

Giselle Foureaux Heida

**Efeitos da Ativação da Enzima Conversora de
Angiotensina 2 Endógena no Glaucoma Experimental
em Ratos**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2013

Giselle Foureaux Heida

**Efeitos da Ativação da Enzima Conversora de
Angiotensina 2 Endógena no Glaucoma Experimental
em Ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Junho/2013

Essa tese foi realizada no Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do professor Dr. Anderson José Ferreira e co-orientação do professor Dr. José Carlos Nogueira, e contou com a colaboração do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, do Laboratório de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG e do Centro de Microscopia da UFMG. Este trabalho recebeu auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento da Pessoa de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*A verdadeira viagem de descobrimento nem sempre
consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos*

(Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson José Ferreira, pela confiança, empenho, amizade, pelo modelo de comprometimento e dedicação para com os alunos e para com a pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Carlos Nogueira, muito obrigada pela atenção, dedicação, carinho e amizade. Sua alegria é contagiante.

Aos meus pais, José Maria Ribeiro de Faria e Lucy Alves Foureaux de Faria; minhas irmãs, Renata Foureaux de Faria e Viviane Foureaux de Faria Khaddour; meu cunhado Fernando Khaddour e à linda sobrinha, Beatriz Foureaux Khaddour por estarem sempre ao meu lado e por entenderem a minha ausência, em vários momentos.

Ao meu esposo Renato Atalla Heida, pelo amor, companheirismo, carinho, dedicação, atenção, amizade, apoio, paciência e por me fazer sorrir, sempre!

Ao seu lado, tudo foi mais fácil!

Aos colaboradores deste trabalho: Bárbara Nogueira, Gustavo Fulgêncio, André Faraco, Juçara Ribeiro, Valbert Nascimento, Simone Odília, Gustavo Menezes e Mohan Raizada, muito obrigada pela contribuição que

proporcionaram ao trabalho e à minha formação. Vocês foram imprescindíveis!

Aos professores que integraram meu comitê de avaliação, principalmente à profa. Vanessa Pinho, por acompanhar meu trabalho de perto durante esses anos, contribuindo e somando.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Cardíaca: Bárbara, Danielle, Patrícia, Vanessa, Tatiane, Marilda, Fernanda, Marcos, Juliane, Paulo, Heder, Graziela, Letícia, Gonzaga e Larissa, pela amizade e agradável convivência.

A todos os colegas e professores do curso de pós-graduação em Biologia Celular, pelo carinho e amizade. À profa. Gleide Avelar, pelo empréstimo de um reagente, muito obrigada pela prontidão em me ajudar.

Aos funcionários e professores do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, principalmente às profas. Janice Henriques, Camila Megale e Karin Bottger, pela amizade.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento da Pessoa de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo. À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Glaucoma	17
1.2 Retina	21
1.3 Apoptose das células ganglionares	24
1.4 Tratamentos atuais disponíveis para o glaucoma	28
1.5 Modelos de roedores para o estudo do glaucoma	30
1.6 Mensuração da PIO	33
1.7 Sistema renina-angiotensina	33
1.8 Sistema renina-angiotensina ocular	38
1.9 O ativador da ECA2 – Aceturato de Diminazeno (DIZE)	43
1.10 Sistemas de liberação controlada de drogas	44
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Animais	53
4.2 Tonometria	53
4.3 Mensuração da pressão arterial sistêmica	54
4.4 Indução do glaucoma	54
4.5 Protocolos experimentais	55
4.6 Microscopia de luz	59
4.7 Imunohistoquímica	60
4.8 Imunofluorescência	61
4.9 Microscopia eletrônica de transmissão	61
4.10 Cintilografia	63
4.11 Desenvolvimento dos <i>inserts</i> poliméricos de quitosana	63
4.11.1 <i>Preparo dos inserts placebo de quitosana</i>	64
4.11.2 <i>Preparo dos inserts de quitosana carreando DIZE</i>	64
4.12 Caracterização dos <i>inserts</i> poliméricos de quitosana	64
4.12.1 <i>Porcentagem de hidratação</i>	65

