotrófico do subtipo A

GABA_B: Receptor de GABA metabotrófico do subtipo B

GABA_C: Receptor de GABA ionotrófico do subtipo C

GATs: Transportadores de GABA

GABA: Ácido gama-amino butírico

icv: intracerebroventricular

L-glu: glutamato

MGluRs: Receptores metabotrópicos de glutamato

NMDA: N-metil-D-aspartato

NTs: Neurotransmissores

OARC: Oclusão da artéria retiniana central

PIO: Pressão intraocular

SCCR: Sinaptosomas de córtex cerebral de ratos

SN: Sistema Nervoso

SNC: Sistema Nervoso Central

PREFÁCIO

O glaucoma é a designação genérica de um grupo de doenças que atingem o nervo óptico e envolvem a perda de células ganglionares da retina num padrão característico de neuropatia óptica. A pressão intraocular elevada é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de glaucoma, não existindo contudo uma relação causal direta entre um determinado valor da pressão intraocular e o aparecimento da doença enquanto uma pessoa pode desenvolver dano no nervo com pressões relativamente baixas outra pode ter pressão intraocular elevada durante anos sem apresentar lesões. Se não for tratado o glaucoma leva ao dano permanente do disco óptico da retina, causando uma atrofia progressiva do campo visual, que pode progredir para cegueira.

O tipo mais comum é o glaucoma primário de ângulo aberto, freqüentemente assintomático. Uma das causas pode ser uma obstrução do escoamento do humor aquoso do olho. O humor aquoso é produzido no corpo ciliar do olho, fluindo através da pupila para a câmara anterior. Todos os olhos possuem alguma pressão intraocular que é causada pela presença de alguma resistência ao fluxo do humor aquoso através da malha trabecular e do canal de Schlemm. Se a pressão intraocular (PIO) for alta demais (maior do que 21,5 mm Hg), a pressão nas paredes do olho resultará na compressão das estruturas oculares. Entretanto, outros fatores, como perturbações no fluxo sangüíneo no nervo óptico podem interagir com a PIO e afetar o nervo óptico. Em um terço dos casos de glaucoma primário de ângulo aberto há PIO estatisticamente normal. Esses casos são chamados de glaucoma de pressão normal. Devido ao fato de exames do nervo óptico nem sempre serem realizados juntamente com medidas de PIO em pacientes de risco, o glaucoma de pressão normal é mais raramente diagnosticado até as condições se apresentarem adiantadas.

Outro tipo, o glaucoma de ângulo fechado, é caracterizado por aumentos súbitos de pressão intraocular. Isto ocorre em olhos susceptíveis quando a pupila dilata e bloqueia o fluxo do fluido através dela, levando à íris bloquear a malha trabecular. Glaucoma de ângulo fechado pode causar dor e reduzir a acuidade visual (visão borrada), e pode levar à perda visual irreversível dentro de um curto período de tempo. É considerada uma situação de emergência oftalmológica e requer tratamento imediato. Muitas pessoas com esse glaucoma podem visualizar um halo em volta de pontos de luz brilhantes, além da perda de visão característica da doença.

Glaucoma congênito é uma doença genética rara que atinge bebês. Recém nascidos com globos oculares aumentados e córneas embaçadas. Se considera que a causa da pressão intraocular elevada nesses casos é causada pela redução da permeabilidade trabecular.

Glaucoma secundário ocorre como uma complicação de várias condições médicas, como cirurgia ocular, catarata avançada, lesões oculares, uveítes, diabetes ou uso de corticóides.

Enquanto que o glaucoma pode ou não ter sintomas distintos, uma complicação quase inevitável do glaucoma é a perda visual. A perda visual causada por glaucoma atinge primeiro a visão periférica. No começo a perda é sutil, e pode não ser percebida pelo paciente. Perdas moderadas a severas podem ser notadas pelo paciente através de exames atentos da sua visão periférica. Isso pode ser feito fechando um olho e examinando todos os quatro cantos do campo visual notando clareza e acuidade, e então repetindo o processo com o outro olho fechado. Frequentemente o paciente não nota a perda de visão até vivenciar a "visão tunelada". Se a doença não for tratada, o campo visual se estreita cada vez mais, obscurecendo a visão central e finalmente progredindo para a cegueira do olho afetado.

Esperar pelos sintomas de perda visual não é o ideal. A perda visual causada pelo glaucoma é irreversível, mas pode ser prevenida ou atrasada por tratamento. Um oftalmologista deve ser consultado pelas pessoas com risco de desenvolver glaucoma.

Pessoas com histórico familiar de glaucoma têm cerca de 6% de chance de desenvolver a doença; Diabéticos e negros são mais propensos a desenvolverem glaucoma de ângulo aberto, e asiáticos têm maior tendência a desenvolver glaucoma de ângulo fechado. Idealmente, todas as pessoas devem checar por glaucoma a partir dos 35 anos, com a frequência das checagens aumentando com a idade. Metade das pessoas que sofrem de glaucoma não sabem disso.

Verificação de glaucoma normalmente é parte do exame ocular padrão feito por um oftalmologista. A verificação de glaucoma deve incluir medida da pressão intraocular, além do exame do nervo óptico em busca de lesões. Se houver qualquer suspeita de lesão no nervo óptico deve ser feita uma campimetria.

RESUMO

Tostes, J.R. **Atividade neuroprotetora da FrPbAll isolada da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em ratos submetidos a um modelo de glaucoma experimental agudo.** 2009. 110p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

Os glaucomas são grupos de neuropatias ópticas que se constituem na causa mais freqüente de cegueira irreversível no mundo. O fator de risco mais importante da doença é o aumento da pressão intraocular (PIO) em decorrência de uma redução no escoamento normal do humor aquoso promovendo lesões no tecido retiniano e no nervo óptico. Por isso há uma necessidade de busca de novos tratamentos para essa doença. Neste sentido os venenos de artrópodes são um dos maiores recursos de moléculas biologicamente ativas que possuem afinidade com o tecido nervoso interagindo com inúmeros receptores e neurotransmissores. E nessa busca por toxinas anticonvulsivantes e neuroprotetoras, o Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas investiga componentes do veneno da aranha *Parawixia bistriata*, fato que nos levou ao isolamento do composto FrPbAll, o qual atua inibindo os transportes de GABA e glicina. Anteriormente já foi demonstrado que a FrPbAll exerce efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por antagonistas gabaérgicos: bicuculina, picrotoxina e pentilenotetrazol. Também quando injetada na substância negra, inibiu crises evocadas pela estimulação da *Area tempestas*. Sendo assim o presente estudo consistiu em verificar se em um modelo *in vivo* a ação da FrPbAll poderia ser mais atribuída ao bloqueio do transporte de GABA ou ao bloqueio do transporte de glicina. Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 200-250g (n=3, por grupo). No dia do experimento, os animais foram anestesiados e contidos em mesa cirúrgica, sendo colocada uma cânula na câmara interna do olho esquerdo. A seguir, os animais receberam injeções por via intra-vítrea com o volume de (5 µL) de: salina (0,9%), FrPbAll (0,03; 0,075 and 0,15 µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+bicuculina (40 nmol), FrPbAll (0,15 µg/µl)+picrotoxina (100 µM), FrPbAll (0,15 µg/µl)+imidazol (100 µM), FrPbAll (0,15 µg/µl)+faclofen (0,1mM); FrPbAll (0,15 µg/µl)+estriquinina (100 µM); ácido nipecótico (12 µg); SNAP 5114 (20 µmol); ALX 5407 (20 µM); FrPbAll (0,03 µg/µl)+ ácido nipecótico (3µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+ ácido nipecótico (12 µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+SNAP-5114 e FrPbAll (0,15 µg/µl)+ALX-5407. Após 15 minutos foi aplicada uma pressão 120 mmHg, por 45 min, causando isquemia retiniana. Na metade dos animais o experimento foi interrompido após a isquemia. Na outra metade, a pressão foi reduzida aos níveis normais por 15 min. A análise histopatológica das retinas isquêmicas com e sem reperfusão revelou lesões do tipo vacuolização citoplasmática, núcleos picnóticos e desorganização das camadas, comumente descritas em processos de necrose. Os ensaios com antagonistas de receptores para GABA do tipo A, B e C mostraram redução e até mesmo reversão do efeito neuroprotetor da FrPbAll injetada em associação com estes antagonistas nas três camadas da retina analisadas, tanto após isquemia quanto após isquemia com reperfusão. A comparação do efeito da FrPbAll com os demais inibidores de transporte mostrou que as densidades de neurônios em retinas tratadas com a FrPbAll foi semelhantes àquelas encontradas para os demais tratamentos em todas as camadas após a isquemia. No entanto, nos experimentos onde houve reperfusão das retinas, as densidades de neurônios das retinas pré-tratadas com FrPbAll foi significativamente maior que àquelas atribuídas aos demais inibidores na camada CNI, enquanto nas camadas CNE e CCG, foi verificada diferença entre a FrPbAll e os pré-tratamentos com o inibidor inespecífico do transporte de GABA SNAP-5114, bem como o inibidor de GLYT 1 ALX-5407. Os experimentos utilizando associações do composto FrPbAll com os inibidores de transporte ácido nipecótico, SNAP 5114 e ALX-5407 demonstraram que, com exceção da CCG após isquemia, as menores densidades de células foram observadas nas retinas dos animais tratados com a FrPbAll associada ao SNAP 5114, para as três camadas após a isquemia ou isquemia seguida de reperfusão.

ABSTRACT

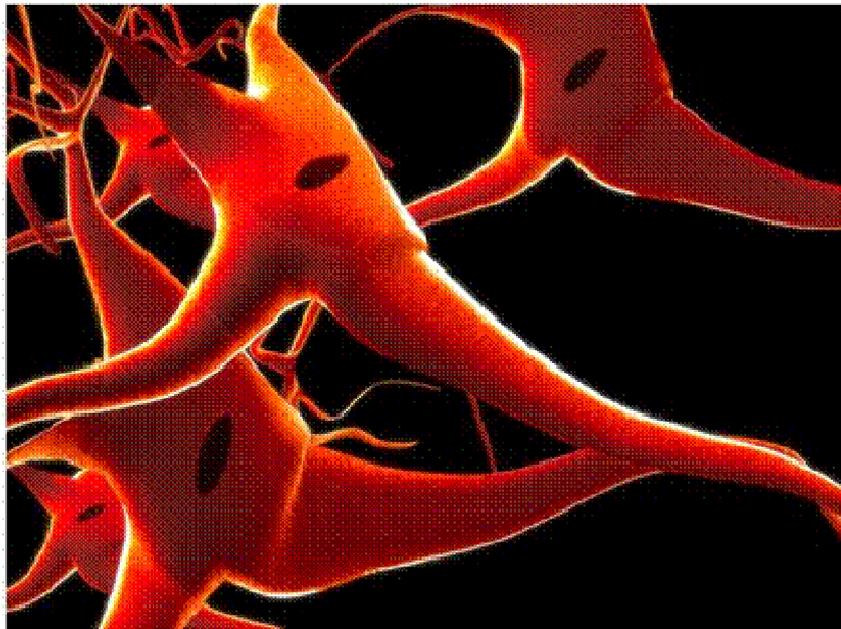
Tostes, J.R. **Neuroprotective activity of FrPbAll isolated from the venom of the spider *Parawixia bistriata* in Wistar rats submitted to an experimental model of acute glaucoma.** 2009. 110p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

Glaucoma is a generic term for optic neuropathies which are the most frequent causes of blindness worldwide. An important risk factor is the increase in the intraocular pressure (IOP) caused by the abnormal drainage of the aqueous humor and leading to the damage of the retina nervous tissue and to the optic nerve. Therefore, there is a need for novel therapeutic options to be used both in clinical and basic science. In the light of these facts, arthropod venoms are an interesting source of biologically active compounds, since they exert affinity to various neurotransmitter receptors. Therefore, the Laboratory of Venoms and Neurobiology has searched for novel anticonvulsant and neuroprotective compounds in the venom of the spider *Parawixia bistriata* and identified and isolated FrPbAll that acts by the inhibition of GABA and glycine re-uptakes. We have previously shown that this compound is anticonvulsant against seizures induced by GABAergic antagonists; bicuculine, picrotoxin and pentilene tetrazole. Also, when injected into the substantia nigra, FrPbAll inhibits seizures evoked by the stimulation of the area tempestas in the pyriform cortex. Thus, in this study, we examined the action of FrPbAll in the prevention of damage induced by retina ischemia. It was also investigated if this action *in vivo* could be more related to an increase in GABAergic or glycinergic systems. Finally, transporter inhibitors were used in order to compare the neuroprotective activity of FrPbAll on different GABA transporter subtypes and glycine transporter GLYT1. Wistar rats (200-250g, n=3, each group), were used. Upon anesthesia the animals received intra-vitreous injections of salina (0,9%), FrPbAll (0,03; 0,075 and 0,15 µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+bicuculine (40 nmol), FrPbAll (0,15 µg/µl)+picrotoxin (100 µM), FrPbAll (0,15 µg/µl)+imidazole (100 µM), FrPbAll (0,15 µg/µl)+phaclofen (0,1mM); FrPbAll (0,15 µg/µl)+strychnine (100 µM); nipecotic acid (12 µg); SNAP 5114 (20 µmol); ALX 5407 (20 µM); FrPbAll (0,03 µg/µl)+nipecotic acid (3µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+nipecotic acid (12 µg/µl); FrPbAll (0,15 µg/µl)+SNAP-5114 and FrPbAll (0,15 µg/µl)+ALX-5407. 15 min later, the IOP was raised up to 120mmHg for 45 min (ischemia). In half of the animals the IOP was restored for 15 min (ischemia/reperfusion). At the end of the experiments, animals were euthanized; eyes were removed and fixed in ALFAC. Histopathologic analyses of ischemic retinas with or without reperfusion revealed cellular vacuolization, pycnotic nuclei and disorganization of retinal layers, commonly found in necrotic processes. Pre-treatment with FrPbAll diminished the damage in the three analyzed layers in a dose-dependent manner. The association of FrPbAll with GABA receptor antagonists and strychnine decreased the density of neuronal cells, with worse effects observed after association of FrPbAll and imidazole after ischemia with reperfusion. All transporter inhibitors protected the neurons in the ischemic retinas in all examined layers. However, the highest cell densities were found after FrPbAll treatment in all layers, except GCL. In the experiments with reperfusion, retinas treated with FrPbAll exhibited a significantly higher number of cells as compared to all the other drugs in the ICL. In the OCL and GCL, significant differences were found after the comparison of FrPbAll with SNAP-5114 and ALX-540. Furthermore, retinas pre-treated with the association of FrPbAll with SNAP-5114 exhibited the lowest cell densities in both ischemia with or without reperfusion in the three examined layers, except GCL after ischemia. The present findings corroborate previous experiments *in vitro* and may indicate that FrPbAll acts in both GABA and glycine transporters with same affinity. Also, considering previous findings from anticonvulsant assays, FrPbAll has a preference for GAT1 transporters, but do not act exclusively on this type of transporter. Finally, FrPbAll has an unique mode of action and should be used as a probe for the synthesis of analogues to be used in both clinical and basic science.

SUMÁRIO

1.- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - A Retina.....	01
1.1.1 - Aspectos morfológicos e fisiológicos dos diferentes tipos celulares da retina.....	02
1.2 - A lesão isquêmica e a resistência da retina à isquemia.....	04
1.2.1 – Isquemia retiniana e mecanismos neurológicos.....	08
1.2.2 - Neurotransmissores liberados durante a isquemia.....	09
1.2.3 - Causas do aumento do glutamato na isquemia retiniana.....	09
1.2.4 - Os efeitos dos íons de Ca ⁺⁺ , Na ⁺ e Zn ⁺⁺ na isquemia retiniana	11
1.2.5 - Radicais livres, mediadores inflamatórios e acidose na retina.....	12
1.2.6 - Tolerância isquêmica e estratégias de neuroproteção.....	13
1.3 - O glaucoma experimental.....	14
1.4 - Neurotoxinas de aranhas.....	15
1.5 - A aranha Parawixia bistriata.....	16
2 - OBJETIVOS.....	19
2.1 - Objetivo geral.....	19
2.2 - Objetivos específicos.....	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 - Coleta das aranhas e extração das glândulas e reservatórios de veneno.....	21
3.2 - Purificação do composto FrPbAll.....	21
3.3 - Animais.....	22
3.4 - Drogas.....	23
3.5 - Cirurgia: Modelo de isquemia-glaucoma experimental.....	23
3.6 - Procedimentos histológicos.....	24
3.7 - Análise qualitativa dos resultados.....	25
3.8 - Análise quantitativa dos resultados.....	26
3.9 - Análise estatística.....	27
4 - RESULTADOS.....	28
4.1 - Análise qualitativa.....	28

4.1.1 - Retinas submetidas à isquemia.....	28
4.1.2 - Retinas submetidas à isquemia com reperfusão.....	32
4.2 - Análise quantitativa.....	36
4.2.1 - Retinas submetidas à isquemia.....	36
4.2.2 - Retinas submetidas à isquemia com reperfusão.....	48
5 - DISCUSSÃO.....	61
6 - CONCLUSÕES.....	69
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70



1-Introdução

1- INTRODUÇÃO

1.1- A Retina

A retina é a porção exteriorizada do cérebro (Shepherd, 1974), derivada da mesma vesícula primordial da qual se origina o diencéfalo (Cohem, 1980). É composta por dez camadas das quais, cinco são constituídas de sinapses e corpos celulares de neurônios (Dantas,1989). Nesta subdivisão os corpos celulares de neurônios são encontrados em três camadas nucleares; externa, interna e células ganglionares, e as sinapses podem ser localizadas em duas camadas plexiformes; a externa e a interna, (Figura 1).

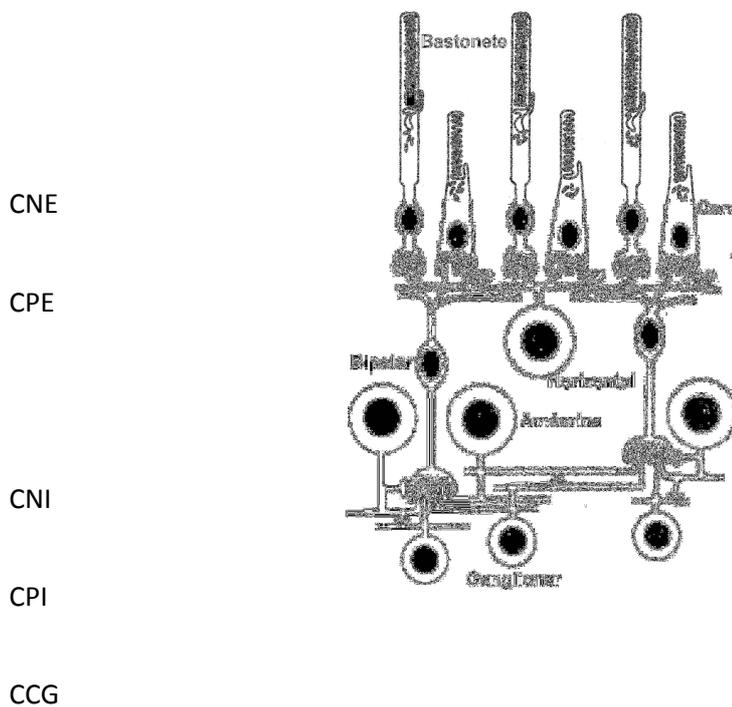


Figura 1: Imagem esquematizando a retina, suas camadas, tipos celulares e neurônios. CNE (camada nuclear externa), CPE (camada plexiforme externa), CNI (camada nuclear interna), CPI (camada plexiforme interna) e CCG (camada de células ganglionares).

1.1.1- Aspectos morfológicos e fisiológicos dos diferentes tipos celulares da retina

A camada nuclear externa (CNE) é formada pelos núcleos dos fotorreceptores; cones e bastonetes, intimamente unidos, cujos axônios fazem sinapses com neurônios bipolares e horizontais. Estas células podem estar danificadas após um período de 3-9 meses a partir de um insulto isquêmico. Stevens e colaboradores 2002 mostraram que após um insulto inicial a diminuição de células ganglionares causa diminuição das atividades pupilares levando à degeneração dos fotorreceptores. Após 30 minutos de isquemia as células de Müller e as células do epitélio da retina se recuperam, mas os fotorreceptores não. Os fotorreceptores adaptados a luz são mais sensíveis aos efeitos da isquemia do que os não adaptados a luz. Por outro lado os bastonetes são mais sensíveis aos efeitos da isquemia do que os cones, em contraste, quando afetados, os cones não conseguem se recuperar tão rápido quanto os bastonetes (Hiroi *et al*, 1994 , Osborne, 2004).

Na camada plexiforme externa (CPE) encontram-se quatro tipos de prolongamentos celulares os quais correspondem às projeções dos fotorreceptores, células horizontais, bipolares e de Müller, onde as subunidades do receptor GABA_A se expressam. Sendo assim, ocorrem nesta camada muitas sinapses gabaérgicas (Yang, 2004).

A camada nuclear interna (CNI) contém os núcleos dos neurônios bipolares, núcleos de neurônios de associação, denominadas células horizontais e células amácrinas. Nesta camada, a variedade de tipos celulares leva a uma gama de mecanismos de neurotransmissão com vários tipos de receptores e transportadores para muitos neurotransmissores (NTs). Por sua vez constituem um grupo de células retinianas que também são sensíveis a excitotoxicidade glutamatérgica (Fletcher e Kalloniatis, 1997). A expressão de grandes números de receptores glutamatérgicos ionotrópicos é uma das características que tornam os neurônios mais vulneráveis ao evento isquêmico (Larsen e Osborne, 1996 , Grunert, 2000).

A camada plexiforme interna (CPI) é a segunda região sináptica da retina. A qual consiste de processos das células bipolares e dendritos das células ganglionares. Assim como na CPE as subunidades dos receptores para o GABA também se expressam nesta camada em alguns dos inúmeros prolongamentos sinápticos encontrados. Dentre todas as sinapses ocorridas nesta camada uma das mais importantes ocorre entre os axônios das células bipolares e amácrinas, as quais são responsáveis pela modulação temporal dos sinais gabaérgicos (Yang, 2004).

A camada ganglionar (CG) contém células que variam de tamanhos, apresentando alguns dendritos na CPI. Desta forma em modelos experimentais de isquemia retiniana os resultados sempre mostram uma considerável diminuição das células ganglionares, porque essas células exibem uma despolarização irreversível durante a isquemia, que é um resultado do excesso de L-Glu, que estimula os receptores de cainato e AMPA (presentes nas células ganglionares). (Goto *et al*, 2002, Inoue Matsuhisa *et al*, 2003 , Wood *et al*, 2003)

Na figura 2 podem-se observar as camadas retinianas de mamíferos com seus tipos celulares e NTs.

Essas células expressam um grande número de receptores para glutamato dos tipos AMPA e cainato o que as torna mais suscetíveis a processos neurodegenerativos.

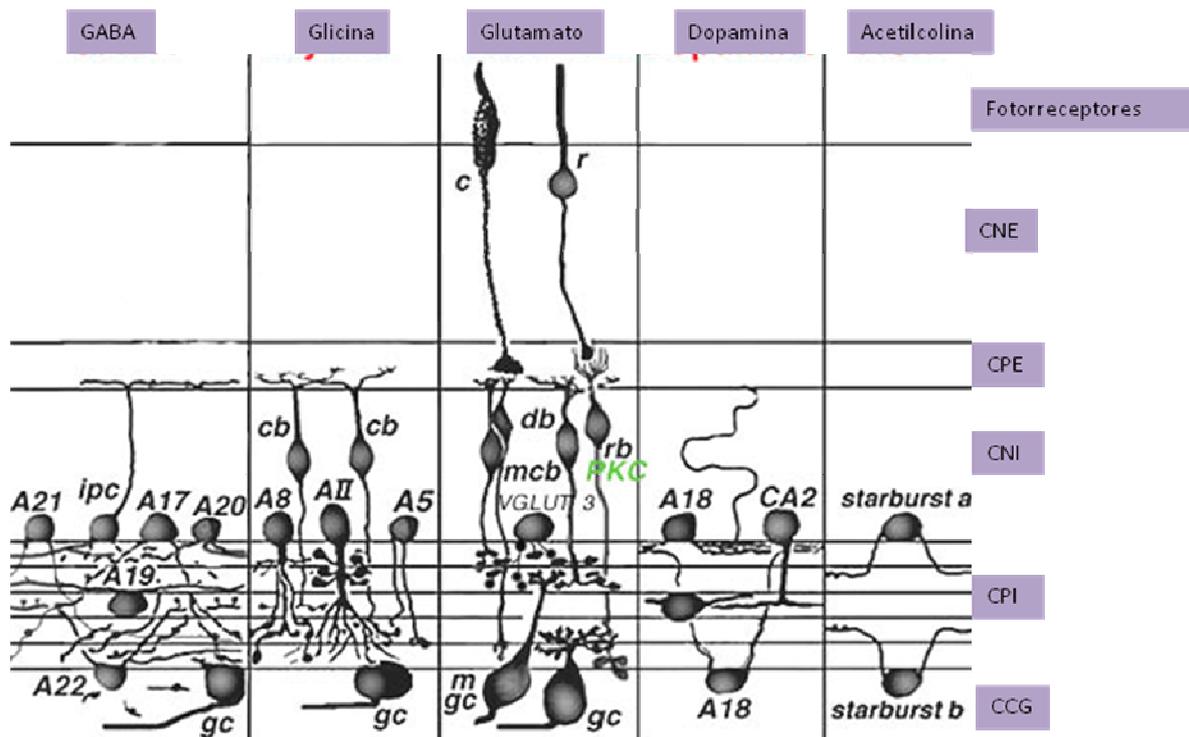


Figura 2: Diagrama esquematizando a disposição dos neurotransmissores de acordo com o tipo de célula na retina de mamíferos.