4.12.2 Espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (ATR-FTIR)	66
4.12.3 Análise térmica	66
4.12.4 Teor de fármaco no dispositivo	67
4.12.5 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	68
4.13 Análise estatística	68

5. RESULTADOS **71**

5.1 Identificação das camadas da retina	71
5.2 Mensuração da PIO basal	71
5.3 Expressão da ECA2 na retina	72
5.4 Efeitos da administração sistêmica do DIZE na prevenção da elevação da PIO	74
5.5 Efeitos da administração tópica do DIZE na prevenção da elevação da PIO	75
5.6 Efeitos da administração tópica do DIZE no tratamento do glaucoma	77
5.7 Papel do Mas no efeito hipotensor ocular do DIZE	78
5.8 Efeitos da administração tópica do DIZE na neuroproteção	79
5.9 Efeitos do DIZE vs. Dorzolamida sobre a PIO	87
5.10 Efeitos do tratamento tópico com o DIZE na drenagem do humor aquoso	88
5.11 Porcentagem de hidratação dos <i>inserts</i>	91
5.12 Análise ATR-FTIR	91
5.13 Análise térmica	93
5.14 Teor de fármaco no dispositivo	97
5.15 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	97
5.16 Efeitos do <i>insert</i> contendo DIZE na PIO e nas CGs	98

6. DISCUSSÃO **104**

7. CONCLUSÃO **113**

8. REFERÊNCIAS **115**

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética **129**

ANEXO 2 – Artigo aceito para publicação **130**

LISTA DE ABREVIações

A-779: antagonista do receptor Mas

Ad libitum: à vontade

Ang I: angiotensina I

Ang II: angiotensina 2 (1-8)

Ang III: angiotensina III (2-8)

Ang IV: angiotensina IV (3-8)

Ang-(1-7): Angiotensina 1-7

ARB: antagonista do receptor AT1

AT1: receptor AT1 da Ang II

AT2: receptor AT2 da Ang II

ATR-FTIR: espectrometria de absorção na região do infravermelho

BSA: *bovine serum albumin*, soro bovino

CG: célula ganglionar

CNT: grupo de animais controle não tratado

CT: grupo de animais controle tratado

DI: *inserts* contendo aceturato de diminazeno (DIZE)

DIZE: aceturato de diminazeno

DOR: dorzolamida

DSC: calorimetria exploratória diferencial

DTA: análise térmica diferencial

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA2: enzima conversora de angiotensina 2

EPM: erro padrão da média

GNT: grupo glaucoma não tratado

GPAA: glaucoma primário de ângulo aberto

GPAF: glaucoma primário de ângulo fechado

GT: grupo glaucoma tratado

HA: ácido hialurônico

HE: coloração com hematoxilina e eosina

Inserts: dispositivo ocular não implantável (colocado no fórnice conjuntival do olho)

MAS: receptor (proteína G) da Angiotensina 1-7

NF-kB: fator nuclear Kappa B

NO: óxido nítrico

PAM: pressão arterial média

PBS: *phosphate buffered saline*, tampão fosfato salino

PI: placebo *inserts*

PIO: pressão intra-ocular

PRR: receptor de pró-renina

OD: olho direito

RECEPTOR MAS: receptor (proteína G) da Angiotensina 1-7

SRA: sistema renina-angiotensina

SPP635: inibidor de renina

TG: termogravimetria

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: (A) Desenho esquemático da histologia do processo ciliar. (B) Desenho esquemático de corte meridional da região do limbo.....	17
Fig. 2: O esquema da rede trabecular.	18
Fig. 3: Representação da obstrução da passagem do humor aquoso pela pupila no glaucoma de ângulo fechado (a) e do aumento da quantidade de humor aquoso no glaucoma de ângulo aberto (b)	19
Fig. 4: Esquema dos diferentes tipos neuronais da retina de mamíferos.....	20
Fig. 5. (A) Fotomicrografia da parede ocular humana.....	21
Fig. 6: Representação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.....	25
Fig. 7: Visão atual do sistema renina-angiotensina.	34
Fig. 8: Efeitos dos peptídeos efetores do SRA mediados por seus respectivos receptores.	35
Fig. 9: Dispositivo ocular colocado no fórnice conjuntival humano, imediatamente após (A) e após 8 horas (B), já hidratado.....	43
Fig. 10: Representação esquemática dos procedimentos experimentais.....	56
Fig. 11: Fotomicrografia da retina de rato Wistar normal.....	69
Fig. 12: Acompanhamento da PIO em ratos Wistar normais para determinação dos valores basais.....	70
Fig. 13: (A) Fotomicrografias representativas de retinas mostrando o aumento da expressão da ECA2 detectada pela imunohistoquímica. (B)Quantificação da expressão da ECA2 no olho.....	71
Fig. 14: PIO durante a administração sistêmica (via gavagem) do DIZE.....	72

Fig. 15: PAM durante a administração sistêmica (via gavagem) do DIZE.....	73
Fig. 16: PIO durante a administração tópica (via instilação) do DIZE.....	74
Fig. 17: PAM durante o período de administração tópica (via instilação) do DIZE....	74
Fig. 18: PIO durante o tratamento tópico (via instilação) do DIZE.....	75
Fig. 19: PAM durante o tratamento tópico (via instilação) do DIZE.....	76
Fig. 20: PIO durante o tratamento tópico (via instilação) com o DIZE de ratos tratados com o antagonista do Mas A-779.....	77
Fig. 21: Fotomicrografias representativas do disco do nervo óptico.....	78
Fig. 22: Fotomicrografias representativas de secções ligeiramente oblíquas do nervo óptico dos 4 grupos experimentais.	78
Fig. 23: A) Fotomicrografias representativas de retina de ratos Wistar coradas em HE. B) quantificação das CGs da retina.	79
Fig. 24: Micrografia eletrônica da camada das fibras neurais da retina de rato Wistar.	80
Fig.25: PIO durante 4 semanas de indução do glaucoma seguidas de 2 semanas adicionais.....	81
Fig. 26: Contagem das CGs durante 4 semanas de indução do glaucoma seguidas de 2 semanas adicionais.....	82
Fig. 27: Imunofluorescência da retina de rato Wistar mostrando a expressão da caspase-3 nas GCs.	83
Fig. 27: Imunofluorescência da retina de rato Wistar mostrando a expressão da caspase-3 nas GCs nas 4 semanas de indução seguida de duas semanas adicionais.....	84
Figura 29: PIO durante o tratamento com DIZE ou Dorzolamida.....	85

Fig. 30: <i>Imagens cintilográficas representativas da drenagem do humor aquoso nas 3 primeiras horas após a injeção do pertecnetato de sódio na câmara anterior de rato Wistar</i>	86
Fig. 31: <i>Drenagem do humor aquoso determinada pela injeção do pertecnetato de sódio na câmara anterior</i>	87
Fig. 32: <i>O aparecimento do tecnécio na tireóide</i>	88
Fig. 33: <i>O aparecimento do tecnécio no estômago</i>	88
Fig. 34: <i>Índice de hidratação dos inserts placebo e carreando DIZE</i>	89
Fig. 35: <i>Espectro de FTIR-ATR do DIZE (a), dos inserts placebo (b) e dos inserts carreando DIZE (c)</i>	90
Fig. 36: <i>Curvas DSC do DIZE, do insert placebo e do insert carreando DIZE em 1ª (a) e 2ª (b) corridas</i>	92
Fig. 37: <i>Curvas de DTG, DTA e TG dos inserts placebo (PI)</i>	93
Fig. 38: <i>Curvas de DTG, DTA e TG do DIZE</i>	94
Fig. 39: <i>Curvas de DTG, DTA e TG dos inserts contendo DIZE (DI)</i>	94
Fig. 40: <i>Perfil de liberação in vitro do DIZE</i>	95
Fig. 41: <i>Efeitos dos inserts sobre a PIO</i>	97
Fig. 42: <i>Efeitos dos inserts sobre a PAM</i>	97
Fig. 43: <i>Análise histológica das CGs</i>	99
Fig. 44: <i>Fotomicrografias representativas da escavação do nervo óptico</i>	100