1.2- A lesão isquêmica e a resistência da retina a isquemia

A isquemia está associada a algumas disfunções ou doenças do sistema nervoso como, por exemplo, um acidente vascular cerebral isquêmico ou o glaucoma. A isquemia resulta da ausência ou insuficiência do fluxo sanguíneo, o que leva a redução dos níveis de oxigênio (Hughes, 1991, Hayreh *et al*, 2000).

A circulação torna-se insuficiente para manter as grandes demandas metabólicas teciduais: quando ocorre uma falha na circulação geral, ou na circulação ventricular, podendo levar a um choque hipovolêmico ou uma falha na circulação local. Quando a vascularização fica comprometida em algum tecido a anatomia do suprimento sanguíneo determina o resultado, ou seja a oclusão de uma artéria não terminal não causa danos sérios, mas a oclusão de uma

artéria terminal causa isquemia ou infarto. A isquemia retiniana completa requer a oclusão da artéria oftálmica, isto é, uma catástrofe vascular (Osborne *et al*, 2004).

Em nível celular, a injúria isquêmica consiste de uma cascata destrutiva envolvendo aumento da despolarização neuronal, influxo excessivo de cálcio, stress oxidativo iniciados por uma falência de energia e aumento da estimulação glutamatérgica. L-Glu. Com o declínio do suprimento sanguíneo os níveis de energia na forma de ATP são reduzidos. No neurônio, esta redução levará à falência das bombas dependentes de ATP, sobretudo a bomba de Na⁺/K⁺-ATPase e subsequente despolarização dos neurônios, e liberação de NTs. Além disso, durante a isquemia, a alteração da atividade da bomba de Ca⁺⁺-ATPase, eleva os níveis de Ca⁺⁺ dentro da célula, culminando com a liberação de L-Glu. O L-Glu liberado atua em seus receptores, particularmente receptores NMDA, que por sua vez sofrem uma hiperativação permitindo a entrada excessiva de íons Ca⁺⁺ num ciclo denominado excitotoxicidade. Este processo inclui a produção e a ativação de proteases, óxido nítrico sintetase e produção de peróxidos e superóxidos, os quais clivam lipídios de membrana pela peroxidação. Esta degradação da membrana fosfolipídica por sua vez, contribui para a formação dos radicais livres, liberação de mediadores inflamatórios e de citocinas e fosfolipases (Lantos *et al*, 1990, Osborne *et al*, 2004).

Além disso a diminuição de ATP pode levar a falência de transportadores de L-Glu, diminuindo a recaptação deste transportador e conseqüente acúmulo na fenda sináptica.

O processo de excitotoxicidade promove a morte de neurônios de duas maneiras diferentes que são respectivamente: apoptose e necrose (Osborne *et al*, 1999, Danbolt, 2001).

A morte neuronal por necrose é caracterizada pelo comprometimento da integridade de membrana devido à vacuolização. Neste caso, ocorre a lise da membrana e o extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular; produzindo uma resposta inflamatória duradoura. A apoptose, por sua vez, leva a alterações na morfologia da célula e no núcleo dentre as quais a condensação e clivagem do material genético estão presentes (Osborne *et al*, 2004). A isquemia priva o tecido de 3 componentes: oxigênio, substratos metabólicos e dos “ removedores de sujeira”. A diminuição desses suprimentos inicia uma baixa resposta homeostática e que futuramente irá induzir injúria ao tecido, o qual pode morrer (Osborne 2004 *et al*). Uma vez que o SNC de vertebrados não se regenera a partir de um dano ou lesão, as terapias se concentraram em diminuir os fatores de risco. Dentre estas medidas encontram-se controle da pressão sanguínea, diminuição dos efeitos secundários, controle da reperfusão e também em investigar drogas neuroprotetoras capazes de proteger o tecido nervoso (Green *et al*, 2000).

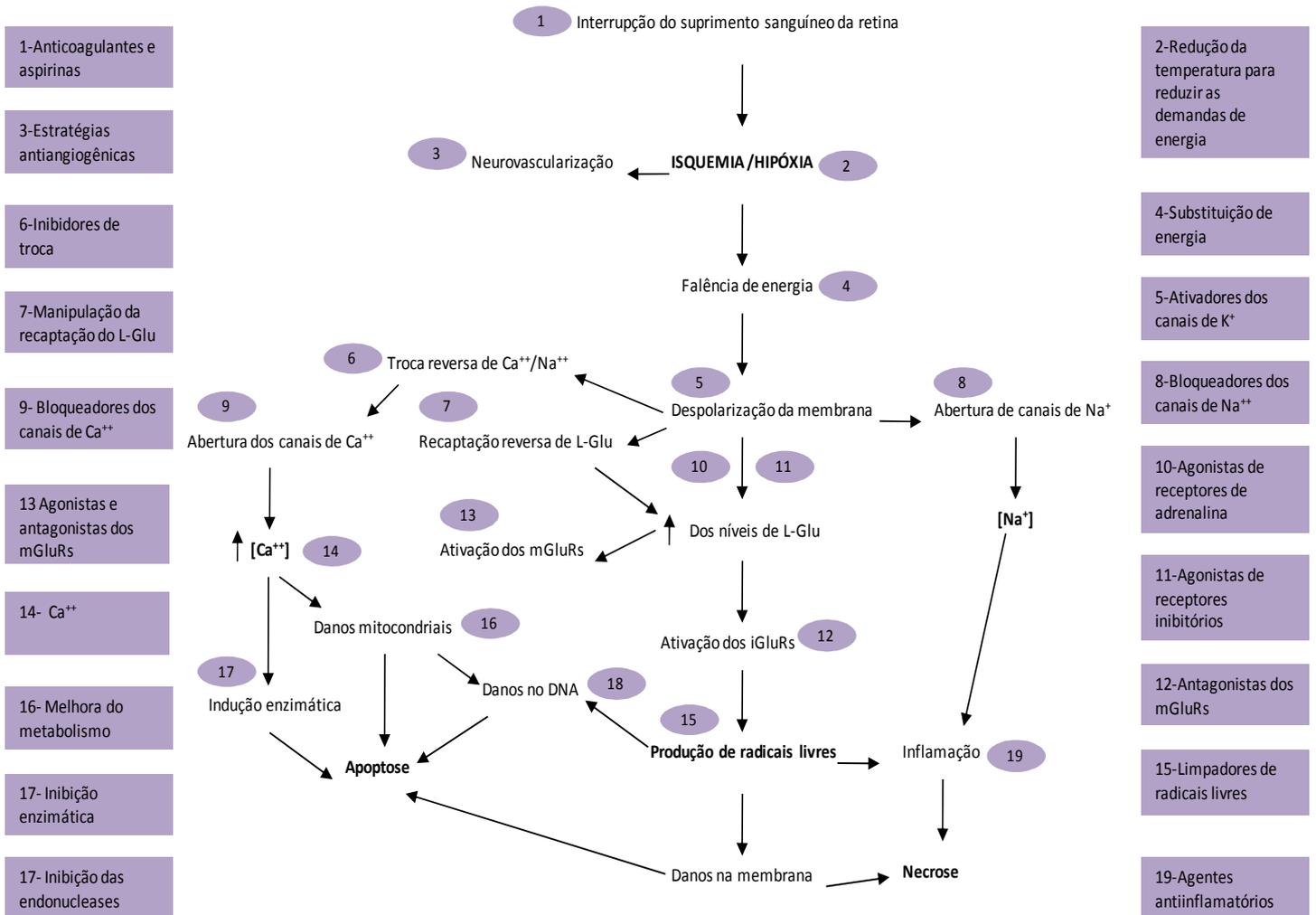


Figura 3: Esquema mostrando os eventos que ocorrem no processo de neurodegeneração da isquemia retiniana e as possíveis intervenções terapêuticas conhecidas para este processo. Adaptado de Osborne *et al*, 2004.

A retina compartilha com o cérebro muitas características estruturais e funcionais. No entanto há uma diferença crucial entre a retina e o cérebro: a resistência da retina ao evento isquêmico, pois a retina sobrevive um tempo consideravelmente maior ao evento isquêmico do que o cérebro, alguns minutos de isquemia cerebral resulta em danos irreversíveis e morte neuronal, por outro lado a retina pode sofrer até 10 minutos de isquemia sem apresentar danos irreversíveis. A explicação para esses resultados se baseia em 3 fatos:

1- Existem na retina substratos de armazenamento de energia (o humor vítreo contém quantidades significantes de glicose e há também uma espécie de glicogênio armazenado).

2- Essa energia armazenada é utilizada durante os períodos de isquemia.

3- As células da retina conseguem extrair ATP da glicólise para suprir a falta de oxigênio.

Outro fator relevante é o edema causado pela isquemia, a rigidez do crânio não acomoda o inchaço cerebral e por sua vez comprime a microvasculatura. Em contraste o edema causado pela isquemia retiniana leva o tecido a expandir para a cavidade do humor vítreo sem comprimir a microvasculatura (Osborne *et al*, 2004).

1.2.1 – Isquemia retiniana e mecanismos neurológicos

Para estudar os efeitos patológicos da privação de nutrientes e oxigênio na retina, temos que considerar o funcionamento metabólico desse tecido e suas condições fisiológicas (Harding, 1997).

Recentes estudos com autoradiografia mostram que as células da retina metabolizam glicose, mesmo estando dispostas as condições claro/escuro (Winkler *et al*, 2003).

O primeiro efeito do bloqueio de oxigênio e da glicose retiniana é o rompimento do metabolismo energético celular que resultará no decréscimo da glicólise e da fosforilação oxidativa que por consequência causará um baixo nível de ATP extracelular, levando a deteriorização das funções de membrana, homeostase e do disparo das cascatas bioquímicas, que por sua vez levarão a morte celular (Lipton, 1999).

1.2.2 – Neurotransmissores liberados durante a isquemia

No estado fisiológico normal os níveis de NTs no espaço extracelular são muito baixos. Mas durante a isquemia retiniana há um acúmulo de L-Glu extracelular. Além disso a liberação de GABA, após a isquemia, assim como de glicina, dopamina, acetilcolina e adenosina, também foram constatadas após a isquemia (Louzada *et al*, 1992).

Durante a reperfusão os NTs presentes no espaço extracelular ativam os seus respectivos receptores, e contribuindo para a morte ou sobrevivência de neurônios. Os neurônios da CCG são mais suscetíveis a isquemia porque eles possuem mais receptores ionotrópicos do L-Glu que quando superativados causam despolarização e eventual morte celular. Em contraste, NTs inibitórios como o GABA, podem contrabalançar os efeitos do L-Glu nos neurônios porque causam hiperpolarização reduzindo a probabilidade de disparo. Desta maneira o aumento da concentração de NTs inibitórios na fenda que pode fornecer proteção aos neurônios corroborando com evidências de que o GABA é neuroprotetor (Green *et al*, 2000).

1.2.3 – Causas do aumento de glutamato na isquemia retiniana

Há muitas evidências de que os níveis de L-Glu aumentam durante a isquemia, mas através de qual mecanismo? Na isquemia cerebral o L-Glu aumenta de uma maneira bifásica começando com um aumento dependente do Ca^{++} seguido de um aumento independente do Ca^{++} (Waht *et al*, 1994). Isto ocorre porque quando a energia falha por um longo período de tempo o nível de ATP fica baixo para suprir a liberação dos NTs, então a liberação de L-Glu volta a ser independente de Ca^{++} (Nishizawa, 2001). Esse tipo de liberação por sua vez já foi demonstrada na isquemia do hipocampo e da retina e não é reduzida após a exposição da retina ao Ca^{++} extracelular (Zini *et al*, 2003).

Neste sentido o transporte reverso de L-Glu através das proteínas transportadoras é o principal mecanismo que explica a liberação do L-Glu independente de Ca^{++} durante a isquemia.

Em contraste, a recaptção do L-Glu não requer ATP e é mantida pelo gradiente de Na^+ juntamente com a concentração de K^+ . Porém quando a isquemia reduz os suprimentos de ATP que alimentam a bomba de Na^+/K^+ o K^+ se acumula no espaço extracelular despolarizando as células; o gradiente de Na^+ que guia a recaptção de L-Glu é diminuído, então o L-Glu permanece na fenda (Rossi *et al*, 2000).

A excitotoxicidade glutamatérgica na isquemia está classificada em duas fases: aguda e tardia: na fase aguda a excitotoxicidade é gerada pelos influxos de Na^+ , Cl^- e água e tem como resultado uma excessiva despolarização que está associada aos receptores AMPA e cainato. Já na fase tardia, é dependente de Ca^{++} e está associada com a ativação de receptores NMDA (Lipton e Rosenberg 1994).

O aumento de L-Glu que ocorre durante a isquemia não ativa apenas os receptores ionotrópicos, mas também os mGluRs, os quais possuem oito subtipos distintos e estão localizados nas camadas plexiforme, associados com as células de Müller. A estimulação dos mGluRs pode amplificar ou diminuir a excitotoxicidade glutamatérgica dependendo do subtipo ativado (Thoreson e Witkovisky, 1999).

Outro mecanismo que contribui para a excitotoxicidade glutamatérgica são as ondas de despolarização que envolvem um aumento abrupto de K^+ precedido por um lento aumento, logo após há liberação de L-Glu (Nedergaard e Hansen, 1993).

1.2.4. – Os efeitos dos íons de Ca^{++} , Na^+ e Zn^{++} na isquemia retiniana

Há muitas evidências de que o Ca^{++} é o maior mediador da morte neuronal na isquemia. Vários mecanismos parecem contribuir para o aumento do Ca^{++} presente no evento isquêmico, esses mecanismos são gerados por: receptores ligados a canais de Ca^{++} , canais de voltagem dependentes do Ca^{++} e efluxos de neurônios que liberam Ca^{++} (Wang *et al*, 2002).

Os níveis elevados de Ca^{++} iniciam várias cascatas destrutivas que contribuem para a degeneração neuronal. Dentre essas cascatas a mais crítica é a que culmina com a formação de emite radicais livres e óxido nítrico, que ativam fosfolipases, proteases com consequentes danos ao citoesqueleto (Sattler e Tymianski, 2001).

Estudos de retinas de coelhos mostraram que 50 % do ATP disponível para a retina é utilizado para o transporte de Na^+ portanto, quando o nível de ATP diminui o transporte de Na^+/K^+ fica mais vulnerável, causando irregularidades no potencial de membrana, no volume da célula e no gradiente de Na^+ . Farmacologicamente, a inibição da bomba de Na^+/K^+ produz neurotoxicidade, sugerindo assim que esse transporte é afetado durante a isquemia (Osborne *et al*, 2004).

A redução da bomba de Na^+/K^+ compromete a repolarização constante das membranas sinápticas axonais, causando a ativação dos receptores de NMDA e o influxo de Ca^{++} . Além disso, os receptores de AMPA também são ativados aumentando o influxo de Ca^{++} , Na^+ , Cl^- e água que contribuirá para o edema (Lipton 1999). É importante lembrar que vários tipos de receptores são ativados durante o evento isquêmico pelo aumento de níveis extracelulares dos seus receptivos NTs. Assim, durante o evento isquêmico os neurônios hiperpolarizados encontram-se inativados, porém eles podem ser despolarizados um tempo após a reperfusão (Vaegan e Millar, 1994).

Além do Ca^{++} estudos recentes sugerem que a participação do Zn^{++} como mediador da morte neuronal durante a isquemia retiniana. Em condições normais neurônios de ratos contêm uma quantidade pequena de Zn^{++} dentro das vesículas de NTs excitatórios, sendo este íon liberado quando ocorre a despolarização da membrana (Wenzel *et al*, 1997 e Vogt *et al*, 2000).

Alguns trabalhos mostram que o bloqueio da atividade do Zn^{++} reduz a morte neuronal causada pela isquemia (Lee *et al*, 2002). Além disso, mesmo em baixas concentrações de Zn^{++} acumuladas no espaço extracelular durante a isquemia, influenciam o grau de morte celular de maneira positiva através da regulação dos receptores NMDA e bloqueio dos efeitos dos receptores GABA_A (Draguhn *et al*, 1990).

1.2.5– Radicais livres, mediadores inflamatórios e acidose na retina

Muitas cascatas geradas pelo L-Glu resultam na formação de radicais livres, os quais são importantes mediadores dos danos isquêmicos (Bonne *et al*, 1998).

Neste sentido a infiltração dos neutrófilos que ocorre durante o início da reperfusão, provavelmente é o fator responsável pelos altos níveis de citocinas e pela formação de radicais livres (Tsujikawa *et al*, 1999).

Outro aspecto é a liberação de mediadores inflamatórios durante a isquemia os quais contribuem para a injúria isquêmica especialmente após a reperfusão. Há muitos mecanismos pelos quais os agentes inflamatórios contribuem para os danos neuronais e o uso de antiinflamatórios pode resultar em proteção contra perda neuronal (Danton e Dietrich, 2003).

A acidose acontece na isquemia retiniana devido ao acúmulo de ácido láctico que é causado pela fosforilação oxidativa da glicólise anaeróbica, quando os níveis de Na^+ sobem e reduzem a extrusão de H^+ presente no transporte Na^+/H^+ (Shimizu *et al*, 1993).

Além disso, a acidose inibe o seqüestro de Ca^{++} intracelular, cuja concentração já se encontra elevada durante a isquemia. Uma severa acidose causa degeneração das células da glia contribuindo para o aumento da necrose, que causará danos microvasculares e inibirá a respiração mitocondrial, com conseqüente edema celular (Staub *et.al.* 1993).

1.2.6 – Tolerância isquêmica e estratégias de neuroproteção

A tolerância isquêmica é um processo adaptativo onde o tecido se torna mais resistente para uma subseqüente isquemia. Essa tolerância é ativada por fatores que são executados após o evento isquêmico (Zhu *et.al.*, 2002).

Neste sentido a hipertermia e a hipóxia protegem o tecido contra um subseqüente evento de anóxia (Caprioli *et. al.*, 1996).

As estratégias de neuroproteção não devem promover apenas a perfusão das regiões isquêmicas, mas devem também induzir a redução do consumo de energia dos neurônios. Além disso, drogas que diminuem a excitabilidade neuronal causando hiperpolarização na membrana celular, levam a uma restrição do consumo de energia e prolongam o tempo de tolerância dos neurônios a eventos isquêmicos. Neste contexto vários estudos mostram que a inibição dos canais de Na^+ durante a isquemia é uma maneira efetiva de reduzir a quantidade de energia consumida pelas bombas presentes na membrana das células excitáveis as quais mantêm os gradientes de Na^+ e K^+ ao longo da membrana celular (Sapolsky, 2001).

1.3- O Glaucoma experimental

Um grande número de modelos animais em mamíferos tem sido desenvolvidos para estudar a isquemia retiniana. Contudo, esses modelos animais têm que replicar o maior numero possível de características e sintomas do problema clínico: a isquemia retiniana que

ocorre nos humanos. Todos os modelos animais apresentam desvantagens. No entanto, se um modelo consegue replicar as patologias humanas, certamente os tratamentos podem melhorar e serem mais efetivos na clínica (Osborne *et al*, 2004).

O método de aumento da pressão intra ocular (PIO) produz isquemia global uma vez que causa obstrução da circulação retiniana, e produz as mesmas características patológicas do método de oclusão da artéria retiniana central (OARC) representando um modelo de glaucoma agudo de ângulo fechado. Para serem percebidas mudanças imunológicas, a isquemia deve durar pelo menos 35 minutos, para serem percebidas mudanças histopatológicas a isquemia deve durar pelo menos 45 minutos (Selles Navarro *et al* 1996, Safa e Osborne 2000).

Vários artigos descrevem metodologias diferentes de indução do glaucoma experimental. As mais utilizadas são aumento da (PIO) (Hughes, 1991, Louzada-Jr *et al*, 1992, Mohand-Said *et al.*, 1997, Osborne *et al*, 1999), oclusão de artéria cerebral (Martinou *et al.*, 1994; Hayreh e Jonas, 2000) e fototrombose (Schmidt-Kastner e Eysel, 1994; Matini *et al*, 1997).

O aumento da PIO interrompe o fluxo sanguíneo levando a um quadro de isquemia que permanece por um tempo determinado. Ao final deste período a PIO volta ao normal, restabelecendo o fluxo sanguíneo e iniciando a fase de reperfusão, a qual é um período crítico e de grande importância que ocorre na doença (Louzada Jr. *et al*, 1992; Osborne *et al*, 1999).

Visto que essa doença pode levar à cegueira irreversível, modelos experimentais são de grande importância, pois simulam o problema clínico, além disso, permitem quantificar o grau das lesões e avaliar drogas potencialmente neuroprotetoras (Yoles e Schwartz, 1998).

1.4- Neurotoxinas de aranhas

As aranhas constituem o grupo mais amplo de aracnídeos terrestres com aproximadamente 40.000 espécies descritas no mundo todo (Rash e Hodgson, 2002). Nos últimos trinta anos, as neurotoxinas de aranhas têm sido estudadas química e biologicamente gerando vários compostos heterogêneos do ponto de vista estrutural, bem como do ponto de vista dos mecanismos de ação (Beleboni *et al*, 2004a). Dentre estes compostos encontram-se as poliaminas, proteínas enzimas, peptídios, aminoácidos e alcalóides os quais podem interagir com vários sistemas biológicos, incluindo o SN (Jacksonn e Parks, 1990; Beleboni, 2004; Cairrão *et al*, 2004 a).

Neste contexto, as neurotoxinas isoladas de venenos de aranhas podem atuar sobre o SN de insetos e vertebrados, causando assim uma grande variedade de efeitos neurológicos. Dentre estes efeitos estão incluídas as alterações na liberação de NTs, interações com diversos canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺, bem como transportadores (Rash & Hodgson, 2002).

1.5- A aranha *Parawixia bistriata*

A aranha *Parawixia bistriata* é uma aranha colonial distribuindo-se pela América Central e América do Sul, principalmente na região sudeste do Brasil. Esta aranha se agrupa em ninhos, e possui hábitos de caça noturnos (Levi, 1992).

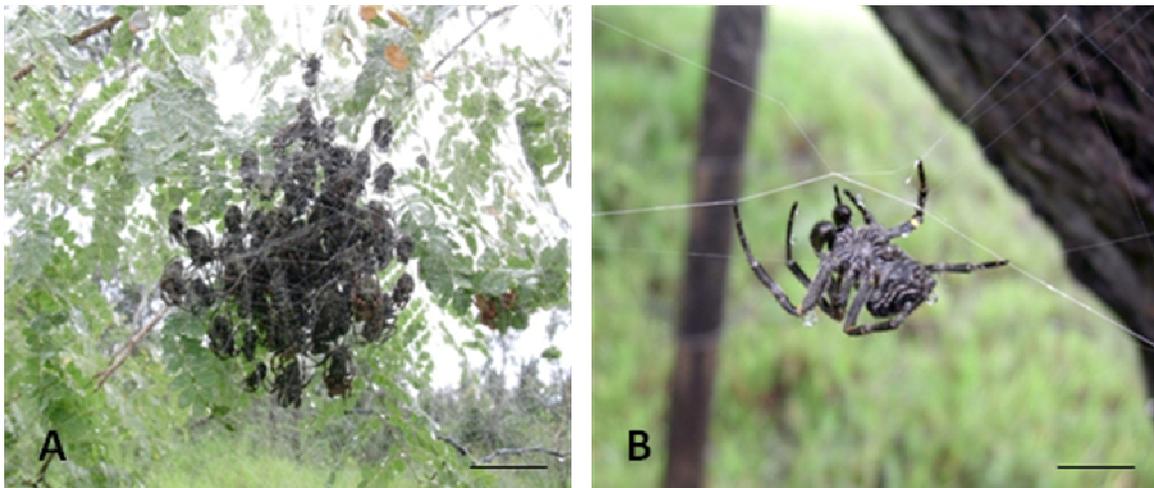


Figura 4: Fotografias de espécimes da aranha *Parawixia bistriata* dos arquivos do laboratório de neurobiologia e peçonhas-FFCLRP-USP. (A) Colônia coletada na região de Mococa, interior do estado de São Paulo. (B) Exemplar da aranha *Parawixia bistriata*. Valor da barra 1 cm.

A caracterização dos componentes da peçonha desta aranha começou em nosso laboratório quando foi observado que a injeção do veneno bruto em térmitas provocava paralisia destes isópteros (Fontana *et al*, 2000). Tendo em vista que a junção neuromuscular de insetos é predominantemente composta de sinapses gabaérgicas e glutamatérgicas (Churchill *et al*, 2003), foi possível prever que os componentes do veneno de *P. bistriata* apresentassem efeitos no SN de ratos e outros mamíferos.

Desta forma, Rodrigues e colaboradores (2001) mostraram que o veneno da aranha *P. bistriata* é heterogêneo, e possui componentes com atividade farmacológica diversificada. Esses autores demonstraram que a injeção por via intracerebroventricular (i.c.v.) do veneno bruto de *P. bistriata* provoca crises límbicas, cujas alterações comportamentais são bastante distintas daquelas induzidas pela injeção do agonista glutamatérgico ácido caínico, indicando que os componentes do veneno atuam em sítios diferentes do ácido caínico. Quando desnaturado, o veneno de *P. bistriata* aumenta a recaptação do GABA em sinaptossomas cérebro corticais de ratos (SCCR), além de bloquear crises generalizadas tônico-clônicas induzidas pelos antagonistas gabaérgicos bicuculina, picrotoxina e pentilenotetrazol (PTZ), quando injetados por via i.c.v. em ratos Wistar (Cairrão *et al*, 2002).

Recentemente diversos compostos foram identificados no veneneo de *P. bistriata*, como a inosina que apresenta efeito paralisante sobre insetos e pró-convulsivante em ratos (Cairrão *et al*, 2004). Além disso, Fontana e colaboradores (2003) isolaram, e testaram o composto PbTx 1.2.3 (Parawixina-I) e constataram que este composto estimula a recaptação de glutamato em SCCR, além de atuar como neuroprotetor em modelo de lesão da retina de ratos. Recentemente o mecanismo de ação da Parawixina I foi completamente elucidado. Segundo Fontana e colaboradores (2007) este composto aumenta o influxo de L-Glu pelo transportador EEAT-2, expresso em células COS.

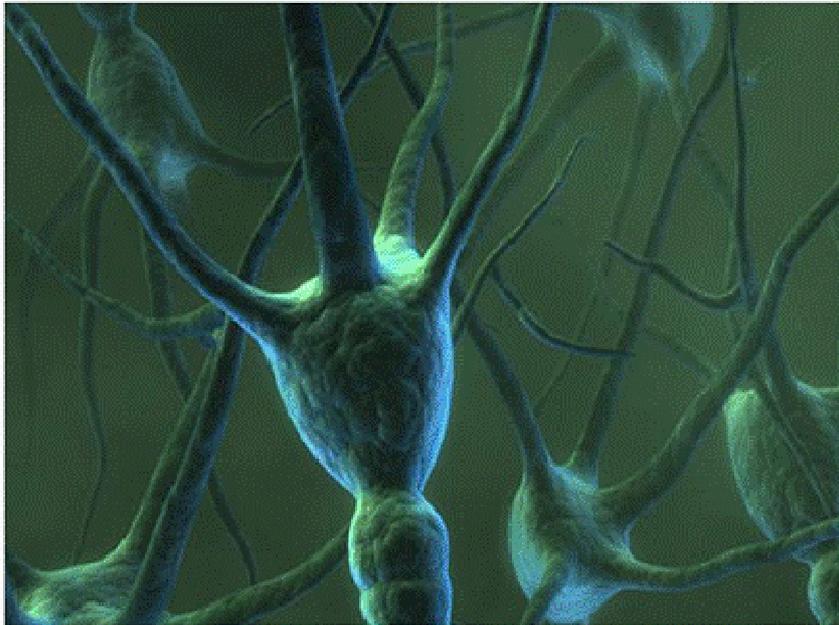
Na busca por toxinas anticonvulsivantes e neuroprotetoras, nós continuamos a investigar os componentes do veneno da aranha *Parawixia bistriata*, fato que nos levou ao isolamento do composto FrPbAII, o qual apresenta seletivamente um potente efeito inibitório sobre a recaptação do GABA. Além disso, este composto apresentou efeito anticonvulsivante contra crises agudas induzidas pelo bloqueio dos receptores GABA_A pela injeção intracerebral de bicuculina (Cairrão *et al*, 2002).

O composto FrPbAll (174 Da) é um aminoácido modificado, altamente hidrofílico, muito parecido com o próprio GABA, o qual inibe o transporte deste neurotransmissor, em SCCR, de maneira competitiva e dose dependente. Apesar de apresentar estrutura semelhante ao GABA, esta molécula não altera a atividade dos canais de Na^+ , K^+ e Ca^{++} , bem como não possui efeito sobre receptores de GABA (Beleboni *et al*, 2004b).

A estrutura química do composto FrPbAll foi recentemente elucidada, bem como parte do seu mecanismo de ação. De acordo com Beleboni e colaboradores (2006) o composto inibe o transporte de GABA e glicina em SCCR. Além disso, o composto FrPbAll foi utilizado em modelo de lesão retiniana aguda, onde a injeção endovenosa deste composto apresentou efeito neuroprotetor sobre os neurônios das camadas: nuclear interna e externa, mas não sobre a camada ganglionar (Beleboni *et al*, 2006).

Estudos comportamentais recentes com o composto também mostraram que este suprime a expressão de crises tônico-clônicas generalizadas, provocadas pela injeção de pilocarpina, ácido caínico e picrotoxina injetados por via i.c.v., além do petilenotetrazol (PTZ) por via sistêmica, sendo sua atividade anticonvulsivante comparada às atividades do diazepam (DZP) e do ácido nipecótico (Gelfuso *et al*, 2007).

Os resultados que foram obtidos estudando-se essa peçonha são importantes pois, fornecem informações que podem ser usadas em estudos neuroquímicos e comportamentais. Os efeitos desses compostos, os quais modulam e bloqueiam os transportadores de L-Glu e GABA são de grande interesse científico e farmacêutico, podendo indicar uma fonte alternativa de compostos neuroativos.



2-Objetivos

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

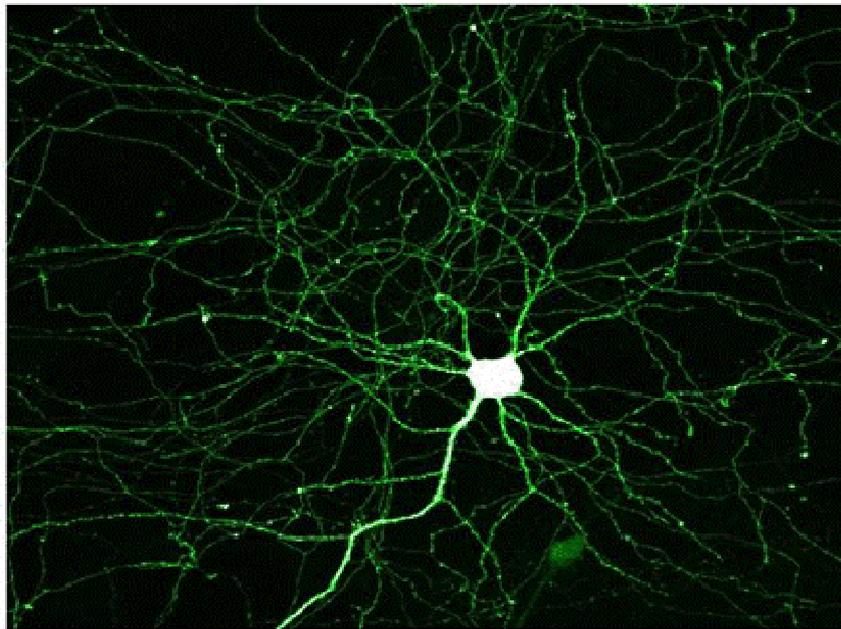
Conhecendo as limitações no tratamento do glaucoma, o grande potencial que peçonhas de artrópodes representam na criação de novos fármacos e que o composto FrPbAll inibe o transporte de GABA e glicina, os quais exercem atividade inibitória sobre o SN, este estudo teve como objetivo analisar os efeitos neuroprotetores deste composto utilizando o modelo de glaucoma experimental agudo em ratos Wistar. Para tanto foram analisadas as camadas histológicas da retina observando-se a sobrevivência de neurônios após a isquemia e isquemia seguida de reperfusão através de coloração por hematoxilina/eosina (HE).

2.2- Objetivos específicos

1- Obter a dose efetiva (DE_{50}) do composto através da injeção de três diferentes concentrações.

2- Uma vez que a FrPbAll inibe os transportes de GABA e glicina com doses efetivas semelhantes, avaliamos se o efeito fisiológico do composto na retina deve-se mais a ação sobre o sistema GABAérgico ou glicinérgico. Para tanto, foram associadas à FrPbAll as seguintes drogas: a bicuculina (antagonista competitivo de $GABA_A$), picrotoxina (antagonista não competitivo de $GABA_A$), imidazol (antagonista de $GABA_C$), faclofen (antagonista de $GABA_B$) e estriquinina (antagonista seletivo de receptores de glicina).

3- Comparar a potência do composto FrPbAll com as seguintes drogas: ácido nipecótico (inibidor seletivo do transportador de GABA do tipo GAT1), SNAP 5114 (inibidor dos transportadores de GABA do tipo GAT2 e GAT3) e ALX 5407 (inibidor seletivo do transportador de glicina do tipo GLYT1).



3-Material e Métodos

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta das aranhas e extração das glândulas e reservatório de veneno

As aranhas foram coletadas nos municípios vizinhos a Ribeirão Preto-SP, e armazenadas em gelo durante a coleta, a extração das glândulas e reservatório de veneno foi realizada com auxílio de pinça e tesoura oftálmica, sendo o material armazenado à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior utilização.

3.2- Purificação do composto FrPbAll

Um total de 4.500 glândulas foram maceradas formando um extrato, ao qual foram adicionados 1000 μL de solução $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN}$ (50%), sendo posteriormente centrifugado a 10.000g, à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. A seguir, o sobrenadante foi filtrado em filtros Milipore ($>3000\text{ DA}$), liofilizado e pesado. A purificação do extrato que continha compostos com massas moleculares abaixo de 3000 DA, foi conduzida de acordo com Belebni e colaboradores (2007).

A purificação do composto FrPbAll em cromatógrafo líquido de alto desempenho (CLAD) foi realizada em duas etapas, sendo que a primeira etapa foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes (FCFRP-USP), e a segunda etapa foi realizada no laboratório do Prof. Dr. René de Oliveira Belebni (Biotecnologia-UNAERP). Na primeira fase de purificação, o extrato liofilizado foi ressuspensionado em 1 mL de solução $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN}$ (50%), em CLAD. A fração ativa foi re-cromatografada, sendo os dois estágios de purificação de acordo com Belebni *et al* (2006). A massa do composto foi constatada através de espectrometria de massa; em um espectrômetro de massa triplo quadripólo (Quatro LC, Micromass, UK Grã-Bretanha) sendo o espectro de alta resolução adquirido em um aparato UltrOTOF (Bruker daltonics, Billerica, USA). A seguir o composto foi re-suspensionado em salina 0.9% para a

realização dos ensaios biológicos. A figura 5 mostra as etapas do processo de isolamento, até a cirurgia.

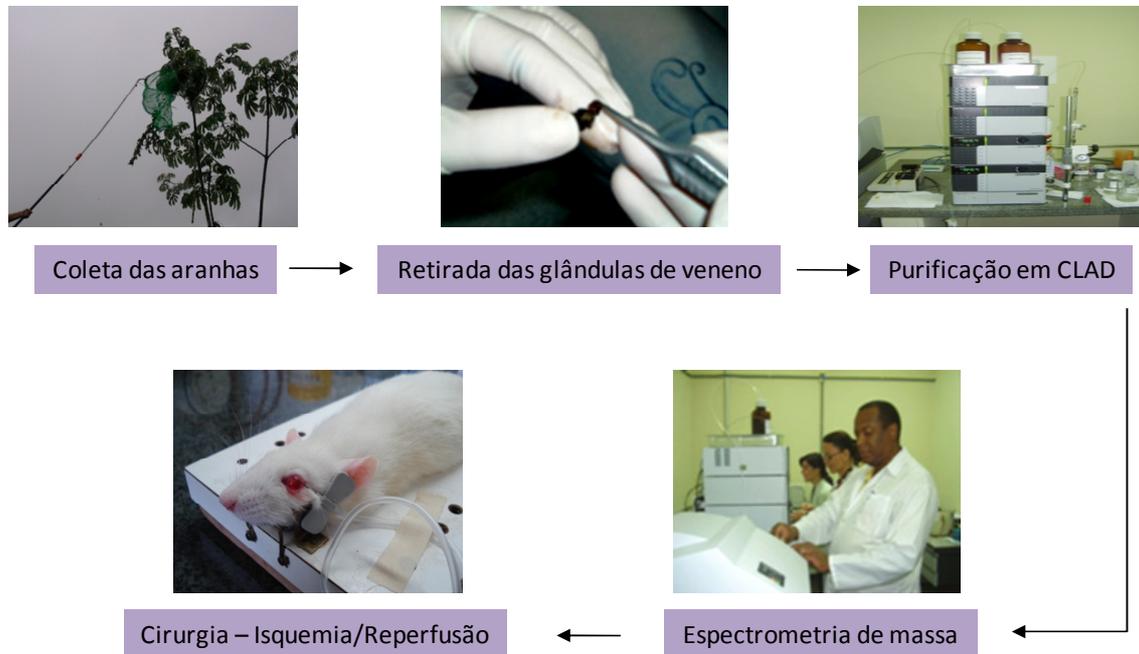


Figura 5: Fluxograma ilustrando as etapas do isolamento do composto FrPbAll.e bioensaio. Fotografias dos arquivos do laboratório de neurobiologia e peçonhas-FFCLRP-USP.

3.3-Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 200-250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram acondicionados em caixas aos pares, e alojados no biotério de manutenção do Departamento de Biologia com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes às 7:00 h) e temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Os animais foram tratados conforme as diretrizes para o uso de animais em pesquisa segundo a Sociedade Brasileira para Neurociências. Foi solicitado o certificado do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto, cujo número do processo é: 06.1.1280.53.5.

3.4- Drogas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas: bicuculina (40 nmol – Oliveira, 2004), picrotoxina (100 μ M – Ye, 2007), imidazol (100 μ M – Tunnicliff, 1998), faclofen (0,1mM – Waraczynski, 2007) e estriquinina (100 μ M – Salceda, 2005), ácido nipecótico (12 μ g – Gelfuso, 2007), SNAP 5114 (20 μ mol – Dalby, 2000) e ALX 5407 (20 μ M – Kinney, 2003). Todas as drogas supracitadas foram adquiridas da Sigma-Aldrich, EUA e foram injetadas via humor vítreo.

Para a anestesia foram utilizados: o colírio anestésico Allergam® (Frumtost, Brasil) e o tiopental sódico (Cristália, Brasil).

3.5- Cirurgia: Modelo de isquemia –glaucoma experimental

Foi utilizado o modelo de isquemia, com pressão de ar na câmara interna do olho do animal, induzido por um sistema semelhante ao desenvolvido por Louzada Jr *et al.* (1992), seguindo o mesmo protocolo experimental.

Em resumo, os animais (n=3, por grupo) depois de anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50 mg/kg), foram contidos em uma mesa cirúrgica e em seguida, aplicou-se o colírio anestésico no olho esquerdo (experimental). A seguir foram injetados os pré-tratamentos com o auxílio de um cateter tipo *butterfly* diretamente no humor vítreo do olho experimental. Foram conduzidos os seguintes pré-tratamentos: salina, FrPbAll (0,03; 0,075 e 0,15 μ g/ μ L), FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+bicuculina; FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+picrotoxina; FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+imidazol; FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+faclofen; FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+estriquinina; salina+ácido nipecótico (12 μ g/ μ L); salina+SNAP-5114; salina+ALX-540; FrPbAll (0,03 μ g/ μ L)+ácido nipecótico (3 μ g/ μ L); FrPbAll (0,15 μ g/ μ L)+ácido nipecótico (12 μ g/ μ L); FrPbAll (0,15

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+SNAP-5114; FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX-540. Cada pré-tratamento foi administrado antes da isquemia e antes da isquemia seguida de reperfusão.

Dez minutos após a administração das drogas, a pressão foi lentamente elevada até 120 mmHg permanecendo neste patamar por 45 min. A pressão utilizada foi monitorada por um manômetro. Os animais dos grupos isquemia foram então sacrificados e seus olhos foram eunucleados.

Em um segundo experimento (isquemia+reperfusão), a pressão intra-ocular retornou aos níveis normais e permaneceu neste patamar por 15 min. Nestes casos, após os animais foram então sacrificados e seus olhos eunucleados ao final do período de reperfusão.

3.6- Procedimentos histológicos

Todos os olhos experimentais, foram eunucleados rapidamente, imersos em solução de ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formaldeído e 5mL de ácido acético) por um período de 15 horas. Depois dos olhos fixados, as córneas e os cristalinos foram removidos. Em seguida as retinas foram destinadas a desidratação e inclusão em parafina. Após a montagem dos blocos, as retinas foram cortadas transversalmente a 4 μm de espessura, os cortes distendidos em lâmina, e corados com hematoxilina/eosina.

3.7- Análise qualitativa dos resultados

De cada grupo experimental foram feitas cinco capturas de imagens por retina, totalizando 15 imagens por grupo, por um sistema que compreende uma câmera digital colorida Leica (DFC300 FX) conectada a um microscópio (DM 5000 B, Leica

Microsystems – Alemanha) e a um computador, e o auxílio do software Q-Win (Leica Microsystems – Alemanha). Destas, uma captura de imagem para cada grupo foi escolhida para representação fotográfica. Na análise qualitativa das retinas foram verificados os seguintes parâmetros: degeneração, necrose, edema e desorganização das camadas retinianas. Na figura são mostradas as etapas do procedimento cirúrgico.

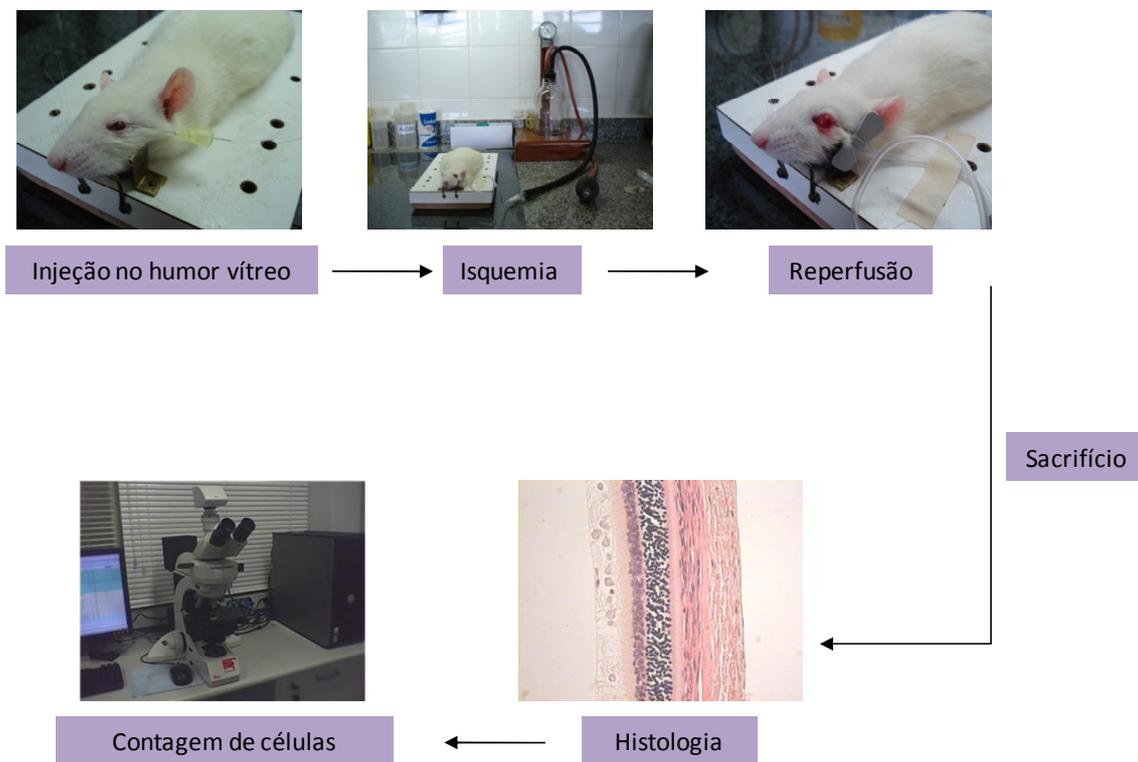


Figura 6: Fluxograma ilustrando as etapas da parte experimental do trabalho. Injeção no humor vítreo; Cirurgia para a indução da isquemia através do aumento da PIO; Reperfusão; Secção histológica da retina e Sistema para captura de imagens e contagem de células. Fotografias dos arquivos do laboratório de neurobiologia e peçonhas-FFCLRP-USP.

3.8- Análise quantitativa dos resultados

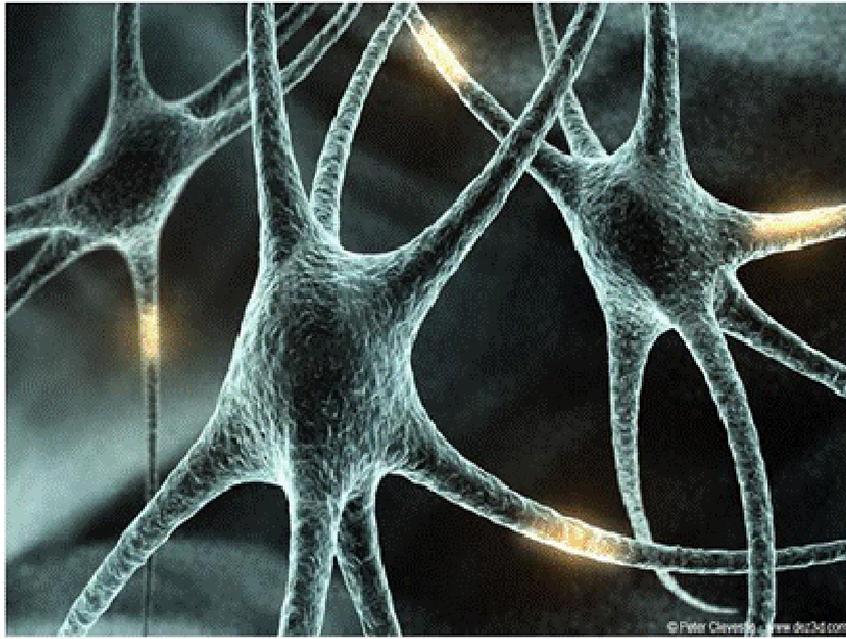
Após a obtenção das imagens a contagem das células foi feita manualmente de forma mascarada (*masked fashion*) enquanto as espessuras foram mensuradas em μm . Os resultados desses experimentos foram normalizados utilizando o método de correção de Abercrombie, (Abercrombie, 1949), de acordo com a seguinte fórmula:

$$N/\text{mm}^2 = \frac{n[T/(T+D)]}{A(\text{mm}^2)}$$

Onde: N – número real; n – número observado; T – espessura do corte; D – diâmetro do núcleo e A – área em mm^2 .

3.9- Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de pós-teste de Tukey, considerando significativo $p < 0.05$. Estes dados foram demonstrados como média \pm EPM, e as análises foram feitas utilizando-se o programa SPSS 13.0 e os gráficos foram confeccionados utilizando-se o programa Graph prism 4.0.



4-Resultados

4- RESULTADOS

4.1 - Análise qualitativa

4.1.1- Retinas submetidas à isquemia

Nas figuras 7, 8 e 9 podem ser visualizadas microfotografias das camadas CNE, CNI e CCG das retinas dos ratos submetidos à isquemia e coradas com HE. A análise histopatológica destas secções indica a presença de vacúolos no citoplasma de algumas células bem como núcleos encolhidos e picnóticos em todas as camadas, as quais se apresentam desorganizadas. Estas características em conjunto indicam um processo de degeneração tecidual. Em contraste, as retinas tratadas com a FrPbAll nas doses: 0,075 µg/µL e 0,15 µg/µL e com ácido nipecótico apresentaram raros núcleos picnóticos e células vacuolizadas (Figura 7 D, E e F). Além disso, pode-se observar preservação estrutural de todas as camadas retinianas. No entanto, não foi observado preservação do tecido após a associação da FrPbAll principalmente com o imidazol (8 G) e estriquinina (9 C).

Animais tratados com a associação de bloqueadores de receptores de GABA A, C e de glicina com a FrPbAll apresentam secções histológicas semelhantes aos animais sem tratamento. Desta forma, nas secções dos animais tratados com antagonistas GABAérgicos e glicinérgicos associados a FrPbAll, podem ser observadas as características de dano neuronal descritas para os animais submetidos a isquemia sem pré-tratamento (Figuras 8 C, D e G e 9 C).

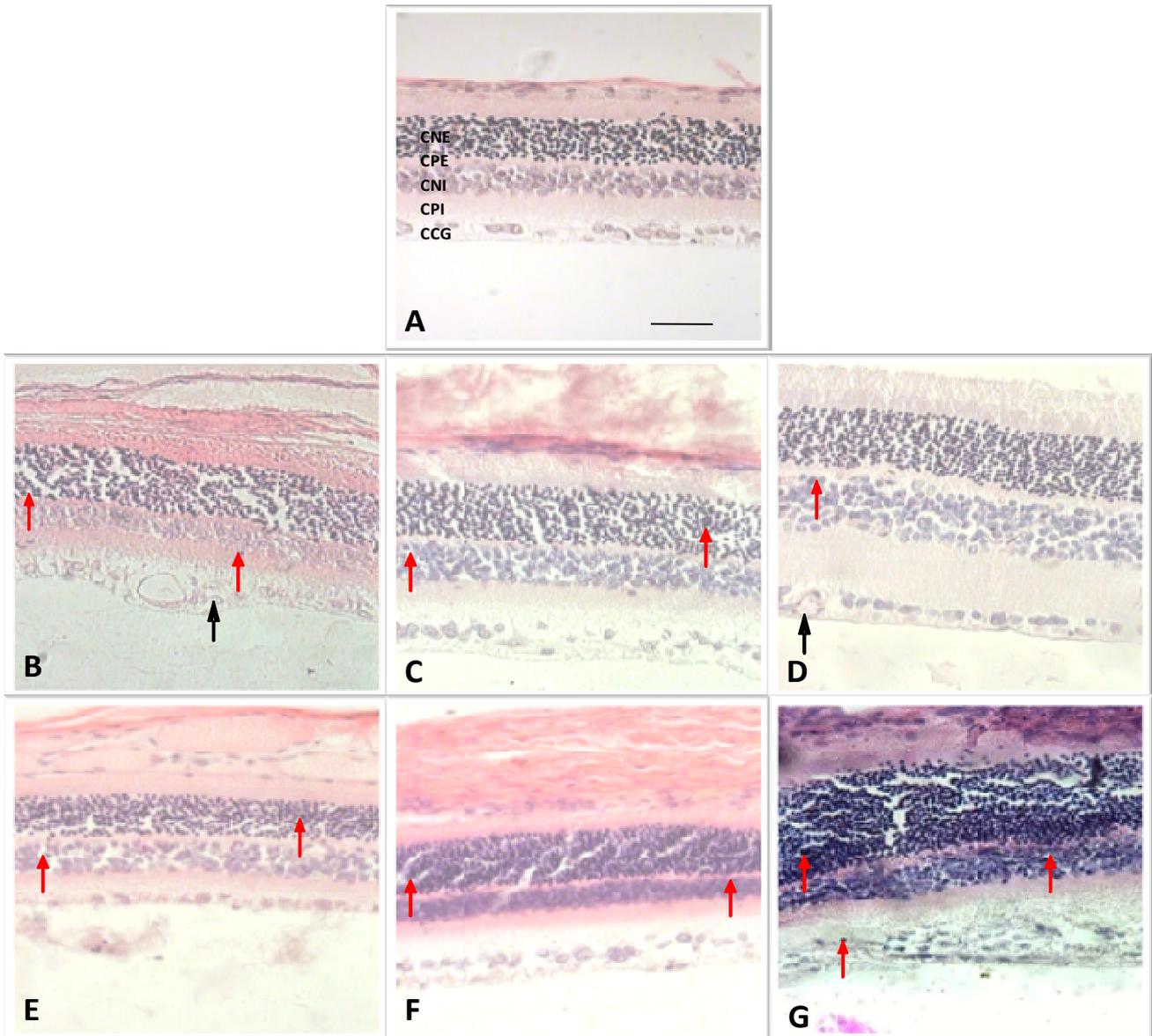


Figura 7: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) isquemia + salina, (C) tratamento com a FrPbAll 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (D) tratamento com a FrPbAll 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (E) tratamento com a FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (F) tratamento com o ácido nipecótico 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e (G) tratamento com o ácido nipecótico 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + FrPbAll 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 μm .