RESUMO

O glaucoma é uma doença neurodegenerativa, geralmente acompanhada de elevação da pressão intra-ocular (PIO), que se caracteriza pela morte progressiva de células ganglionares (CGs) e degeneração do nervo óptico. Vários estudos têm demonstrado a participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) no glaucoma. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena, utilizando o composto aceturato de diminazeno (DIZE), no glaucoma experimental em ratos Wistar. O glaucoma unilateral foi induzido em ratos (180-220g) através da injeção de 30 μ L (10mg/mL) de ácido hialurônico na câmara anterior do olho, 1 vez por semana, durante 4, 5 ou 6 semanas. DIZE (1mg/kg) foi administrado diariamente por via sistêmica ou tópica e a PIO foi medida semanalmente utilizando um tonômetro de aplanção. A pressão arterial média (PAM) também foi mensurada semanalmente através da pletismografia de cauda. Para avaliar o papel do receptor Mas nos efeitos do DIZE, o antagonista da Ang-(1-7) A-779 foi administrado através de minibombas osmóticas. Ao final do tratamento, o radioisótopo ^{99m}Tc (tecnécio) foi injetado na câmara anterior para avaliar a drenagem do humor aquoso a cada 30 minutos durante 3h. A análise da expressão da ECA2 e das CGs foram realizadas em secções histológicas dos olhos. A ultraestrutura da camada das fibras nervosas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, foram desenvolvidos dispositivos de liberação controlada, através de *inserts* de quitosana contendo DIZE, que foram colocados no fórnice conjuntival dos animais. Os resultados mostraram que a administração sistêmica e tópica do DIZE aumentou a expressão da ECA2 na retina. Em relação à PIO, animais com glaucoma que não receberam o tratamento com o DIZE (grupo GNT) apresentaram valores significativamente maiores (27,1 \pm 1,9 mmHg) quando comparado com ratos normais (9,0 \pm 2,7 mmHg). Tanto a administração sistêmica quanto a tópica normalizou a PIO (instilação: 9,6 \pm 1,1 mmHg) sem mudanças significativas na PAM. Estes efeitos foram completamente bloqueadas pelo A-779. A análise histológica revelou que a redução no número de CGs e apoptose observadas no grupo GNT (540,9 \pm 9,3 células) foi prevenida pela ativação da ECA2 (629,0 \pm 8,8 células). Além de promover neuroproteção, o DIZE também foi capaz de facilitar a drenagem do humor aquoso. Os dispositivos de liberação controlada foram bem tolerados pelos animais e foram eficientes em reduzir a PIO por 30 dias com uma dose similar àquela usada em um único dia no tratamento tópico. Assim, nossos resultados indicam a importância patofisiológica do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas do SRA ocular de ratos e, mais importante, indicam que a ativação da ECA2 endógena é uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento do glaucoma.

Palavras-chave: Angiotensina(1-7), Receptor Mas, Sistema Renina-Angiotensina, Ativação da ECA2, Caspase-3, Ratos Wistar

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of the activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) using the compound diminazene aceturate (DIZE) in an experimental model of glaucoma in Wistar rats. DIZE (1mg/kg) was administered daily either systemically or topically, and the intraocular pressure (IOP) was measured weekly. To examine the role of the Mas receptor in the effects of DIZE, the Ang-(1-7) antagonist A-779 was co-administered. Drainage of the aqueous humor was evaluated by using scintigraphy. The analysis of ACE2 expression by immunohistochemistry and the counting of retinal ganglion cells (RGCs) were performed in histological sections. Additionally, the nerve fiber structure was evaluated by transmission electron microscopy. In addition, chitosan films containing DIZE were developed for controlled release of the compound and placed in the conjunctival fornix of the animals. The systemic and topical administration (in the form of eye drops) of DIZE increased the ACE2 expression in the eyes and significantly decreased the IOP of glaucomatous rats without changing the blood pressure. Importantly, this IOP-lowering action of DIZE was similar to the effects of dorzolamide. The antiglaucomatous effects of DIZE were blocked by A-779. Histological analysis revealed that the reduction in the number of RGCs and the increase in the expression of caspase-3 in the RGC layer in glaucomatous animals were prevented by DIZE. This compound also prevented alterations in the cytoplasm of axons in glaucomatous rats. In addition to these possible neuroprotective effects, DIZE facilitated the drainage of the aqueous humor. Chitosan films containing DIZE were well tolerated by the animals and were effective in reducing IOP for 30 days utilizing the amount of the compound used in a single dose of the topical treatment. Our results evidence the pathophysiological relevance of the ocular ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system and, importantly, indicate that the activation of intrinsic ACE2 is a potential therapeutic strategy to treat glaucoma.