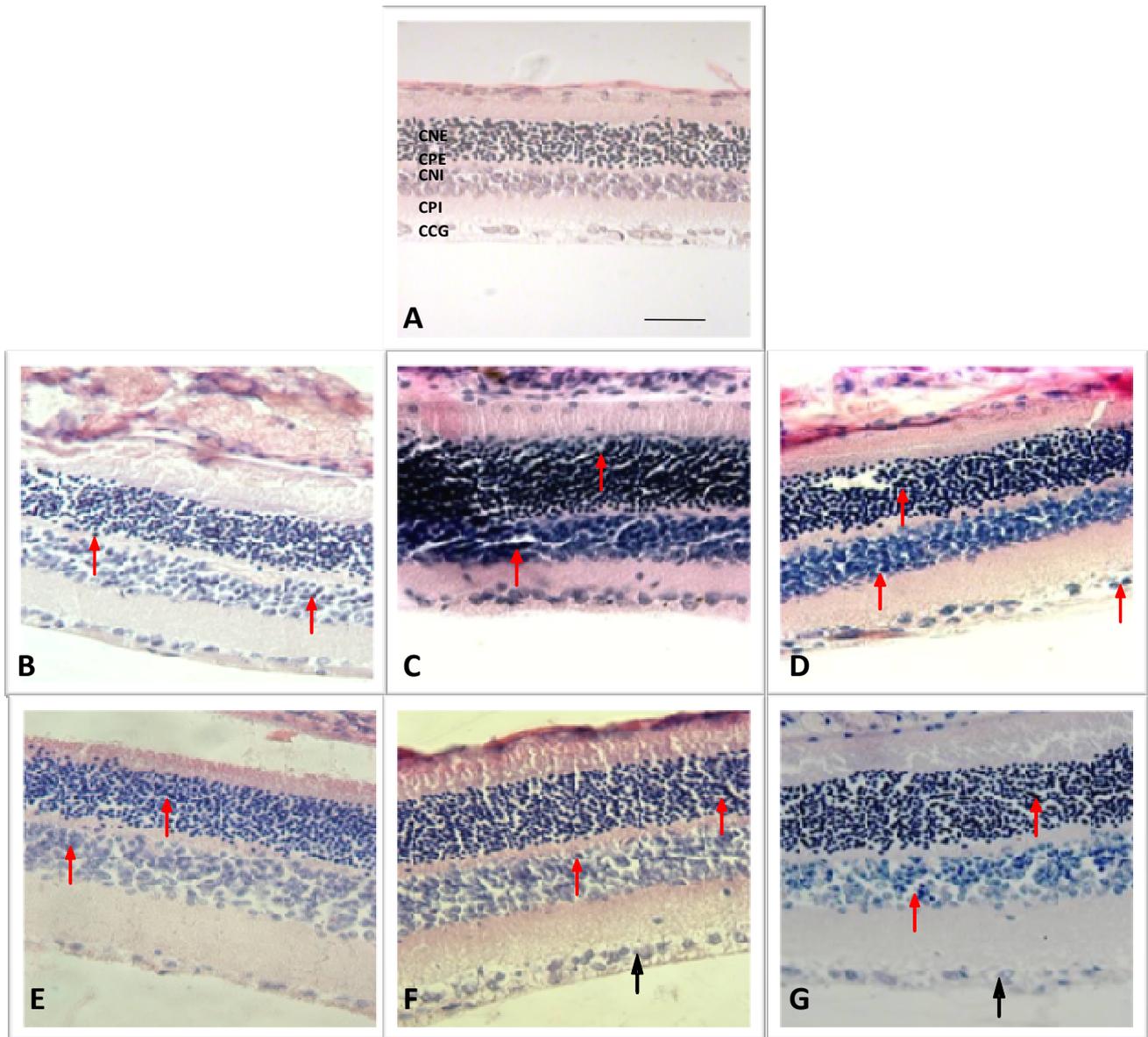


Figura 8: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) tratamento com o ácido nipecótico 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (C) tratamento com a bicuculina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (D) tratamento com a picrotoxina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (E) tratamento com o imidazol 14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (F) tratamento com o imidazol 14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sem cirurgia) e (G) tratamento com o imidazol + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 μm .

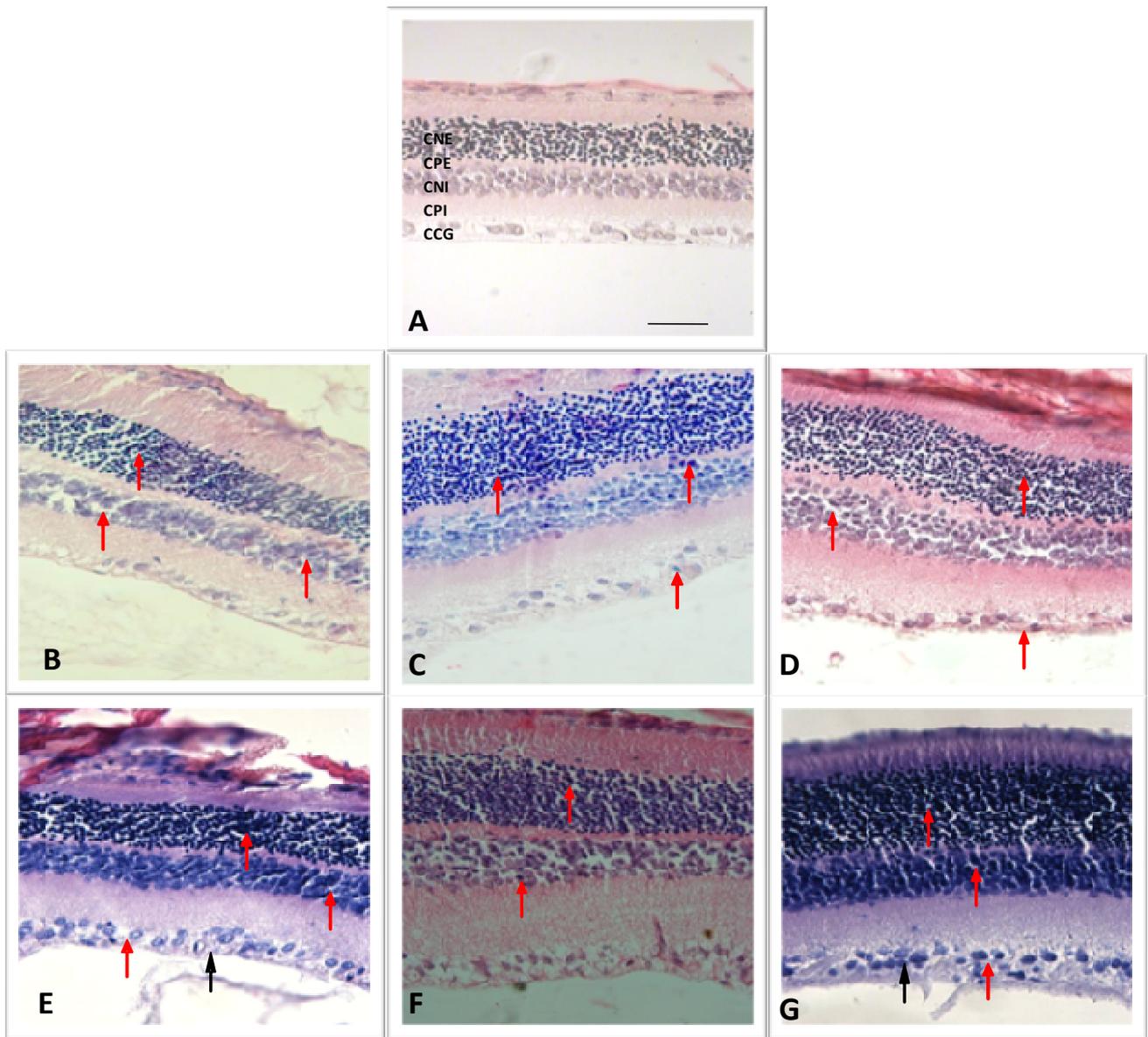


Figura 9: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) tratamento com o faclofen + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (C) tratamento com a estriquinina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (D) tratamento com o SNAP 5114 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (E) tratamento com o SNAP 5114 + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (F) tratamento com o ALX 5407 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e (G) tratamento com o ALX 5407 + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 μm .

4.1.2-Retinas submetidas à isquemia com reperfusão

Nas figuras 10, 11 e 12 podem ser visualizadas microfotografias das camadas CNE, CNI e CCG das retinas dos ratos submetidos à isquemia com reperfusão e coradas com HE. A análise histopatológica destas secções indica a presença de vacúolos no citoplasma de algumas células bem como núcleos encolhidos e picnóticos em todas as camadas, as quais se apresentam desorganizadas. Estas características em conjunto indicam um processo de degeneração tecidual. Em contraste, as retinas tratadas com a FrPbAII nas doses: 0,075 µg/µL e 0,15 µg/µL e com ácido nipecótico apresentaram raros núcleos picnóticos e células vacuolizadas (Figura 10 D, E e F). Além disso, pode-se observar preservação estrutural de todas as camadas retinianas. No entanto, não foi observado preservação do tecido após a associação da FrPbAII principalmente com o imidazol (11 G) e estriquinina (12 C).

Animais tratados com a associação de bloqueadores de receptores de GABA A, C e de glicina com a FrPbAII apresentam secções histológicas semelhantes aos animais sem tratamento. Desta forma, nas secções dos animais tratados com antagonistas GABAérgicos e glicinérgicos associados a FrPbAII, podem ser observadas as características de dano neuronal descritas para os animais submetidos a isquemia sem pré-tratamento (Figuras 11 C, D e G e 12 C).

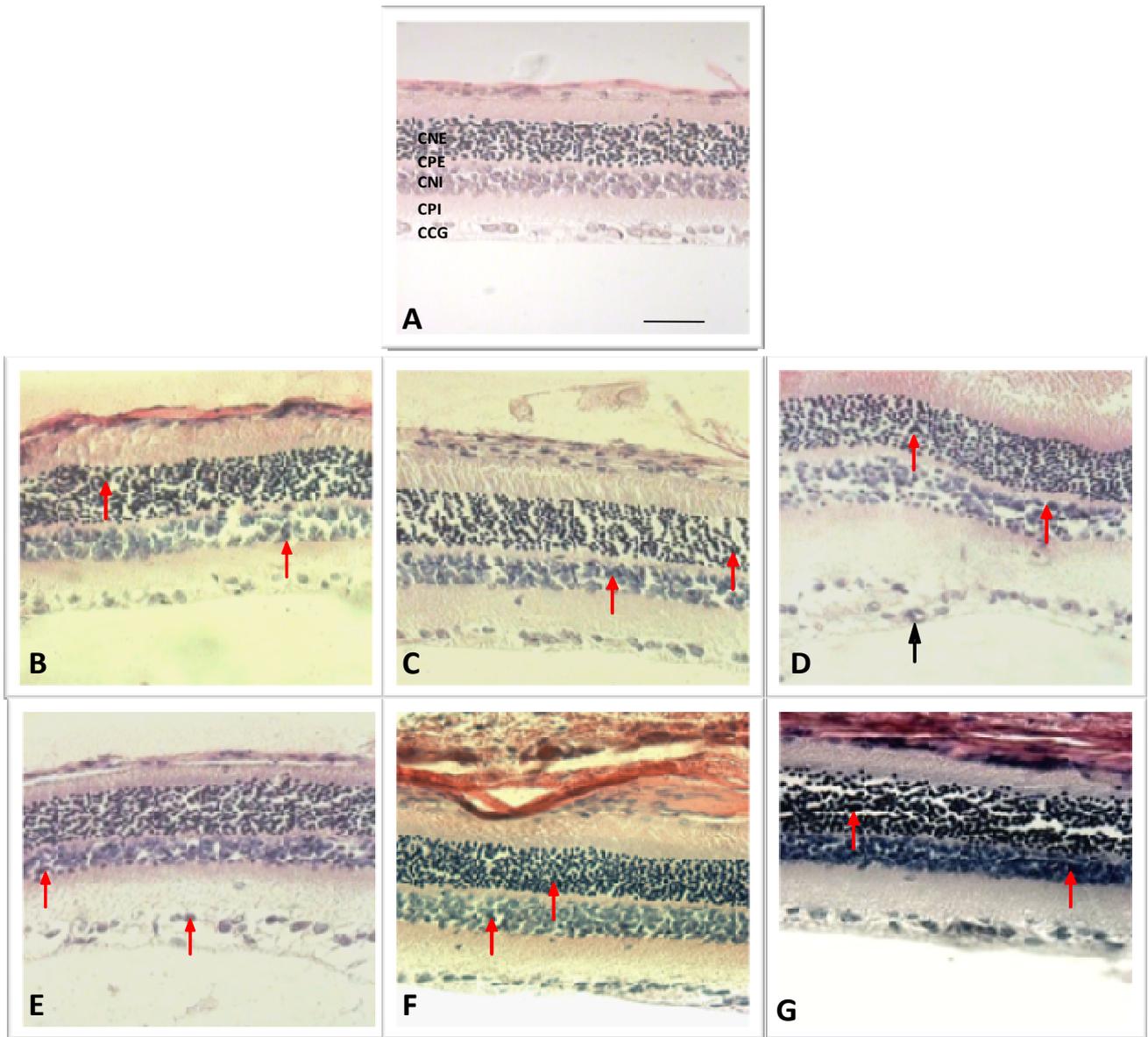


Figura 10: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia com reperusão e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) isquemia + salina, (C) tratamento com a FrPbAII 0,03 µg/µL, (D) tratamento com a FrPbAII 0,075 µg/µL, (E) tratamento com a FrPbAII 0,15 µg/µL, (F) tratamento com o ácido nipecótico 12 µg/µL e (G) tratamento com o ácido nipecótico 3 µg/µL + FrPbAII 0,03 µg/µL. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 µm.

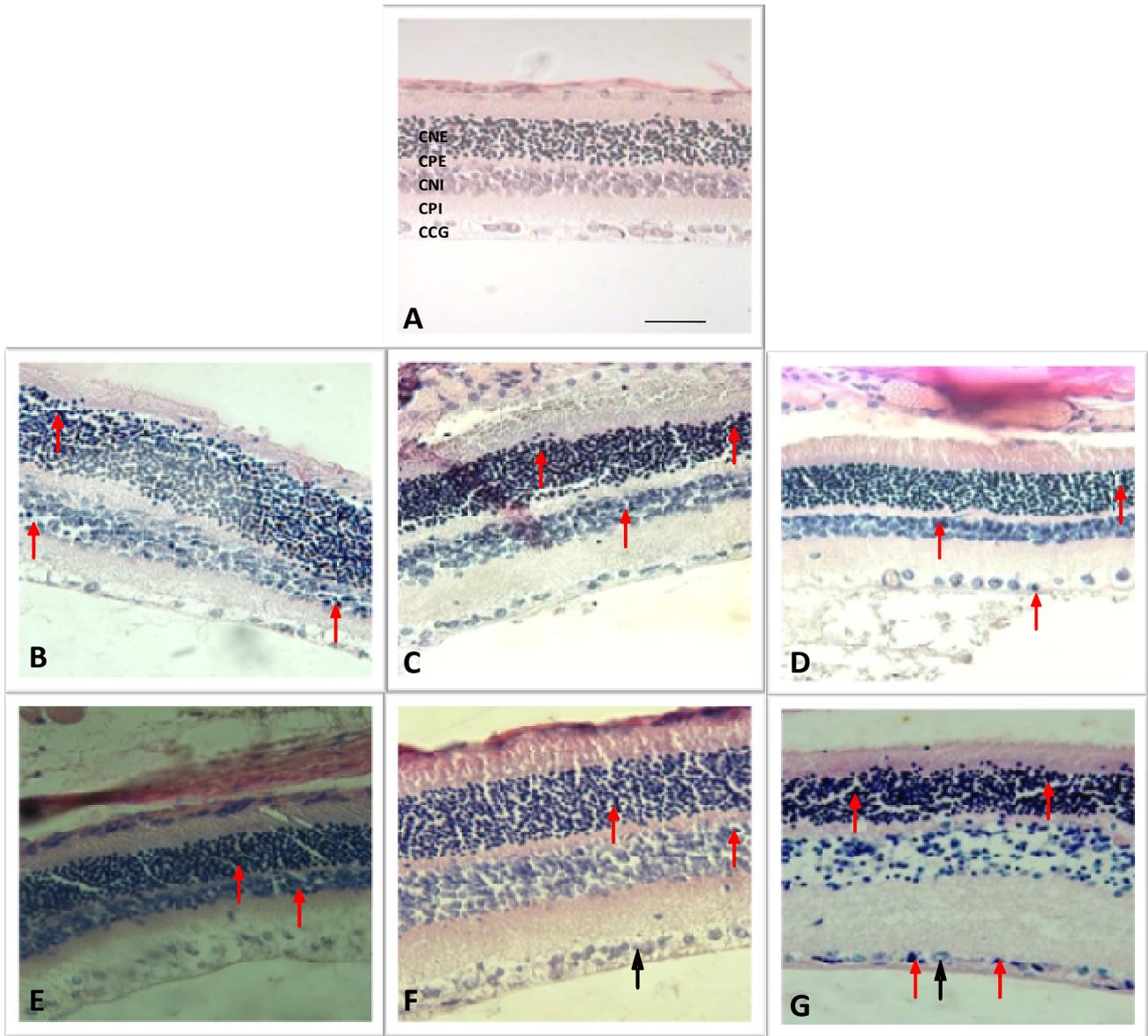


Figura 11: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia com reperfusão e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) tratamento com o ácido nipecótico 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (C) tratamento com a bicuculina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (D) tratamento com a picrotoxina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (E) tratamento com o imidazol 14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (F) tratamento com o imidazol 14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (sem cirurgia) e (G) tratamento com o imidazol + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 μm .

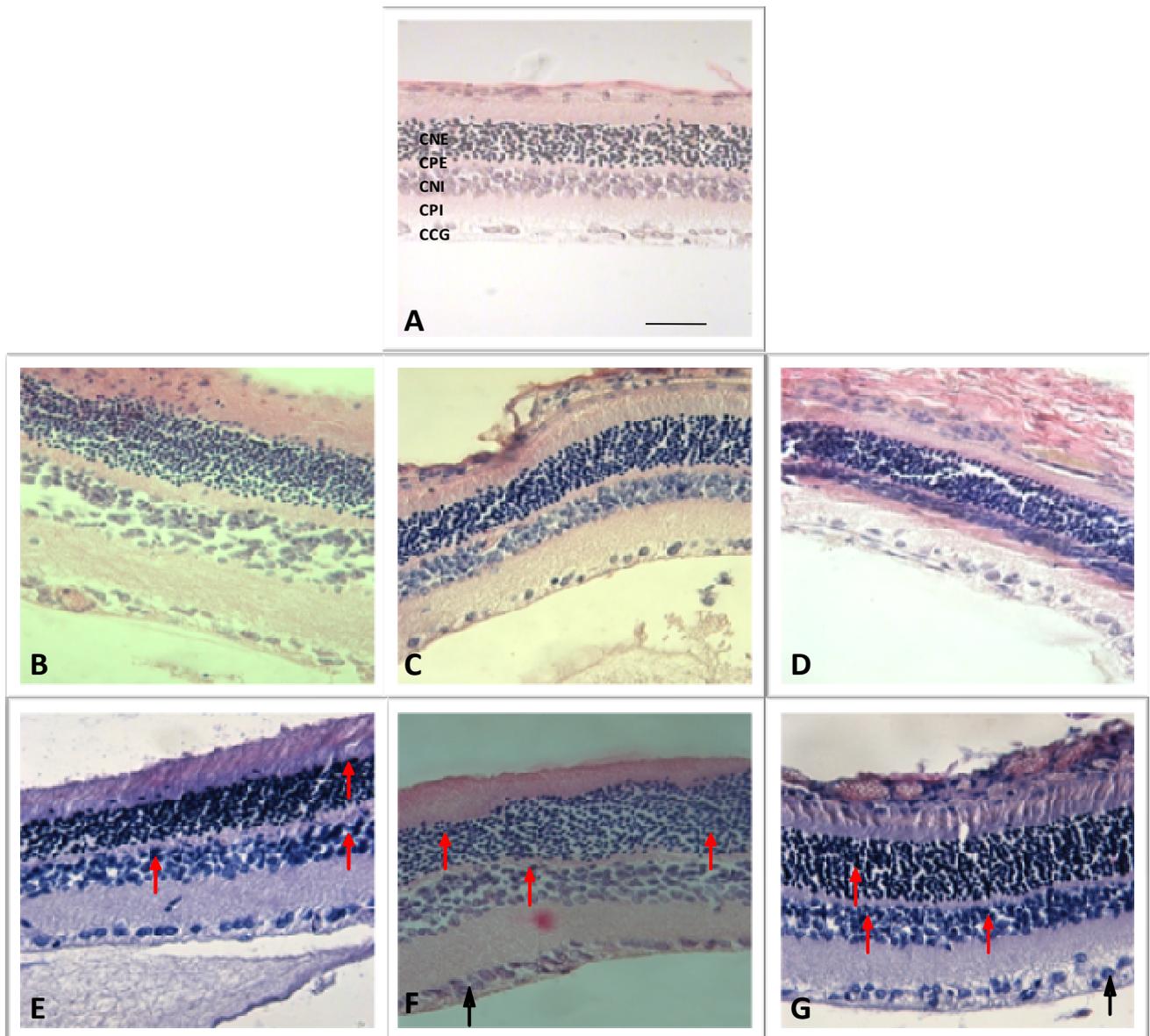


Figura 12: Fotografias de secções de retina de ratos Wistar submetidos à isquemia com reperfusão e coradas com (H.E.). (A) controle, (B) tratamento com o faclofen + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (C) tratamento com a estriquinina + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (D) tratamento com o SNAP 5114 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (E) tratamento com o SNAP 5114 + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (F) tratamento com o ALX 5407 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e (G) tratamento com o ALX 5407 + FrPbAll 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Setas vermelhas indicam núcleos picnóticos, setas pretas indicam vacuolizações. Aumento de 400x. Valor da barra 53 μm .

4.2- Análise quantitativa

4.2.1- Retinas submetidas à isquemia

Curva dose-resposta

A análise quantitativa das retinas revelou diferenças significativas entre as densidades médias das retinas submetidas à isquemia com relação aos grupos controle e aos grupos tratados com diferentes doses da FrPbAll na CNE [F(4,74)= 17,35; p=0,0002], na CNI [F(4,74)= 20,24; p<0,0001] e na CCG [F(4,74)= 26,29; p<0,0001].

Na CNE observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia apresentaram uma redução na densidade de neurônios em média a 43% da densidade de neurônios encontradas em retinas dos olhos não submetidos à isquemia (p<0,001). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. As estimativas de densidade de neurônios na CNE com relação ao grupo controle não submetido à isquemia mostraram que 50% de células neuroniais foram preservadas para a dose de 0,03µg/µL; 84% para a dose 0,075 µg/µL e 95% para a dose de 0,15 µg/µL (p<0,05) (figura 1).

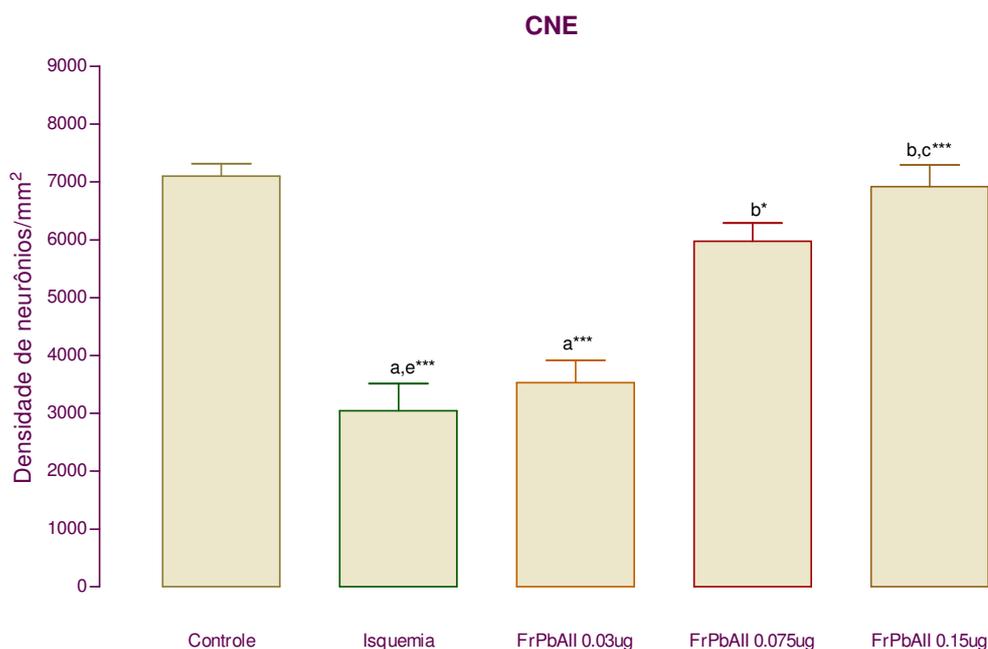


Figura 13: Gráfico representativo das densidades neuronias médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (controle - a); tratados com salina e submetidos à isquemia (isquemia - b) e tratados com três doses de FrPbAll (0,03 - c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Na CNI observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia apresentaram uma redução na densidade de neurônios em média a 33% da densidade de neurônios encontradas em retinas dos olhos não submetidos à isquemia ($p < 0,001$). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. As estimativas das densidades de neurônios na CNI com relação ao grupo controle não submetido à isquemia foram de 28% de células neuronias preservadas para a dose de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 58% para a dose 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 82% para a dose de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (figura 2).

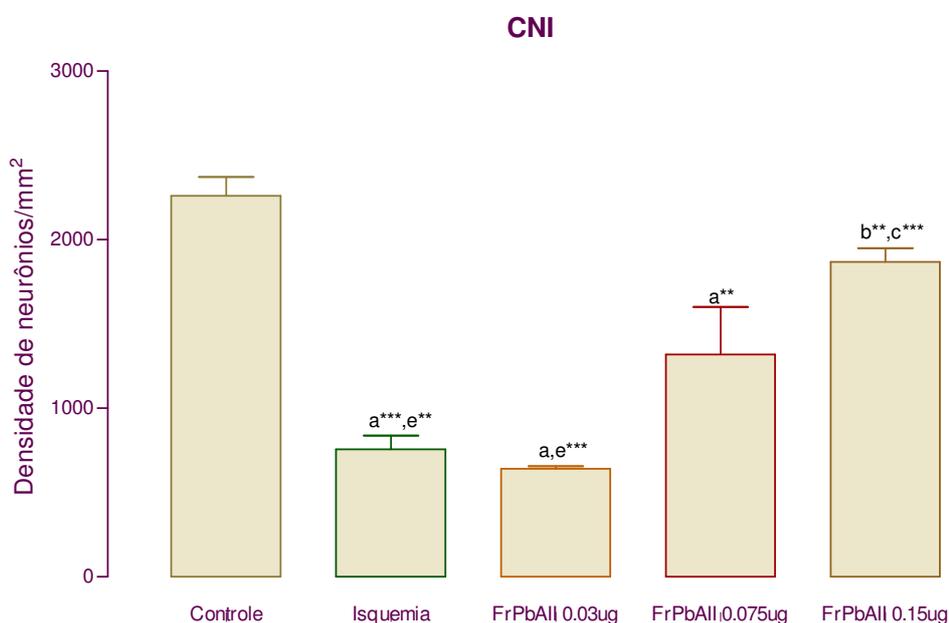


Figura 14: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle); tratados com salina e submetidos à isquemia (b- isquemia) e tratados com três doses de FrPbAll (0,03 - c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na CCG observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia apresentaram uma redução na densidade de neurônios em a média, 38% da densidade de neurônios encontradas em retinas dos olhos não submetidos à isquemia ($p < 0,001$). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. As estimativas das densidades de neurônios na CNI com relação ao grupo controle não submetido à isquemia foram de 41% de células neuronais preservadas para a dose de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 81% para a dose 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 99% para a dose de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (figura 3).

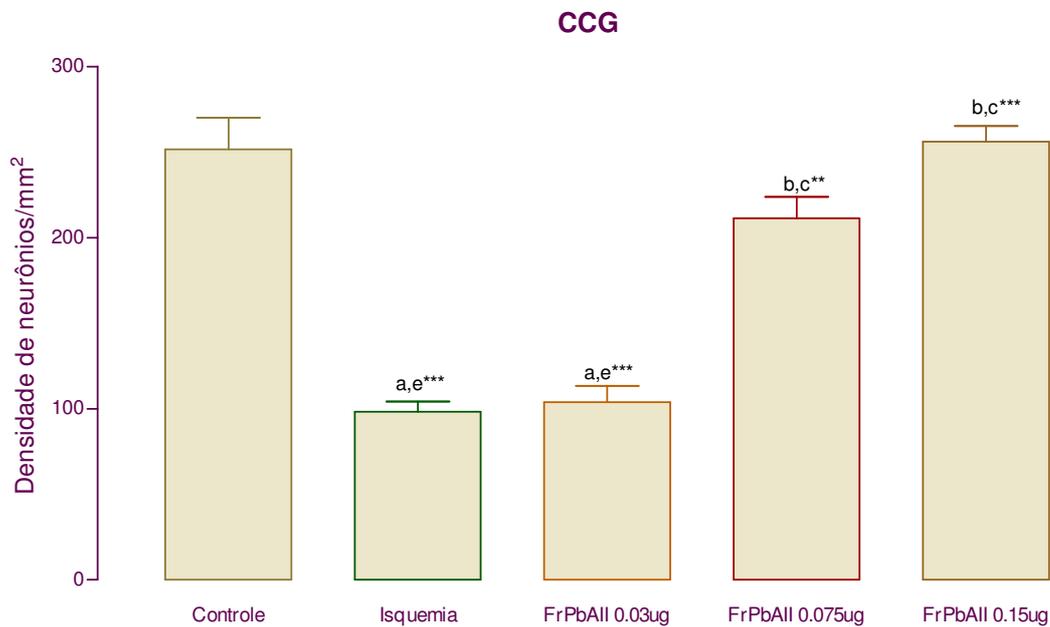


Figura 15: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle); tratados com salina e submetidos à isquemia (b- isquemia) e tratados com três doses de FrPbAll (0,03 – c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Associação da FrPbAll com antagonistas de receptores de GABA e glicina

Os dados obtidos após a análise dos olhos injetados com a FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em associação com antagonistas de receptores de GABA do tipo A, B e C, bem como o antagonista de receptores de glicina revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nas três camadas retinianas analisadas; CNE [F(7,119)= 8,865; $p < 0,0001$], na CNI [F(7,119)= 27,15; $p < 0,0001$] e na CCG [F(7,119)= 11,56; $p < 0,0001$].

Neste sentido, foi observado que o efeito neuroprotetor da FrPbAll foi parcialmente revertido pelo bloqueio dos receptores de GABA e glicina na camada CNE, sendo observada uma redução na porcentagem de neurônios sobreviventes após a isquemia. FrPbAll com os antagonistas. Nesta camada, as densidades das retinas não submetidas à isquemia foram significativamente maiores que as densidades das retinas dos animais pré-tratados com FrPbAll em associação com os antagonistas ($p < 0,05$). No entanto, não foram registradas diferenças estatísticas entre as densidades neuroniais das retinas tratadas com FrPbAll com relação às associações da da FrPbAll com todos os antagonistas (figura 4).

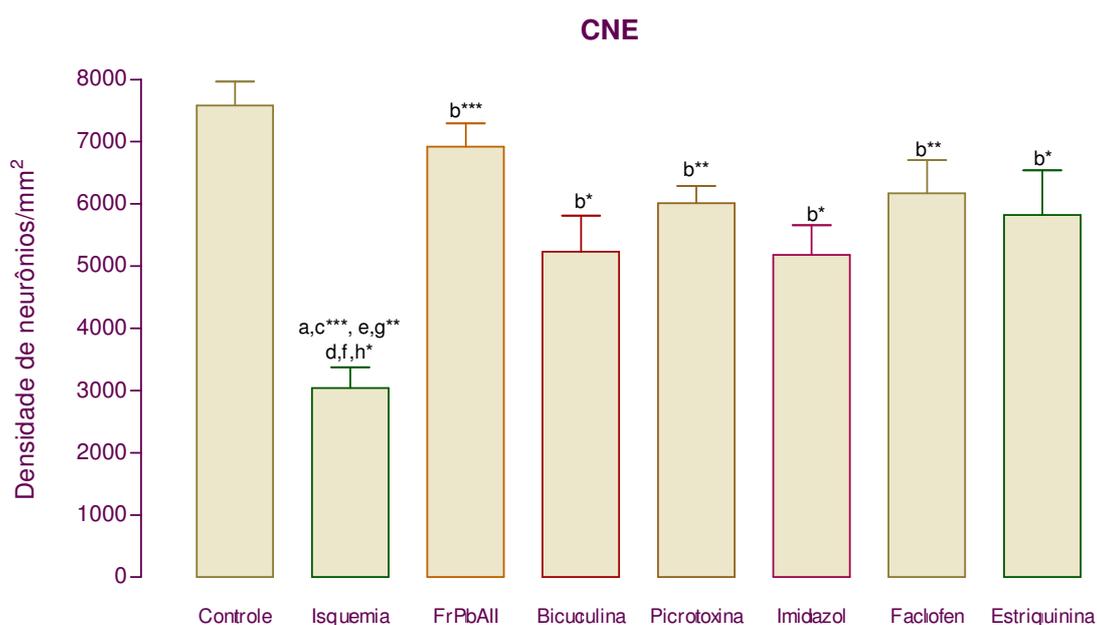


Figura 16: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Bicuculina (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); Picrotoxina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e); Imidazol (14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f), Faclofen (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - g) ou Estriquinina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com relação à CNI, foi observado que o efeito neuroprotetor da FrPbAll foi revertido pelo bloqueio dos receptores de GABA e glicina sendo observada uma redução acentuada na porcentagem de neurônios sobreviventes à isquemia para todas as associações, sendo encontrada para a associação FrPbAll+imidazol as menores densidades neuronais. Neste sentido, foram registradas diferenças estatísticas entre as densidades neuronais das retinas tratadas com FrPbAll em comparação às retinas tratadas com as associações da FrPbAll com todos os antagonistas ($p < 0,05$) (figura 5).

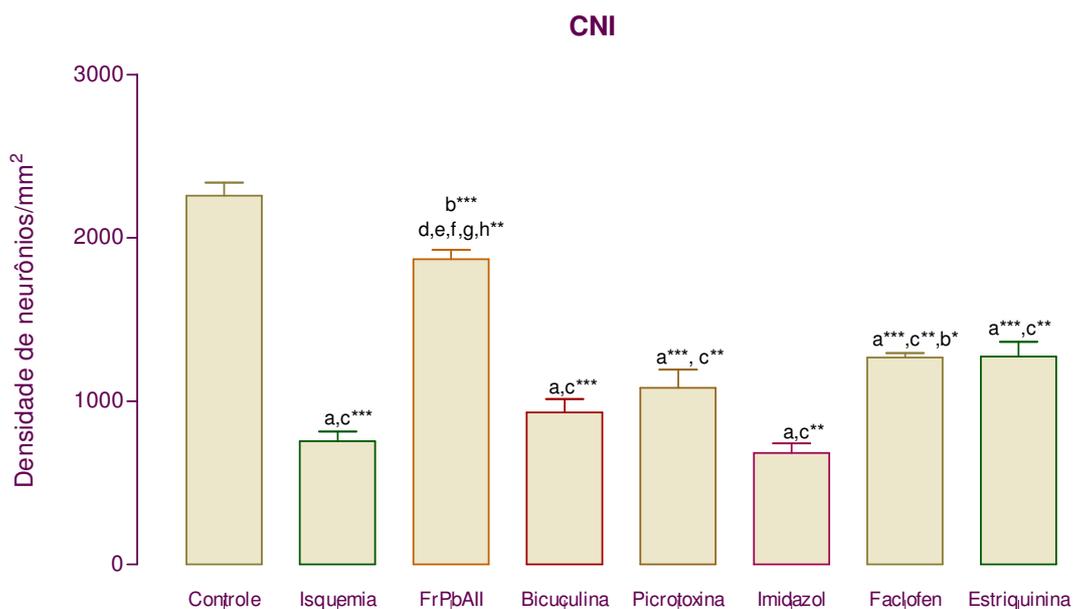


Figura 17: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b - isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Bicuculina (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); Picrotoxina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e); Imidazol (14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f), Faclofen (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - g) ou Estriquinina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os dados obtidos através da análise da densidade de neurônios da CCG demonstraram que o efeito neuroprotetor da FrPbAll foi revertido pelo bloqueio dos receptores de GABA do tipo A de modo competitivo (bicuculina), mas não do modo não competitivo (picrotoxina), bem como o bloqueio dos receptores de GABA tipo B e C e glicina. Neste caso, as menores densidades de neurônios foram observadas nas retinas dos animais injetados com o antagonista de receptores de GABA tipo C, imidazol. Neste sentido, foram registradas diferenças estatísticas entre as densidades neuronias das retinas tratadas com FrPbAll em comparação às retinas tratadas com as associações da FrPbAll com os antagonistas bicuculina ($p < 0,05$), imidazol ($p < 0,001$), faclofen ($p < 0,01$) e estriquinina ($p < 0,05$) (figura 6).

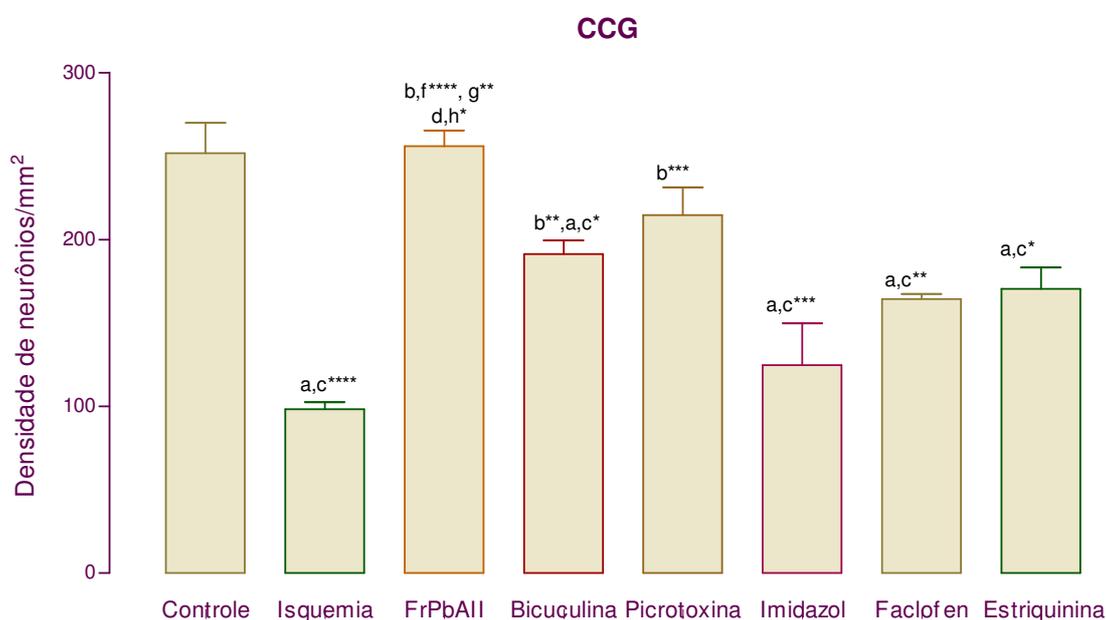


Figura 18: Gráfico representativo das densidades neuronias médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c);

Bicuculina (0,25 µg/µL - d); Picrotoxina (12 µg/µL - e); Imidazol (14,81 µg/µL - f), Faclofen (2,3 µg/µL - g) ou Estriquinina (12 µg/µL - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Comparação do efeito neuroprotetor da FrPbAll com o de inibidores do transporte de GABA e glicina

Os dados obtidos após a análise dos olhos injetados com a FrPbAll (0,15 µg/µL) em associação com os inibidores do transporte de GABA e glicina revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nas camadas retinianas; CNE [F(5,89)= 8,865; $p < 0,0001$], CNI [F(5,89)= 27,15; $p < 0,0001$] e CCG [F(5,89)= 15,82; $p < 0,0001$].

Nestes experimentos foram encontradas diferenças significativas entre as densidades de neurônios das três camadas CNE, CNI e CCG dos animais submetidos aos diferentes pré-tratamentos apenas com relação ao grupo de retinas submetidas à isquemia pré-tratadas com salina ($p < 0,05$). Desta forma, não foram verificadas diferenças estatísticas entres estes os tratamentos, nem com relação às densidades das retinas não-submetidas à isquemia (figuras 7, 8 e 9).

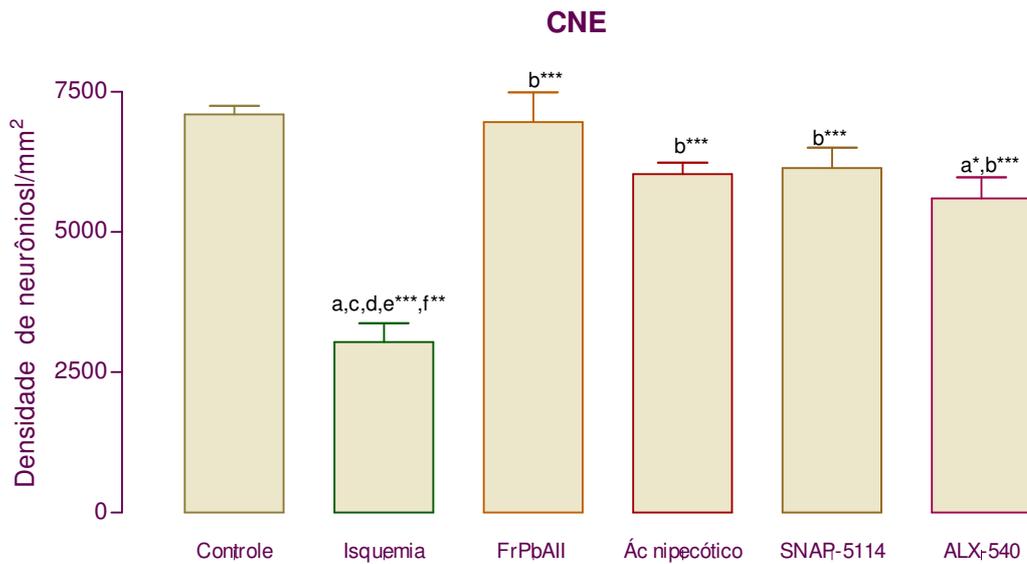


Figura 19: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

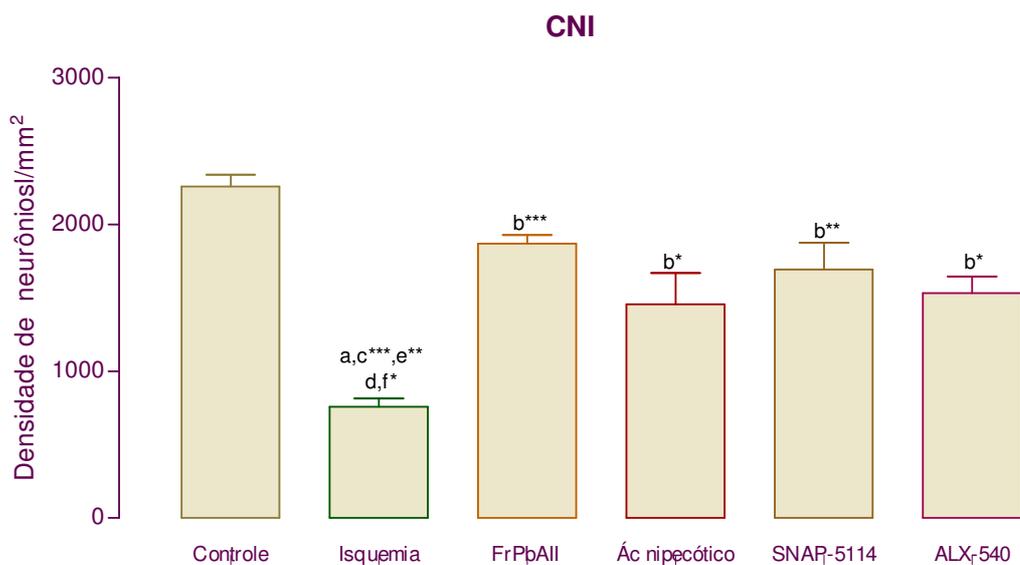


Figura 20: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -f). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

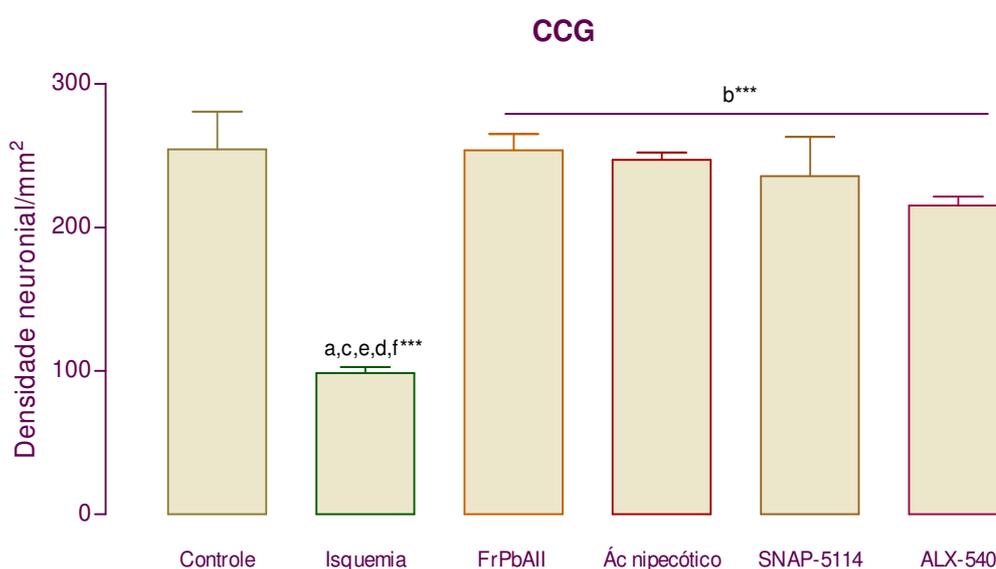


Figura 21: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -f). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Associação da FrPbAll com inibidores de transporte

Os dados obtidos após a análise das retinas injetadas com a FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em associação com os inibidores do transporte de GABA e glicina revelou diferenças significativas entre os tratamentos nas camadas retinianas; CNE [F(4,74)= 9,691; p= 0,0004] e na CNI [F(4,74)= 7,829; p=0,0013], mas não na camada CCG [F(4,74)= 0,5153; p= 0,7257].

Os dados obtidos através da análise da camada CNE apontaram diferenças estatísticas apenas entre as densidades das retinas tratadas com a associação entre FrPbAll e o inibidor do transporte de glicina SNAP-5114, com relação às densidades de retinas tratadas com FrPbAll sozinha e associada ao ácido nipecótico (p<0,05) (figura 11).

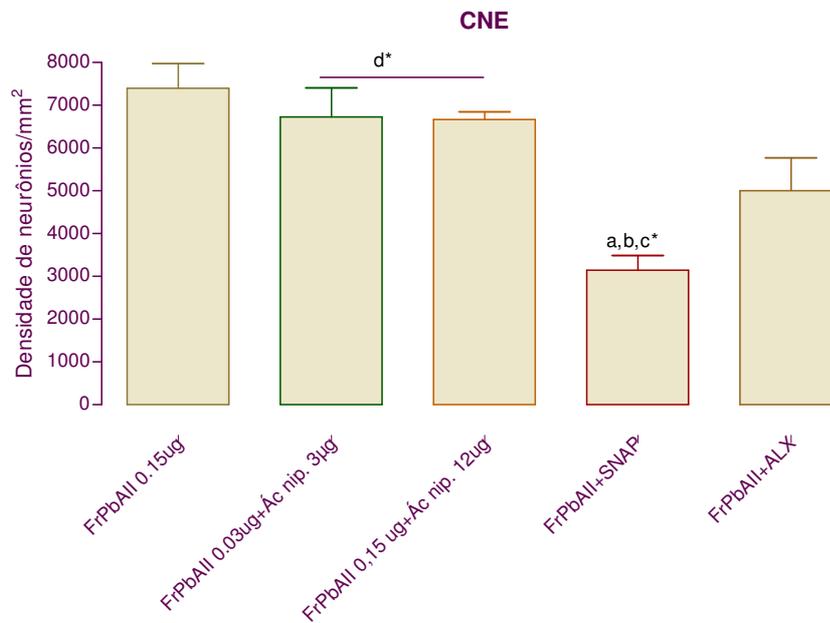


Figura 22: Gráfico representativo das densidades neuronias médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - a); FrPbAll (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - b); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); FrPbAll(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d) e FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se p<0,05(*).

Na camada CNI, a análise das densidades de neurônios sobreviventes apontou diferenças estatísticas entre as densidades das retinas tratadas apenas com a FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e aquelas tratadas com a associação entre FrPbAII e todos os demais inibidores do transporte de GABA e glicina ($p < 0,05$). Nestes experimentos, as menores densidades de neurônios sobreviventes foram encontradas nas retinas dos animais tratados com a associação FrPbAII+SNAP-5114 (figura 12).

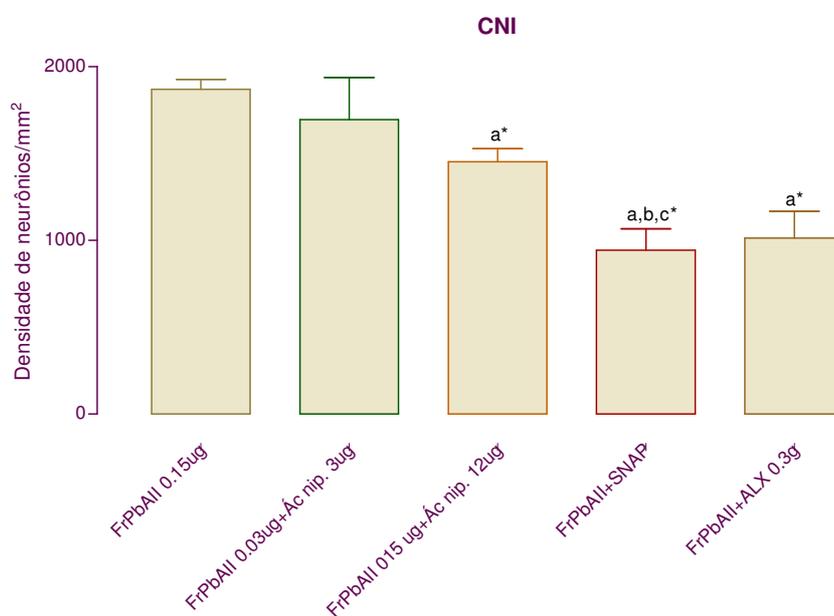


Figura 23: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - a); FrPbAII (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - b); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); FrPbAII(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -d) e FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ (*).

Por fim, na camada CCG não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (figura 13).

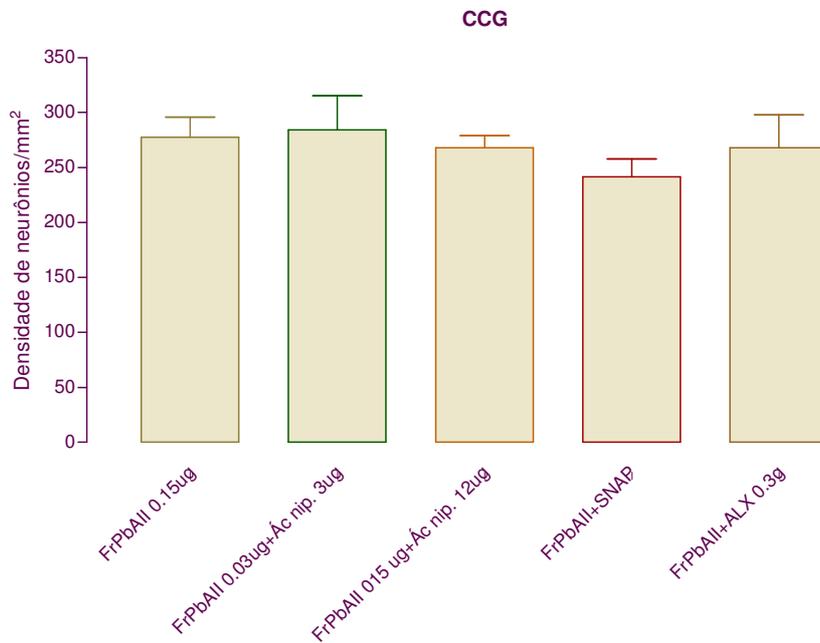


Figura 24: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min sem reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAll (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - a); FrPbAll (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - b); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); FrPbAll(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -d) e FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ (*).

4.2.2- Retinas submetidas à isquemia com reperfusão

Curva dose-resposta

A análise quantitativa das retinas revelou diferenças significativas entre as densidades médias das retinas submetidas à isquemia por 45 min seguida de reperfusão por 15 min com relação aos grupos controle e aos grupos tratados com diferentes doses da FrPbAll na CNE [F(4,74)= 26,51; $p < 0,0001$], na CNI [F(4,74)= 23,04; $p < 0,0001$] e na CCG [F(4,74)= 43,20; $p < 0,0001$].

Na CNE observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia seguida de reperfusão apresentaram densidades de neurônios equivalentes em média a 36,8% da densidade de neurônios encontrada em retinas dos olhos não submetidos à isquemia ($p < 0,001$). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. A quantificação da densidade de neurônios na CNE com relação ao grupo controle não submetido à isquemia/reperfusão mostrou que 43% de células neuronais foram preservadas para a dose de $0,03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; 57% para a dose $0,075 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 81% para a dose de $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (figura 13).

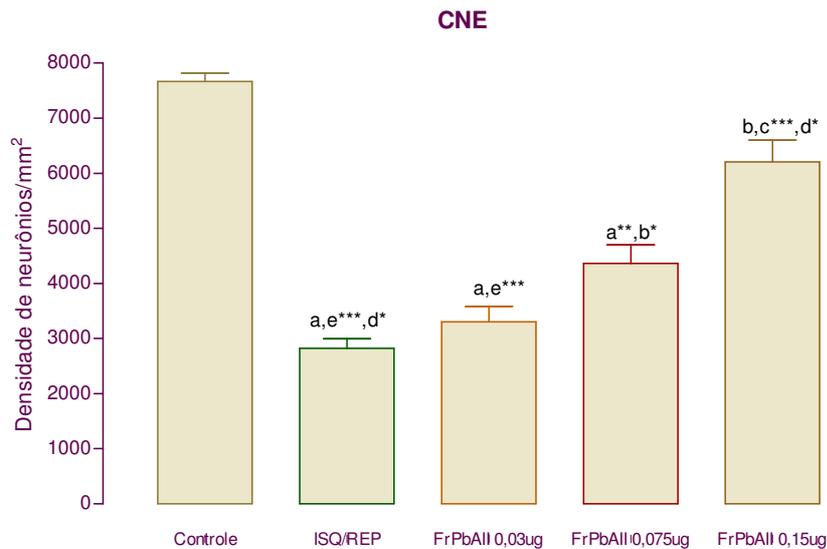


Figura 25: Gráfico representativo das densidades neuronias médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (controle - a); tratados com salina e submetidos à isquemia (isquemia - b) e tratados com três doses de FrPbAll (0,03 - c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Na CNE observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia/reperfusão apresentaram uma redução na densidade de neurônios à em média, 29% da densidade de neurônios encontradas em retinas dos olhos não submetidos à isquemia ($p < 0,001$). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. As estimativas das densidades de neurônios na CNE com relação ao grupo controle não submetido à isquemia/reperfusão foram de 41% de células neuronias preservadas para a dose de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 56% para a dose 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 87% para a dose de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (figura 14).

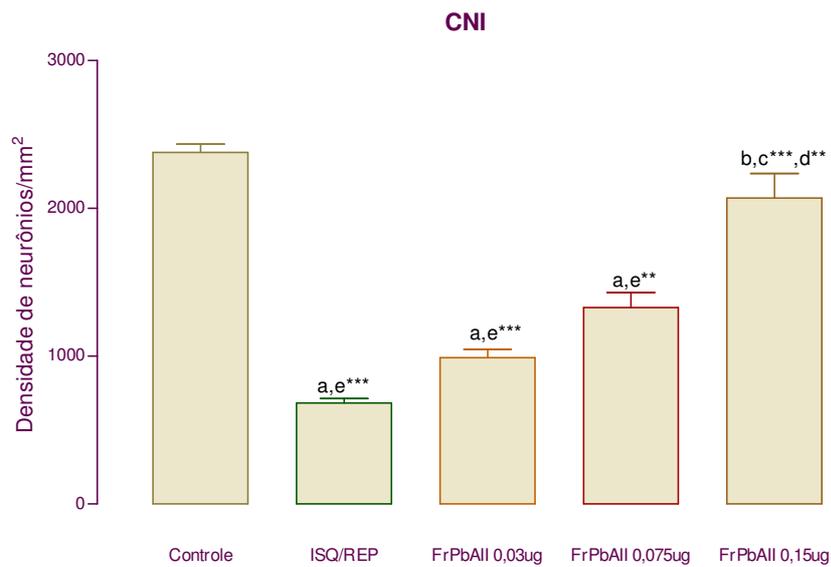


Figura 26: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle); tratados com salina e submetidos à isquemia (b- isquemia) e tratados com três doses de FrPbAll (0,03 - c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na CCG observou-se que as retinas dos olhos submetidos à isquemia/reperfusão apresentaram uma redução na densidade de neurônios à em média, 38% da densidade de neurônios encontradas em retinas dos olhos não submetidos à isquemia/reperfusão ($p < 0,001$). Nesta camada, o pré-tratamento com a FrPbAll exerceu um efeito neuroprotetor dependente de dose. As estimativas das densidades de neurônios na CNI com relação ao grupo controle não submetido à isquemia/reperfusão foram de 41% de células neuronais preservadas para a dose de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 81% para a dose 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 99% para a dose de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (figura 15).

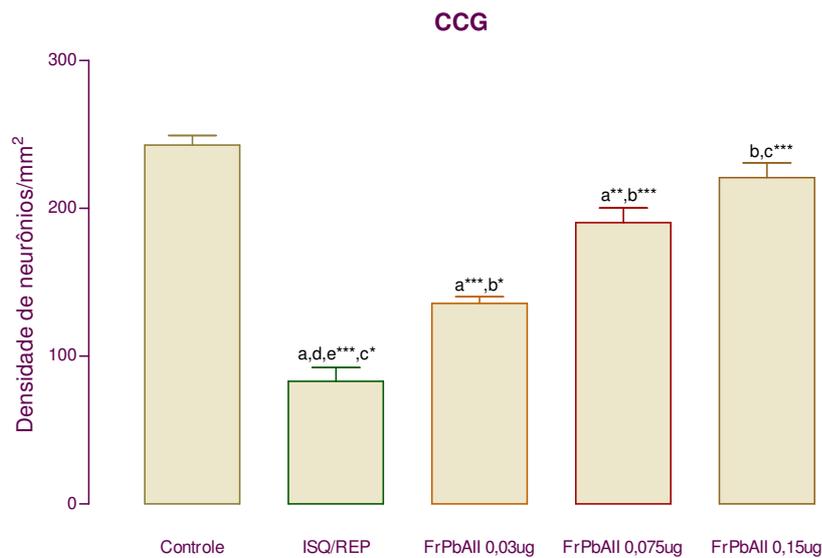


Figura 27: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle); tratados com salina e submetidos à isquemia (b- isquemia) e tratados com três doses de FrPbAII (0,03 – c; 0,075 e 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Associação da FrPbAII com antagonistas de receptores de GABA e glicina

Os dados obtidos após a análise dos olhos injetados com a FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em associação com antagonistas de receptores de GABA do tipo A, B e C, bem como o antagonista de receptores de glicina revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nas três camadas retinianas analisadas; CNE [F(7,119)= 65,57; $p < 0,0001$], na CNI [F(7,119)= 35,51; $p < 0,0001$] e na CCG [F(7,119)= 38,29; $p < 0,0001$].

Neste sentido, foi observado que o efeito neuroprotetor da FrPbAII na CNE foi totalmente revertido pelo bloqueio antagonistas dos receptores para GABA do tipo A, bicuculina e picrotoxina, bem como o antagonista de receptores para GABA do tipo C, imidazol

($p < 0,0001$). Além disso, a injeção de faclofen (antagonista $GABA_B$) e estriquinina (antagonista de glicina) em associação com a FrPbAII reduziu a densidade de neurônios sobreviventes à isquemia/reperfusão ($p < 0,05$). Por fim, foram registradas diferenças estatísticas entre as densidades neuroniais das retinas tratadas com associação FrPbAII+bicuculina quando comparadas às densidades resultantes das associações FrPbAII+estriquinina e FrPbAII+faclofen (figura 16).

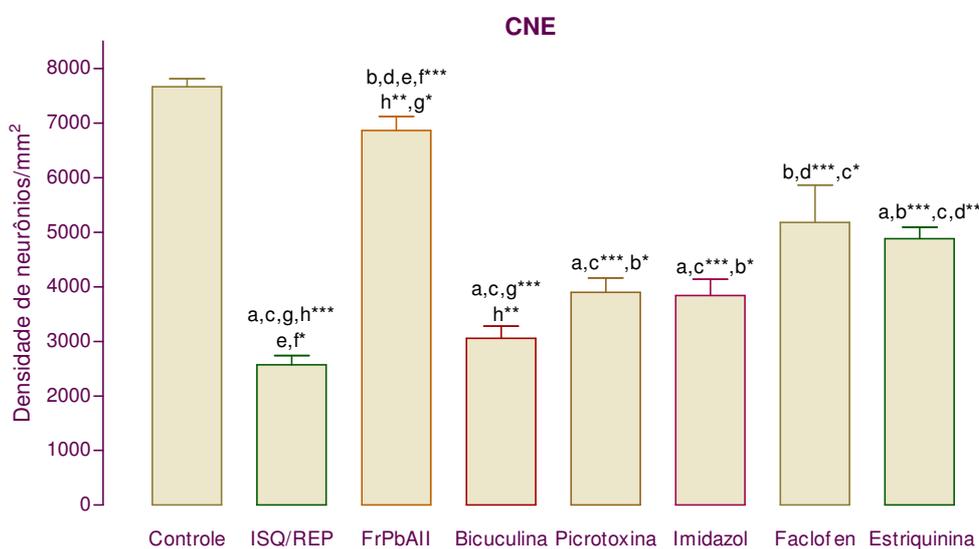


Figura 28: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Bicuculina (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); Picrotoxina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e); Imidazol (14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f), Faclofen (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - g) ou Estriquinina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com relação à CNI, foram observados resultados semelhantes aos obtidos na CNE. As retinas tratadas com as associações da FrPbAII com bicuculina, picrotoxina, imidazol apresentaram as menores densidades de neurônios, quando comparadas às retinas tratadas apenas com FrPbAII ou retinas não-isquêmicas ($p < 0,0001$). Além disso, foram registradas diferenças estatísticas entre as densidades neuroniais das retinas tratadas com a associação FrPbAII+faclofen em comparação às retinas tratadas com as associações FrPbAII+bicuculina; FrPbAII+picrotoxina; FrPbAII+imidazol e FrPbAII+estriquinina ($p < 0,05$) (figura 17).

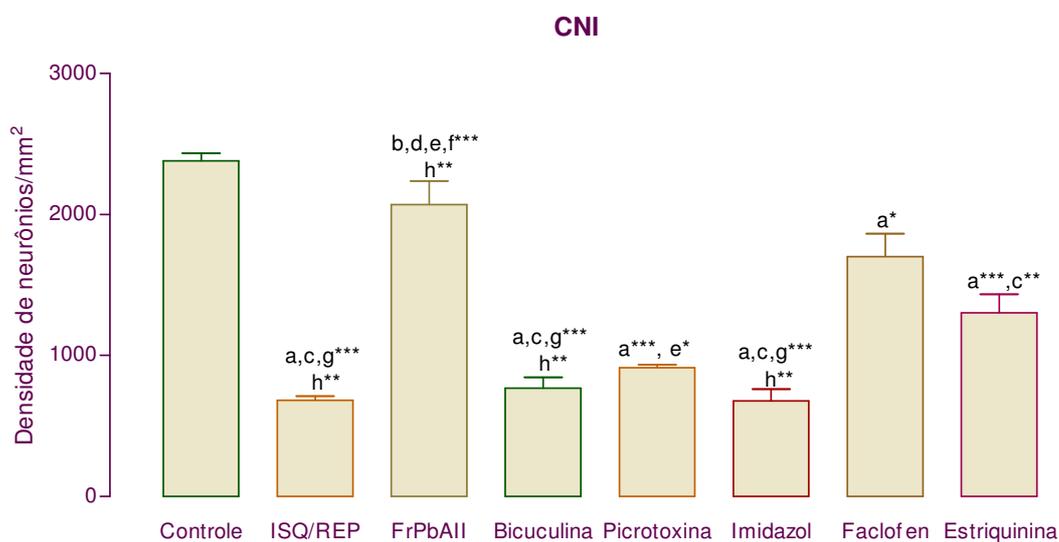


Figura 29: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com perfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b - isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Bicuculina (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); Picrotoxina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e); Imidazol (14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f), Faclofen (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - g) ou Estriquinina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os dados obtidos através da análise da densidade de neurônios da CCG demonstraram que a associação da FrPbAII com antagonistas de receptores GABA_A e glicina em retinas submetidas à isquemia/reperfusão apresentaram densidades de neurônios sobreviventes significativamente menores que retinas tratadas com FrPbAII ou retinas controle ($p < 0,001$). A associação FrPbAII+faclofen também reduziu o número de neurônios, mas neste caso, as densidades foram maiores do que nas associações supracitadas ($p < 0,05$). Além disso, foi verificada diferença estatística entre as densidades de neurônios de retinas tratadas com a associação FrPbAII+faclofen quando comparada às densidades de neurônios das retinas tratadas com a associação FrPbAII+imidazol (figura 18).

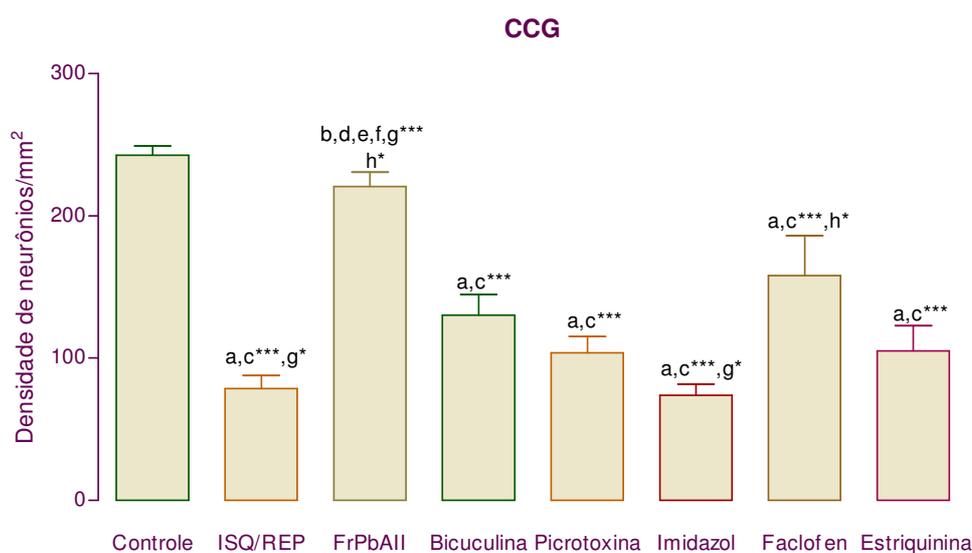


Figura 30: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Bicuculina (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); Picrotoxina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - e); Imidazol (14,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - f), Faclofen (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - g) ou Estriquinina (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - h). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Comparação do efeito neuroprotetor da FrPbAII com o de inibidores do transporte de GABA e glicina

Os dados obtidos após a análise das retinas injetadas com a FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em associação com os inibidores do transporte de GABA e glicina revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos nas camadas retinianas; CNE [F(5,89)= 87,96; $p<0,0001$], CNI [F(5,89)= 34,29; $p<0,0001$] e CCG [F(5,89)= 46,19; $p<0,0001$].

Nestes experimentos, a CNE das retinas pré-tratadas com a FrPbAII apresentaram maiores densidades de neurônios quando comparadas aos demais inibidores de transporte, exceto o ácido nipecótico ($p<0,01$). Ainda, as retinas pré-tratadas com ácido nipecótico, SNAP-5114 e ALX-540 apresentaram densidades neuroniais diferentes daquelas das retinas não-isquêmicas ($p<0,001$) e retinas isquêmicas sem pré-tratamento ($p<0,01$) (figura 19).

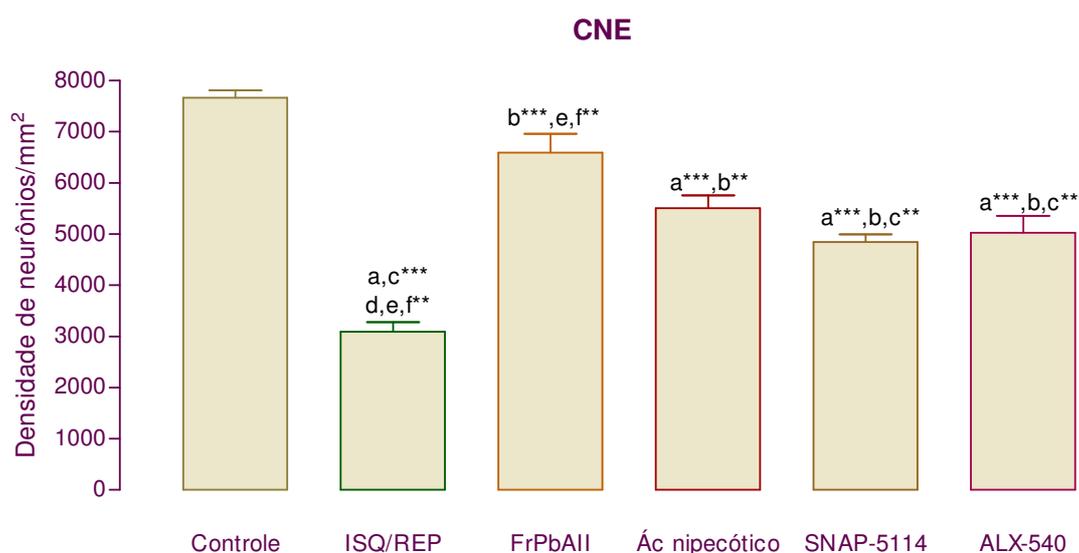


Figura 31: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com perfusão. Dados

obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -f). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A análise das densidades da camada CNI mostrou que nesta camada as retinas pré-tratadas com os inibidores; ácido nipecótico, SNAP-5114 e ALX-540 diferiram das densidades de retinas não-isquêmicas ($p < 0,001$). Na CNI, as retinas tratadas com FrPbAII também apresentaram maiores densidades de neurônios quando comparadas aos demais inibidores de transporte ($p < 0,05$). Além disso, foi verificado que apenas as densidades neuronais das retinas pré-tratadas com ácido nipecótico foram significativamente diferentes das retinas isquêmicas sem pré-tratamento ($p < 0,01$) (figura 20).

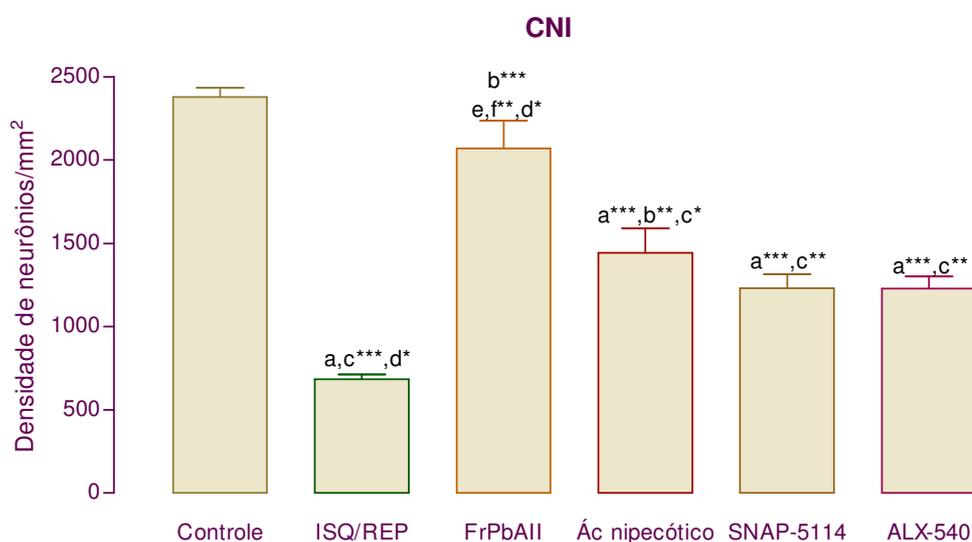


Figura 32: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com perfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b- isquemia); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -f). Foi utilizada ANOVA

de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As densidades das camadas CCG das retinas submetidas à isquemia seguida de reperfusão e pré-tratadas com FrPbAll ou ácido nipecótico apresentaram densidades de neurônios semelhantes às retinas não-isquêmicas. Quando foram comparadas as densidades das retinas sem pré-tratamento, verificou-se diferença estatística entre estas e as densidades de neurônios das retinas tratadas com todos os inibidores de transporte ($p < 0,01$). Além disso, as densidades neuroniais das retinas tratadas com FrPbAll foram maiores do que aquelas das retinas tratadas com SNAP-5114 e ALX-540 ($p < 0,05$). Finalmente, apesar das retinas pré-tratadas com estes últimos inibidores apresentarem densidades maiores que as retinas que sofreram isquemia/reperfusão sem pré-tratamento, as densidades de neurônios sobreviventes foi inferior as encontradas em retinas não-isquêmicas ($p < 0,01$) (figura 20).

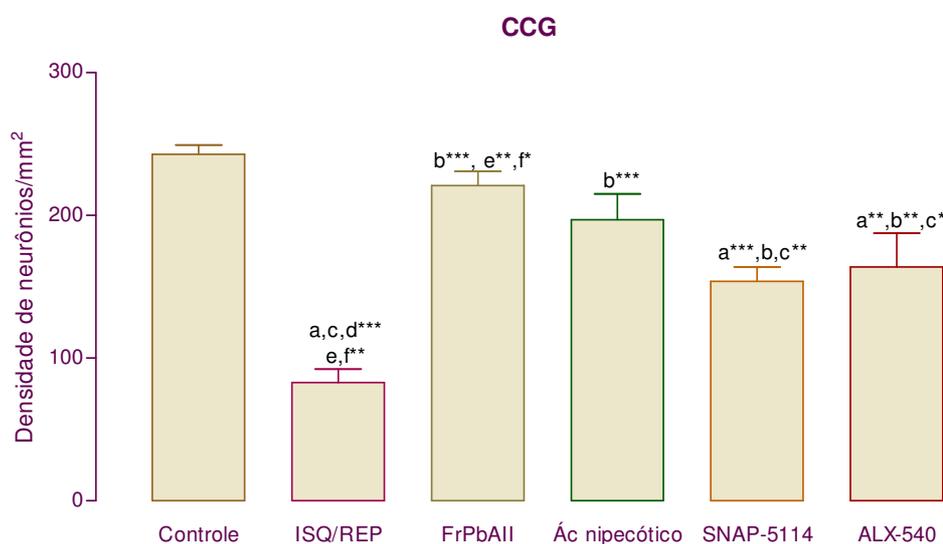


Figura 33: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais tratados com salina sem isquemia (a - controle) ou submetidos à isquemia após o tratamento com salina (b - isquemia); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - d); SNAP

5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e) e ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -f). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0.05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Associação da FrPbAll com inibidores de transporte

Os dados obtidos após a análise dos olhos injetados com a FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em associação com os inibidores do transporte de GABA e glicina revelou diferenças significativas entre os tratamentos nas camadas retinianas; CNE [F(4,74)= 9,059; $p = 0,0004$], na CNI [F(4,74)= 7,783; $p = 0,0005$] e na camada CCG [F(4,74)= 5,117; $p = 0,0042$].

Os dados obtidos através da análise da camada CNE apontaram diferenças estatísticas entre as densidades das retinas tratadas com a associação entre FrPbAll e o inibidor do transporte de glicina SNAP-5114, com relação às densidades de retinas tratadas com FrPbAll bem como a associação FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0,01$) (figura 22).

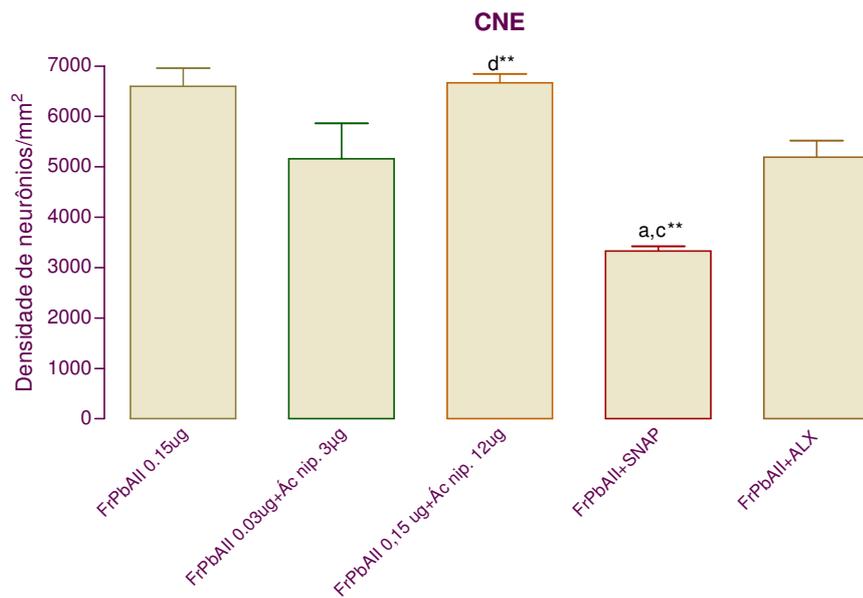


Figura 34: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada nuclear externa (CNE) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - a); FrPbAll (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - b); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); FrPbAll(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -d) e FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p<0,05$ (*).

Na camada CNI, a análise das densidades de neurônios sobreviventes apontou diferenças estatísticas entre as densidades das retinas tratadas apenas com a FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e aquelas tratadas com a associação entre FrPbAll com os demais inibidores do transporte de GABA e glicina, exceto o ácido nipecótico na dose de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p<0,05$) (figura 23).

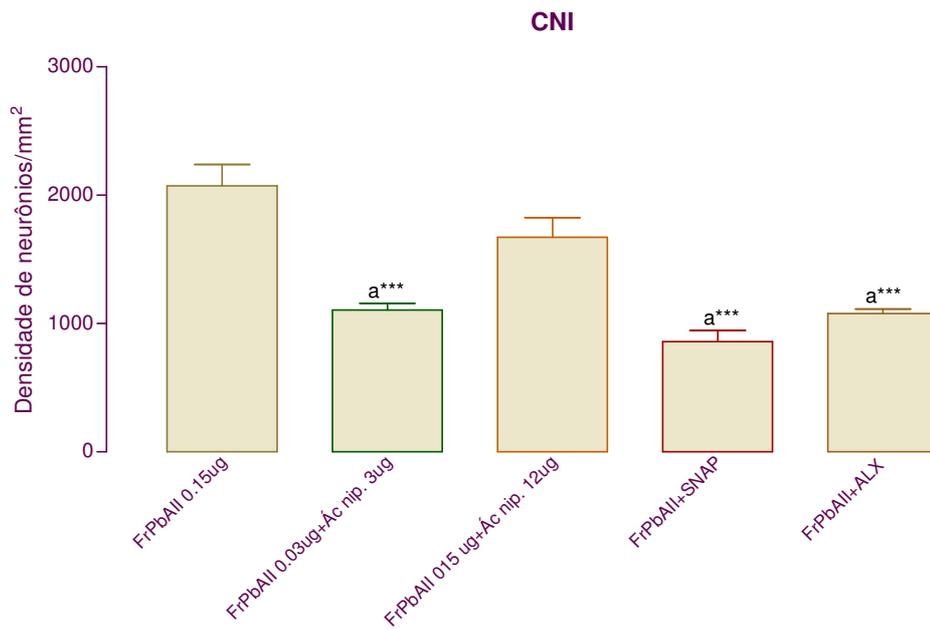


Figura 35: Gráfico representativo das densidades neuroniais médias (\pm EPM) na camada nuclear interna (CNI) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com perfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAll (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - a); FrPbAll (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - b); FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - c); FrPbAll(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -d) e FrPbAll (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -e). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ (*).

Por fim, na camada CCG foram observadas diferenças significativas entre as densidades das retinas que sofreram isquemia/reperfusão pré-tratadas com FrPbAll e a associação entre FrPbAll e ácido nipecótico na menor dose (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (figura 24).

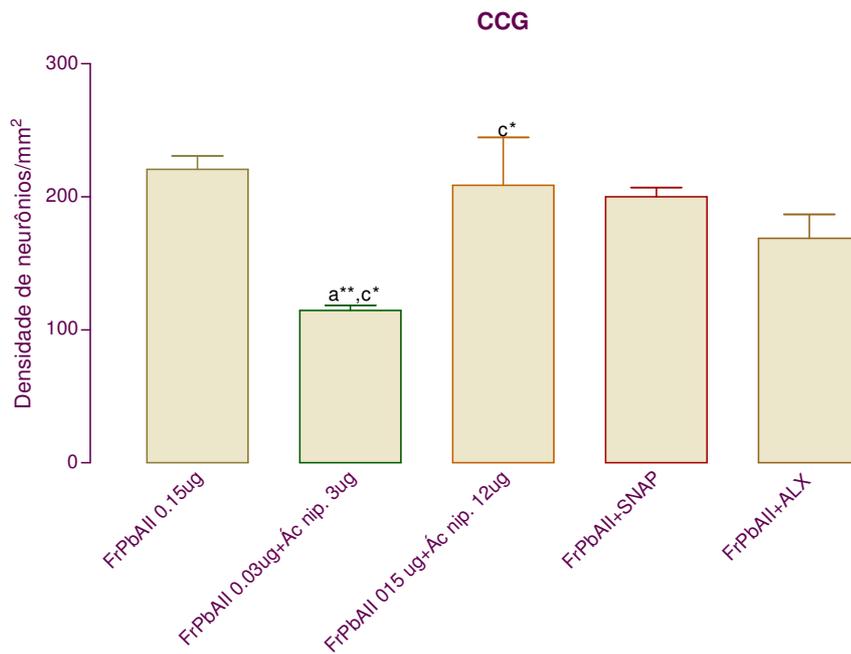
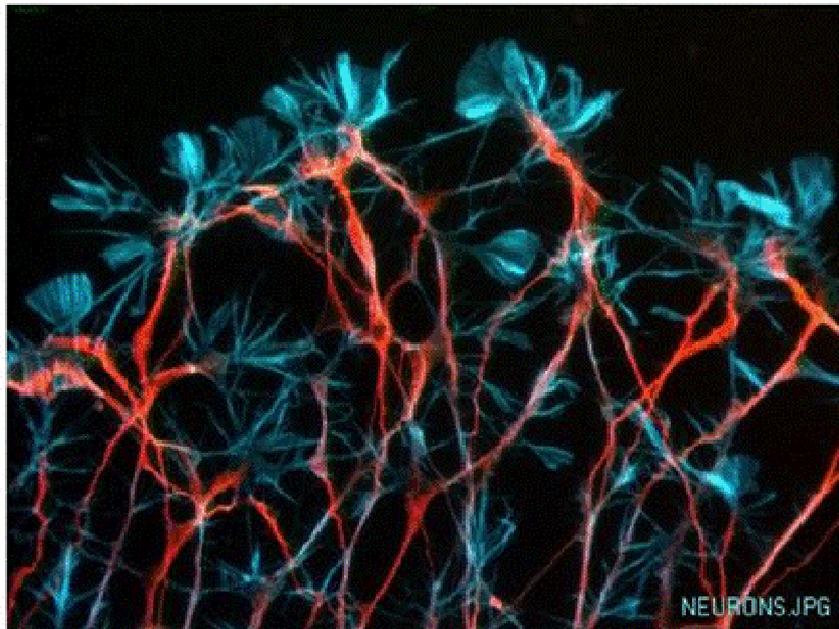


Figura 36: Gráfico representativo das densidades neuronais médias (\pm EPM) na camada de células ganglionares (CCG) de retinas submetidas à isquemia por 45 min com reperfusão. Dados obtidos de olhos de animais submetidos à isquemia após o tratamento com FrPbAII (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); FrPbAII (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +Ácido nipecótico (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); FrPbAII(0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ +SNAP 5114 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e FrPbAII (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)+ALX 540 (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Foi utilizada ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey, considerando-se $p<0,05$.



5-Discussão

5- DISCUSSÃO

O termo glaucoma não abrange um único mecanismo patológico, mas sim um grupo heterogêneo de doenças, as quais têm como característica comum uma neuropatia óptica associada a alterações do campo visual, associada a um aumento da PIO (Hayreh *et.al*, 2000; Guizzo *et.al*, 2005). Estimativas mostram que existe mais de 3 milhões de cegos por glaucoma em todo mundo, e mais de 100 milhões de indivíduos têm PIO elevada. Os gastos com a assistência aos pacientes cegos por glaucoma chega, em alguns países, a 1 bilhão de dólares anuais, sendo o custo de cada indivíduo aproximadamente US\$ 12 mil (Dantas, 1989, Yoles *et.al*, 1998). No Brasil, estudos revelam que o glaucoma está entre as principais causas de deficiência visual (Giampani, 2000).

Neste estudo foi utilizado um modelo experimental de aumento da pressão intra-ocular que mimetiza o glaucoma agudo de ângulo fechado, o qual envolve o processo isquêmico retiniano que ocorre durante a progressão da doença (Osborne *et al.*, 2004). Além de fornecer dados importantes sobre a isquemia retiniana, este modelo pode ser utilizado para identificar compostos que interferem em diferentes etapas das cascatas desencadeadas pela isquemia. Isto se deve ao fato de que os processos de neurodegeneração decorrentes de eventos isquêmicos no encéfalo e na retina são muito semelhantes (Louzada *et al.*, 1991).

A análise histopatológica das retinas submetidas tanto à isquemia quanto à isquemia seguida de reperfusão mostram características de morte celular por necrose, entre as quais vacuolização celular, núcleos picnóticos, edema e desorganização das camadas retinianas. Estas características foram relatadas por Louzada *et al.* (1991), os

quais atribuíram-nas ao aumento nos níveis de L-Glu que ocorre durante a isquemia. Este aumento pode levar à ativação de receptores NMDA em neurônios de terceira ordem (células amácrinas e ganglionares), que são excitáveis pelo L-Glu liberado de células bipolares, iniciando uma cascata de excitotoxicidade que culmina com a perda neuronal (Green *et al.*, 2000).

Este efeito lesivo do glutamato pode ser revertido pela potenciação da ação do GABA produzindo significantes efeitos neuroprotetores; hiperpolarizando neurônios reduzindo a liberação de NTs ou disparos de potenciais de ação. Estes efeitos podem ser produzidos utilizando-se agonistas de receptores de GABA, bem como drogas que inibem a recaptação do GABA, mantendo-o na fenda sináptica (Green *et al.*, 2000, Soudijn *et al.*, 2000, Schousboe *et al.*, 2004).

A localização dos receptores GABA_A e GABA_C nos neurônios da CNE foi confirmada em várias espécies por radioautografia e imuno-histoquímica. Os receptores GABA_C nesta camada são encontrados nos terminais dos axônios dos cones, e há evidências de que estes estão associados a proteínas microtubulares. Os receptores GABA_A são encontrados nos cones e também nos bastonetes. Dessa maneira, o GABA exerce nesta camada um potencial inibitório devido às correntes de Cl⁻ que são liberadas, assim este efeito inibitório pode ser bloqueado por antagonistas destes receptores como a bicuculina e o imidazol (Osborne *et al.*, 1999, Soudijn *et al.*, 2000, Yang, 2004).

As células bipolares recebem correntes GABAérgicas das células horizontais e medeiam estas correntes inibitórias para os neurônios gabaérgicos da CPE. O receptor GABA_A é encontrado nos axônios destas células, enquanto o receptor GABA_C é

encontrado nos dendritos destas células. Os efeitos do GABA nesta camada podem ser bloqueados pela bicuculina demonstrando assim o envolvimento dos receptores GABA_A. As células horizontais as quais também estão presentes nesta camada apresentam mecanismos dependentes de canais de Na⁺ e Ca⁺⁺ devido o envolvimento dos seus receptores GABA_A e GABA_C com estes canais. A presença do Ca⁺⁺ nesta camada causa uma hiperpolarização levando as células a um nível de voltagem de resposta máxima a luz. Por outro lado, as células amácrinas também presentes na CNI, expressam exclusivamente receptores GABA_A, os quais também são antagonizados pela bicuculina (Osborne *et al*, 2004, Yang, 2004). Na CCG também são expressos receptores GABA_A e GABA_C presentes em terminais de neurônios gabaérgicos os quais fazem sinapse com células da CPE e CPI (Osbrne *et al*, 2004, Yang, 2004).

Na década de 80 a primeira caracterização da recaptação do GABA no tecido cerebral sugeria a existência de duas vias distintas para o transporte. Porém na década de 90 a purificação, a análise da seqüência e a clonagem do transportador de GABA do subtipo 1 (GAT-1), nos mostrou que esse transportador pode ser o primeiro membro de uma família de transportadores os quais estão acoplados ao Na⁺/Cl⁻ (Dalby, 2000, Gadea e Lopes, 2001).

Os transportadores de GABA compõe um grupo de 4 transportadores diferentes. Inicialmente foi descoberto que o ácido nipecótico e a guvacina são inibidores do transporte de GABA contra efeitos mediados pelo pentilenotetrazol. Mais tarde, os inibidores tiagabina, NNC 05-0711, CI-966 e SKF 100330, foram descobertos e também se mostraram seletivos para os transportadores GAT-1. No entanto, uma variedade de drogas sem afinidade aparente com os transportadores de GABA parece

afetar o transporte de GABA através de mecanismos presentes na maquinaria do transporte de proteínas pela membrana plasmática. Além disso, liberação do GABA independente do Ca^+ pode ser bloqueada pela recaptação dos inibidores do GABA em células da retina, neurônios cerebrais e em células da glia do cerebelo. Assim é possível que exista um transporte reverso de GABA (causado pelo Na^+ sistólico), sugerindo então que este mecanismo seja uma fonte de GABA extracelular (Gadea e Lopes, 2001, Dalby, 2003).

Neste contexto, o laboratório de Neurobiologia e Peçonhas identificou e isolou o composto presente no FrPbAll veneno da aranha *Parawixia bistriata* o qual inibe a recaptação de GABA e glicina em sinaptossomas cérebro corticais de ratos. Resultados prévios demonstraram que a administração da FrPbAll no SNC (por via i.c.v.) inibe crises convulsivas desencadeada por vários convulsivantes químicos: bicuculina, picrotoxina, PTZ, ácido caínico e pilocarpina (Cairrão et al., 2002; Gelfuso et al., 2007). Além disso, a administração intra-nigral da FrPbAll inibe crises induzidas pela estimulação da Area Tempestas do córtex piriforme enquanto a administração intra-hipocampal exerce efeito ansiolítico (Liberato et al., 2006).

A ação neuroprotetora da FrPbAll já foi investigada em modelos de epilepsia secundariamente adquirida (dados não publicados) e no próprio modelo da isquemia retiniana (Beleboni et al., 2006). Neste último trabalho a FrPbAll administrada por via endovenosa protegeu duas das três camadas retinianas estudadas. No presente trabalho, a injeção intra-vítreo da FrPbAll protegeu as três camadas retinianas de modo dependente de dose.

De acordo com Beleboni e colaboradores (2006) o mecanismo primário de ação da FrPbAll parece ser o bloqueio do transporte de GABA e glicina, os quais ocorrem na mesma ordem de potência. Deste modo, neste trabalho foi investigado se em um modelo *in vivo* a ação da FrPbAll poderia ser mais atribuída ao bloqueio do transporte de GABA ou ao bloqueio do transporte de glicina. No caso do transporte de GABA, os experimentos realizados com ratos *in vivo* sugerem haver uma preferência pelo transportador de GABA do tipo GAT1, não obstante em alguns aspectos a FrPbAll atuar como um inibidor inespecífico dos transportadores de GABA (Liberato *et al.*, 2006).

Os ensaios com antagonistas de receptores para GABA do tipo A, B e C mostraram redução e até mesmo reversão do efeito neuroprotetor da FrPbAll injetada em associação com estes antagonistas nas três camadas da retina analisadas, tanto após isquemia quanto após isquemia com reperfusão. Nos dois experimentos, as menores densidades de neurônios foram encontradas em retinas pré-tratadas com FrPbAll associada ao antagonista de GABA_C imidazol. No entanto, não foram relatadas diferenças entre as densidades de retinas tratadas com FrPbAll associada aos outros antagonistas gabaérgicos e ao antagonista glicinérgico utilizado, corroborando os dados obtidos nos experimentos de neuroquímica. As baixas densidades neuronais encontradas em secções histológicas de retinas pré-tratadas com a associação FrPbAll+imidazol pode ser atribuída à regulação da atividade dos receptores de GABA_C pelo transportador de GABA, GAT1 (Hull *et al.*, 2006). Em um estudo realizado utilizando retinas de salamandra, foi demonstrado que a inibição dos transportadores GAT1 inibe a ativação de receptores GABA_C (Ichinose and Lukasiewicz, 2002). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que a inibição de GAT1 pelo inibidor específico

NO-711 inibiu a ativação de GABA_C, mas não alterou a atividade de GABA_A (Hull *et al.*, 2006). Estes dados corroboram com a hipótese de que a ação da FrPbAll sobre o transporte de GABA não é seletiva para GAT1, mas pode ser que ocorra uma preferência por este tipo de transportador, justificando, inclusive a diferença de ação entre este composto e o ácido nipecótico também verificada em alguns experimentos deste trabalho e dos trabalhos prévio com modelos de indução de crise.

A comparação do efeito da FrPbAll com os demais inibidores de transporte mostrou que as densidades de neurônios em retinas tratadas com a FrPbAll foi semelhantes às aquelas encontradas para os demais tratamentos em todas as camadas após a isquemia. No entanto, nos experimentos onde houve reperfusão das retinas, as densidades de neurônios das retinas pré-tratadas com FrPbAll foi significativamente maior que às aquelas atribuídas aos demais inibidores na camada CNI, enquanto nas camadas CNE e CCG, foi verificada diferença entre a FrPbAll e os pré-tratamentos com o inibidor inespecífico do transporte de GABA SNAP-5114, bem como o inibidor de GLYT 1 ALX-5407.

De acordo com Clausen *et al.* (2006), a associação do inibidor seletivo de GAT1 de alta potência, tiagabina, com inibidor inespecífico de ambos GAT1 e GAT2, EF1502, resultou em efeito anticonvulsivante sinérgico. Segundo estes autores, este sinergismo foi associado ao bloqueio de GAT2, ao invés de dupla ação sobre os transportadores do tipo GAT1. Segundo White e colaboradores (2002), drogas que inibem transportadores de GABA astrocíticos (GAT2, 3) são mais potentes que inibidores de transportadores neurônios GABAérgicos (GAT1), (Gadea & Lopez-Colomé, 2001). Uma vez que o ácido nipecótico atua especificamente sobre o subtipo GAT1 é plausível inferir que esta

droga seja menos potente do que um inibidor não seletivo neste modelo (Schousboe *et al.*, 2004). De acordo com Honda e colaboradores (1995) os transportadores GAT-1 são expressos na retina nas células amácrinas e nos processos celulares da CPI. Já os transportadores GAT-3 são expressos apenas nas células de Muller. O bloqueio destes últimos foi previamente associado a um efeito neuroprotetor durante eventos patológicos (Gadea e Lopes, 2001).

A diferença de atividade entre a FrPbAll e o ácido nipecótico já foi demonstrada previamente. Liberato e colaboradores (2006) mostraram que a injeção intra-nigral da FrPbAll previne crises desencadeadas pela estimulação da Area tempestas, enquanto ácido nipecótico é ineficiente neste modelo. Interessantemente, o GAT 1 é pouco expresso no mesencéfalo de ratos adultos, onde se localiza a substância negra. Isto nos levaria a pensar que a FrPbAll estaria atuando em outros subtipos de transportadores de GABA. Desta forma, a associação do composto FrPbAll e ácido nipecótico deveria produzir uma ação sinérgica neuroprotetora sobre os neurônios das retinas isquêmicas, como descrito para associação de inibidores de GAT 1 e 2.

Outro importante ponto é a ação da FrPbAll sobre os transportadores de glicina, a qual não pode ser descartada. Neste sentido, a glicina é um importante neurotransmissor inibitório do SNC, e exerce sua ação como um ligante nos canais de Cl⁻ os quais são ativados pela glicina e competitivamente antagonizados pela estriquinina. Além disso, a glicina também participa da neurotransmissão excitatória atuando como um co-agonista do L-Glu nos receptores NMDA, os quais são insensíveis à estriquinina (Betz *et al* 1993; Gadea e Lopes-Colomé, 2001b). Segundo Pow e Hendrickson (2000) o transportador de glicina do tipo 1 (GLYT1) é expresso em células

amácricas da retina de mamíferos. No entanto, a regulação extracelular de glicina através dos seus transportadores precisa ser mais bem estabelecida (Gadea e Lopes, 2001b).

Os experimentos utilizando associações do composto FrPbAll com os inibidores de transporte ácido nipecótico, SNAP 5114 e ALX-5407 demonstraram que, com exceção da CCG após isquemia, as menores densidades de células foram observadas nas retinas dos animais tratados com a FrPbAll associada ao SNAP 5114, para as três camadas após a isquemia ou isquemia seguida de reperfusão. Além disso, a análise das camadas das retinas que foram tratadas com a associação FrPbAll (0,14 nmol) + ácido nipecótico (46,5 nmol), mostrou que estas apresentam os mesmos danos isquêmicos observados nos grupos sem pré-tratamento. Isto pôde ser observado tanto nas retinas que sofreram isquemia, quanto nas retinas dos animais submetidos à isquemia com reperfusão, nas três camadas. Este resultado pode indicar que não há potenciação dos efeitos dos dois compostos.

Vários estudos têm analisado os efeitos neuroprotetores da aplicação de novas substâncias ou associações entre substâncias existentes sobre processos de lesão do tecido nervoso. Os compostos utilizados na maior parte destes estudos não passam à fases de teste clínico e não chegam a ser utilizados como terapia para um grande número de doenças neurodegenerativas. As estratégias terapêuticas investigadas incluem inibição de receptores excitatórios, agonismo de receptores inibitórios, inibição do transporte de neurotransmissores inibitórios e aumento do transporte de neurotransmissores excitatórios. Neste contexto, o laboratório de Neurobiologia e Peçonhas identificou e isolou três compostos que atuam no transporte de

neurotransmissores; a parawixina 1 (Fontana *et al.*, 2003; 2007), a FrPbAll (Beleboni *et al.*, 2006) e a PbTx 10 (dados não publicados). A parawixina 1 e a PbTx10 aumentam a captação de L-Glutamato, enquanto a FrPbAll atua sobre ambos GABA e glicina. Estes são apenas três exemplos do potencial terapêutico dos compostos presentes em venenos de artrópodos, os quais permanecem em sua maioria ainda inexplorados.

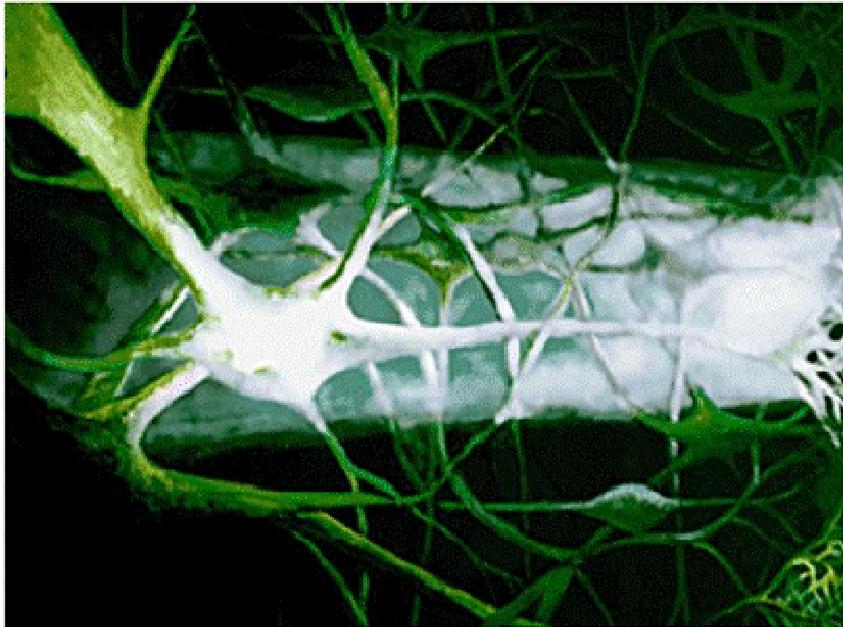


6-Conclusões

6-Conclusões

Tendo em vista os dados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- A FrPbAll possui uma potente ação neuroprotetora contra os danos neuronais induzidos pela isquemia retiniana seguida ou não por reperfusão.
- A ação da FrPbAll aparentemente é atribuída ao aumento sinérgico das neurotransmissões inibitórias GABAérgica e glicinérgica, uma vez que o uso de antagonistas de GABA e glicina em associação com este composto reverte a sua ação neuroprotetora.
- A FrPbAll, em dose sub-efetiva, não potencializa a ação da dose sub-efetiva do inibidor seletivo de GAT1, ácido nipecótico.
- A FrPbAll parece ter atividade neuroprotetora superior à do inibidor do transportador GAT1 (ácido nipecótico); à do inibidor não-seletivo dos transportadores GAT2 e 3 (SNAP-5114) e à do inibidor do transportador GLYT1.
- A administração combinada da FrPbAll com os inibidores supracitados não gerou um efeito sinérgico em nenhum dos casos, sendo observada após a isquemia seguida de reperfusão, uma drástica diminuição da atividade neuroprotetora da FrPbAll co-administrada com o inibidor do transportador de glicina GLYT1.
- A FrPbAll tem um mecanismo de ação único e pode ser considerada como ponto de partida para síntese de compostos neuroprotetores e anticonvulsivantes à serem utilizados para ambos; ciência básica e terapia clínica.



7-Referências Bibliográficas

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K.E., LAU, J., LUNDT, B.F., PETERSEN, H., HUNSFELDT, P.O., SUZDAK, P.D., SWEDBERG, M.D.B. Synthesis of novel GABA uptake inhibitors. Part 6: Preparation and evaluation of of N- Ω asymmetrically substituted nipecotic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 9: 2773-2785, 2001.
- BELEBONI, R.O., PIZZO, A.B., FONTANA, A.C.K., CAROLINO, R.O.G., COUTINHO-NETTO, J., SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. Review. *Eur. J. Pharmacol.* 493: 1-17, 2004a.
- BELEBONI RO, CAROLINO ROG, PIZZO AB, BALDAN LC, COUTINHO-NETTO J, SANTOS WF, COIMBRA NC. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. Review, *Cell.and Mol. Neurobiol.* 24,707-728, 2004b.
- BELEBONI RO. Caracterização bioquímica e mecanismo de ação de frações cromatográficas purificadas da peçonha da aranha social *Parawixia bistriata*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2004c.
- BELEBONI RO, GUIZZO R, FONTANA ACK, PIZZO AB, CAROLINO ROG, GOBBO-NETO L, LOPES NP, COUTINHO-NETTO J, SANTOS WF. Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. *Mol Pharmacol.* 69, 1998-2006, 2006.
- BETZ H, LANGOSCH D, RUNDSTRÖM N, BORMANN J, KURYATOV A, KUHSE J, SCHMIEDEN V, MATZENBACH B, KIRSCH J. Structure and biology of inhibitory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 707, 109-115, 1993.

BEZZI P, CARMIGNOTO G, PASTI L, VESCE S, ROSSI D, RIZZINI BL, POZZAN T, VOLTERA A. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*. 391, 281-285, 1998.

BONNE C, MULLER A, VILLAIN M. Free radicals in retinal ischemia. *Gen. Pharmacol.* 30, 275-280, 1998.

CAIRRÃO MAR, RIBEIRO AM, PIZZO AB, FONTANA ACK, BELEBONI RO, COUTINHO-NETTO J, MIRANDA A, SANTOS WF. *Parawixia bistrata* and *Scaptocosa raptoria* venoms: inhibition of GABA uptake and convulsant effect. *Pharm. Biol.* 40, 472-477, 2002.

CAIRRÃO MAR, GUIZZO R, GOBBO-NETO L, WARD RJ, LOPES NP, SANTOS WF. The biological activity in mammals and insects of the nucleosidic fraction from the spider *Parawixia bistrata*. *Toxicon*. 43, 375-383, 2004.

CAPRIOLI J, KITANO S, MORGAN JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2376-2381, 1996.

CLAUSEN RP, FRØLUND B, LARSSON OM, SCHOUSBOE A, KROGSGAARD-LARSEN P, WHITE HS. A novel selective gamma-aminobutyric acid transport inhibitor demonstrates a functional role for GABA transporter subtype GAT2/BGT-1 in the CNS. *Neurochem Int.* 48, 637-642, 2006.

COHEM, AI. Retina y nervio optico. In: Robert Moses. "Fisiología del ojo", aplicación clínica. Ed Panamericana, Viaminte, Buenos Aires, p. 2165, 1980.

COLLINGRIDGE GL, LESTER RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 41, 143-210, 1989.

DALBY NO. Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 479 (1-3):127-137, 2003.

- DANBOLT NC. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. 65, 1-105, 2001.
- DANTAS AM. Doenças da retina. Biblioteca Brasileira de oftalmologia. pp. 1-41, 1989.
- DANTON GH, DIETRICH WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 127-136, 2003.
- FLETCHER EL, KALLONIATIS M. Localisation of amino acid neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. J. Comp. Neurol. 380, 449-471, 1997.
- FONTANA ACK, CAIRRAO MAR, COLUSSO AJ, SANTOS WF, COUTINHO-NETTO J. Paralyzing activity of the *Parawixia bistriata* crude venom in termites: a new bioassay. Toxicon. 38, 133-138, 2000.
- FONTANA ACK, GUIZZO R, BELEBONI RO, MEIRELLES e SILVA AR, COIMBRA NC, AMARA SG, SANTOS WF, COUTINHO-NETTO J. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. Br. J. Pharmacol. 139, 1297-1309, 2003.
- GADEA A, LÓPEZ-COLOMÉ AM. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. J Neurosci Res. 63, 453-460, 2001.
- GADEA A, LÓPEZ-COLOMÉ AM. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. J Neurosci Res. 63, 461-468, 2001.
- GADEA A, LÓPEZ-COLOMÉ AM. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. J Neurosci Res. 64, 218-222, 2001.
- GELFUSO EA, CUNHA AOS, MORTARI MR, LIBERATO JL, PARAVENTI KH, BELEBONI RO, COUTINHO-NETTO J, LOPES NP, SANTOS WF. Neuropharmacological profile of FrPbAII, purified from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneae, Araneidae), in Wistar rats. Life Scienc. 80, 566-572, 2007.

GIAMPANI SR JR, BORGES AS, VESSANI RM, JORDAO ML. A double-masked, randomized clinical trial comparing latanoprost with unoprostone in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Ophthalmology*. 108, 259-63, 2001.

GLEITZ J, TOSCH C, BEILE A, PETERS T. The protective action of tetrodotoxin and (+/-) kavain on anaerobic glycolysis, ATP content and intracellular Na⁺⁺ and Ca⁺⁺ of anoxic brain vesicles. *Neuropharmacology*. 35, 1743-1752, 1996.

GOTO W, OTA T, MORIKAWA N, OTORI Y, HARA H, KAWAZU K, MIYAWAKI N, TANO Y. Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Res*. 958, 10-19, 2002.

GREEN AR, HAINSWORTH AH, JACKSON DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology* 39, 1483-1494, 2000.

GRUNERT U. Distribution of GABA and glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina. *Microsc. Res. Tech*. 50, 130-140, 2000.

GUIZZO R, CAIRRÃO MAR, COUTINHO-NETTO J, SILVA ARM, COIMBRA NC, SANTOS WF. Neuroprotection in Acute Ischemia and Ischemia/Reperfusion in Rat Retina. *Int. J Pharmacol*. 4, 369-375, 2005.

HALONEN T, NISSINEN J, JANSEN JA, PITKANEN A. Tiagabine prevents seizures, neuronal damage and memory impairment in experimental status epilepticus. *Eur. J Pharmacol*. 299, 69-81, 1996.

HARDING JJ. *Biochemistry of the Eye*. Chapman & Hall Medical, London. 1997.

HAYREH SS, JONAS JB. Optic disk and retinal nerve fiber layer damage after transient central retinal artery occlusion: an experimental study in rhesus monkeys. *Am. J. Ophthalmol*. 129, 786-795, 2000.

HAYREH SS, WEINGEIST TA. Experimental occlusion of the central artery of the retina IV: retinal tolerance time to acute ischaemia. Br.J. Ophthalmol. 64, 818-825, 1980.

HIROI K, YAMAMOTO F, HONDA Y. Intraretinal study of cat electroretinogram during retinal ischemia-reperfusion with extracellular K⁺ concentration microelectrodes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35, 656-663, 1994.

HONDA S, YAMAMOTO M, NAOAKI S. Immunocytochemical localization of three subtypes of GABA transporter in rat retina. Mol Brain Res., 33, 319-325, 1995.

HUGHES WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. Exp. Eye Res., 53, 573-582, 1991.

INOUE ME, SOGO S, MIZOTA A, TANIAI M, TAKENAKA H, MANO T. Effect of MCI-9402, a 5 HT₂ receptor antagonist, on retinal ganglion cell death and retinal ischemia. Exp. Eye Res., 76, 445-452, 2003.

IVERSEN LL, STÖCKEL K, THOENEN H. Autoradiographic studies of the retrograde axonal transport of nerve growth factor in mouse sympathetic neurons. Brain Res., 25, 88, 37-43, 1975.

JACKSONN N, PARKS TN. Anticonvulsant action of an arylamine-containing fraction from *agelenopsis* spider venom. Brain Res. 526, 338-341, 1990.

JOHNSON J, CHEN TK, RICKMAN DW, EVANS C, BRECHA NC. Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. J. Comp. Neurol. 375, 212-224, 1996.

KALLONIATIS M. Amino acids in neurotransmission and disease. J. Am. Optom. Assoc. 66, 750-757, 1995.

LANTOS J, TEMES G, KELEMEN D, SAROSI I, TOROK B Jr. Influence of protective drugs on the elevation of extracellular potassium ion concentration in the brain during ischaemia. *Acta Physiol. Hung.* 76(1), 49-59, 1990.

LARSEN AK, OSBORNE NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2603-2611, 1996.

LEE JM, ZIPFEL GJ, PARK KH, HE YY, HSU CY, CHOI DW. Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience.* 115, 871-878, 2002.

LEVI HW. Spiders of the orb-weaver genus *Parawixia* in America (Aranea:Araneidae). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 153: 1-46, 1992.

LIBERATO JL, CUNHA AOS, MORTARI MR, GELFUSO EA, BELEBONI RO, COUTINHO-NETTO J, SANTOS WF. Anticonvulsant and anxiolytic activity of FrPbAII, a novel GABA uptake inhibitor isolated from the venom of the social spider *Parawixia bistriata* (Araneidae: Araneae). *Brain Res.* 1124, 19-27, 2006.

LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568, 1999.

LIPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330, 613-622, 1994.

LOUZADA-Jr P, DIAS JJ, SANTOS WF, LACHAT JJ, BRADFORD HF, COUTINHO-NETTO J. Glutamate release in experimental ischemia of the retina. An approach using microdialysis. *J. Neurochem.* 59, 358-363, 1992.

MARMOR MF, DALAL R. Irregular retinal and RPE damage after pressure-induced ischemia in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 2570-2575, 1993.

MARTINOUC JC, DUBOIS-DAUPHIN M, STAPLE JK, RODRIGUEZ I, FRANKOWSKI H, MISSOTTEN M, ALBERTINI P, TALABOT D, CATSICAS S, PIETRA C. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13, 1017-1030, 1994.

MOHAND-SAID S, WEBER M, HICKS D, DREYFUS H, SAHEL JA. Intravitreal injection of ganglioside GM1 after ischemia reduces retinal damage in rats. *Stroke* 28, 617- 621, 1997.

MONAGHAN, DT, BRIDGES, RJ, COTMAN, CW. – The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 365-402, 1989

NAKANISHI, N. Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron.* 13, 1031-1037, 1994.

NEDERGAARD M, HANSEN AJ. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 568-574, 1993.

NISHIZAWA Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 69, 369-381, 2001.

OSBORNE NN, LARSEN AK. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem. Int.* 29, 263-270, 1996.

OSBORNE NN, UGARTE M, CHAO M, CHIDLOW G, BAE JH, WOOD JPM, NASH MS. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43, S102-S128, 1999.

OSBORNE NN, CASSON RJ, WOOD JPM, CHIDLOW G, GRAHAM M, MELENA J. Retinal ischaemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Ret. and Eye Res.* 23, 91-147, 2004.

PAN Y, KHALILI P, RIPPS H, QIAN H. Pharmacology of GABA_c receptors: responses to agonists and antagonists distinguish A- and B-subtypes of homomeric rho receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* 376, 60-65, 2005.

POW DV, BARNETT NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci. Lett.* 280, 21-24, 2000.

POW DV, HENDRICKSON AE. Expression of glycine and the glycine transporter Glyt-1 in the developing rat retina. *Vis Neurosci.* 17, 1-9, 2000.

RASH LD, HODGSON WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225-254, 2002.

RAUEN T, ROTHSTEIN JD, WASSLE H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in rat retina. *Cell Tissue Res.* 286, 325-336, 1996.

ROMANO C, PRICE MT, ALMLI T, OLNEY JW. Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 416-423, 1998.

ROSSI DJ, OSHIMA T, ATTWELL D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-321, 2000.

ROTH S, LI B, ROSENBAUM PS, GUPTA H, GOLDSTEIN IM, MAXWELL KM, GIDDAY JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 777-785, 1998.

SAFA R, OSBORNE NN. Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res.* 862, 36-42, 2000.

SAPOLSKY RM. Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem.* 76, 1601-1611, 2001.

SATTLER R, TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death *Mol Neurobiol.* 24, 107-129, 2001.

SCHNIDT-KASTNER R, EYSEL UT. Ischemic damage visualized in flat mounts of rat retina after photochemically induced thrombosis. *Brain Res. Bull.* 34, 487-491, 1994.

SCHOUSBOE A, SARUP A, LARSSON OM, WHITE SH. GABA transporters as drug targets for modulation of GABAergic activity. *Bio. Pharm.* 68, 1557-1563, 2004.

SELLES-NAVARRO I, VILLEGAS-PEREZ M, SALVADOR-SILVA M, RUIZ-GOMEZ J, VIDAL-SANZ M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2002-2014, 1996.

SHEPHERD, GM, - In: SHEPHERD, GM. Eds. *The synaptics organization of the brain.* Oxford University Press. 145-178, 1974.

SHIMIZU H, GRAHAM SH, CHANG LH, MINTOROVITCH J, JAMES TL, FADEN AI, WEINSTEIN PR. Relationship between extracellular neurotransmitter amino acids and energy metabolism during cerebral ischemia in rats monitored by microdialysis and vivo magnetic resonance spectroscopy. *Brain Res.* 605, 33-42, 1993.

SIDHU HS, WOOD JD. Three uptake systems in synaptosomes for nipecotic acid and beta-alanine. *Neuropharmacology.* 25, 555-8, 1986.

SILVIOTTI L, AND NISTRÌ, A. GABA receptor mechanism in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36, 35-92, 1991.

SOUDIJN W, AND WIJNGAARDEN I VAN. The GABA transporter and its inhibitors. *Cur. Med. Chem.* 7, 1063-1079, 2000.

STAUB F, MACKERT B, KEMPSKI O, PETERS J, BAETHMANN A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol. Sci.* 119, 79-84, 1993.

STEVENS WD, FORTIN T, PAPPAS BA. Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure. *Stroke* 33, 1107-1112, 2002.

SUGIYAMA K, GU ZB, KAWASE C, YAMAMOTO T, KITAZAWA Y. Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 3084-3090, 1999.

THORESON WB, WITKOVSKY P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 765-810, 1999.

TSUJIKAWA A, OGURA Y, HIROSHIBA N, MIYAMOTO K, KIRYU J, TOJO SJ, MIYASAKA M, HONDA Y. Retinal ischemia-reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1183-1190, 1999.

UEDA Y, WILLMORE LJ. Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by valproic acid in rat hippocampus during epileptogenesis. *Exp Brain Res.* 33, 334-339, 2000.

VAEGAN MILLAR TJ. Effect of kainic acid and NMDA on the pattern electroretinogram, the scotopic threshold response, the oscillatory potentials and the electroretinogram in the urethane anaesthetized cat. *Vision Res.* 34, 1111-1125, 1994.

VOGT K, MELLOR J, TONG G, NICOLL R. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26, 187-196, 2000.

WAHL F, OBRENOVITCH TP, HARDY AM, PLOTKINE M, BOULU R, SYMON L. Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *J. Neurochem.* 63, 1003-1011, 1994.

WANG C, NGUYEN HN, MAGUIRE JL, PERRY DC. Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 206-214, 2002a.

WENZEL HJ, COLE TB, BORN DE, SCHWARTZKROIN PA, PALMITER RD. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 12676-12681, 1997.

WINKLER BS, POURCHO RG, STARNES C, SLOCUM J, SLOCUM N. Metabolic mapping in mammalian retina: a biochemical and 3H-2-deoxyglucose autoradiographic study. *Exp. Eye Res.* 77, 327-337, 2003.

WOOD JPM, SCHMIDT KG, MELENA J, CHIDLOW G, OSBORNE NN. The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp. Eye Res.* 76, 505-516, 2003.

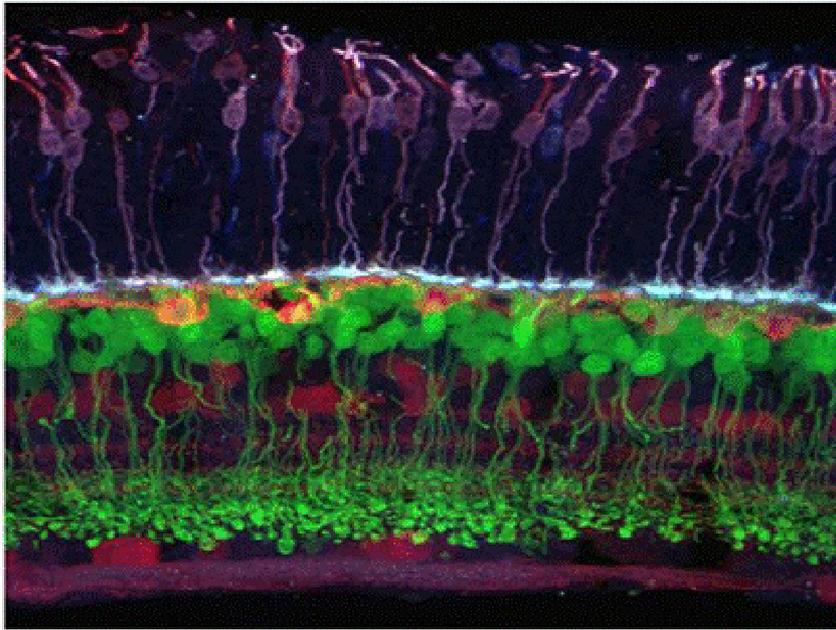
XIONG-LI YANG. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog. Neurobiol.* 73, 127-150, 2004.

XIONG-LI YANG AND WU SM. Effects of GABA on horizontal cells in the tiger salamander retina. *Vis Res.* 33, 1339-1344, 1993.

YOLE S, SCHWARTZ M. Potential. Neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Surv. Ophthalmol.* 42, 367-372, 1998.

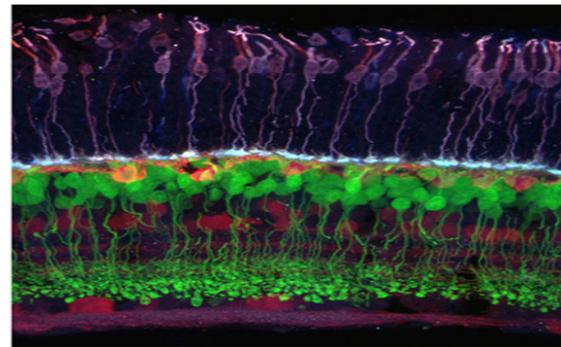
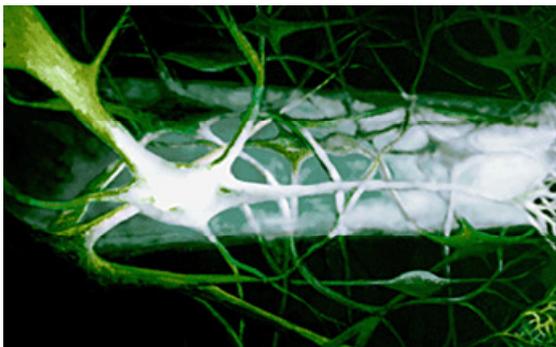
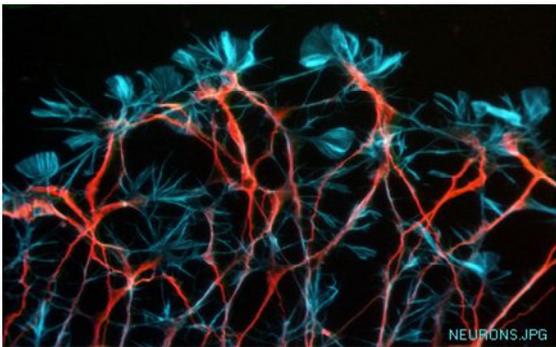
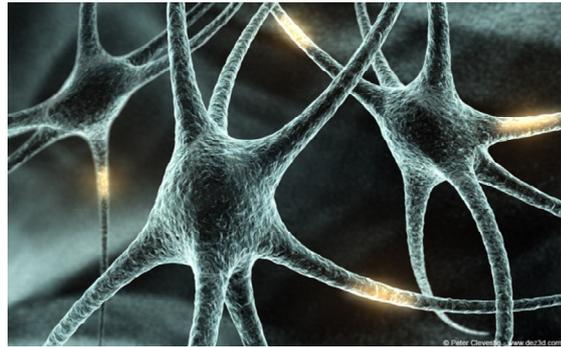
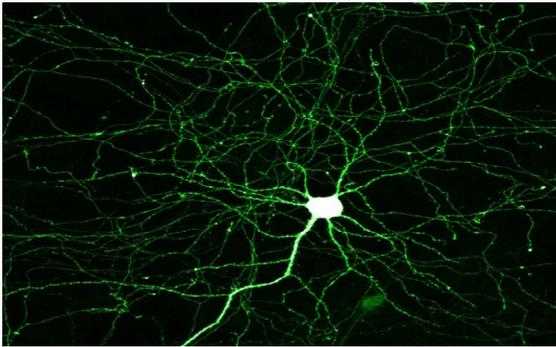
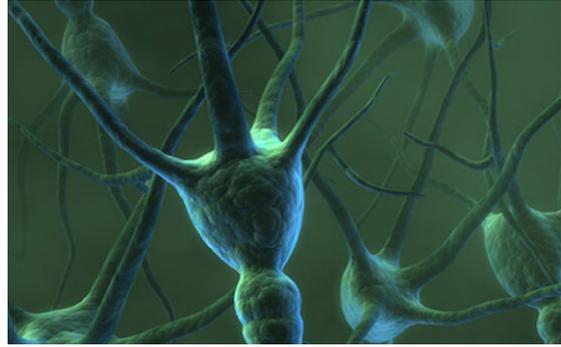
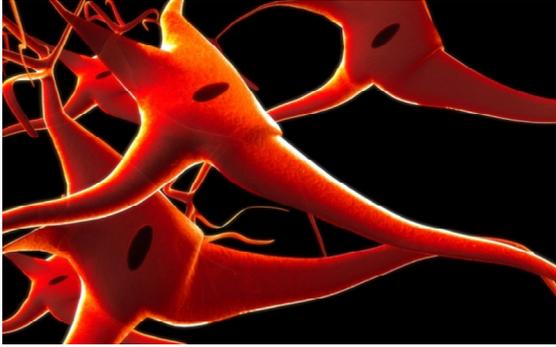
ZHU Y, OHLEMILLER KK, McMAHAN BK, GIDDAY JM. Mouse models of retinal ischemic tolerance. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1903-1911, 2002.

ZINI S, ROISIN MP, ARMENGAUD C, BEN ARI Y. Effect of potassium channel modulators on the release of glutamate induced by ischaemic-like conditions in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 153, 202-205, 1993.



Anexos

Anexo 1



Todas as figuras e microfotografias foram copiadas do site:

<http://images.google.com.br/images?um=1&hl=pt-BR&q=neurons&btnG=>

Acessado em 19/08/2008

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)