Keywords: Angiotensin-(1-7), Mas receptor, Renin-angiotensin system, ACE2 activation, Caspase-3, Wistar rats

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Glaucoma

O glaucoma é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza pela morte por apoptose das células ganglionares da retina e degeneração cavernosa do nervo óptico (Park et al., 2003; Johnson e Tomarev, 2010). Estima-se que mais de 67 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas pela doença, que já é a terceira maior causa de perda parcial de visão e a segunda maior causa de cegueira (Costa et al., 2003; Resnikoff et al., 2004; Quigley e Broman, 2006). Em 2002, a doença foi responsável por 12,3% dos casos de perda de visão no mundo (Resnikoff et al., 2004) e há estimativa que o número de pessoas com glaucoma no mundo alcançará 79,6 milhões em 2020 (Quigley e Broman, 2006). No Brasil, o Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimou, em 2003, a existência de 900 mil pessoas com a doença, sendo que, 720 mil são assintomáticas e metade não diagnosticadas (Cronemberger et al., 2009).

Embora vários fatores de risco estejam associados ao desenvolvimento do glaucoma, tais como: idade, etnia, miopia, história familiar, espessura da área central da córnea, hipertensão arterial, diabetes e apnéia noturna (Bonomi et al., 2000; Pang e Clark, 2007), a pressão intra-ocular (PIO) elevada é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento e progressão da doença (Costa et al., 2003).

Sabe-se que alterações transitórias fisiológicas na PIO ocorrem diariamente, como, por exemplo, durante o uso de uma gravata apertada, na manobra de Valssalva, pressão nas pálpebras, tensão sobre os músculos extrínsecos do olho, hipertensão arterial e gravidade (Toris, 2008). No entanto, quando a PIO desvia-se de uma estreita faixa normal por um certo período de tempo, danos irreversíveis podem ocorrer na retina e nervo óptico, resultando em perda permanente da visão (Toris, 2008). Logo, a saúde do olho e a função visual normal requerem um controle preciso da PIO. A PIO é mantida por um balanço entre produção e drenagem do humor aquoso. No olho humano, a taxa de formação deste fluido é de 2,5-2,8 $\mu\text{L}/\text{min}$ e este volume é totalmente substituído a cada 100 minutos (Vaajanen e Vapaatalo, 2011). O humor aquoso é produzido principalmente pelas células epiteliais não-pigmentadas dos processos ciliares (**Fig. 1A**) sob a região do limbo (**Fig. 1B**) na câmara posterior (Gabelt et al., 2006). A formação do humor aquoso, envolve três processos: difusão a partir do sangue, ultrafiltração e secreção (transporte ativo), sendo que essa formação é fundamentalmente dependente do transporte ativo, que requer energia fornecida pela hidrólise de ATP da Na^+/K^+ ATPase (Calixto e Cronenberger, 2008; Vaajanen e Vapaatalo, 2011). Já a drenagem do humor aquoso, consiste, principalmente, em sistema de escoamento formado pelas vias convencional e não convencional (ou uveoescleral). Aproximadamente 10% do humor aquoso são drenados pela via não convencional (uveoescleral), isto é, através do músculo ciliar, espaço supra-corióide e esclera (**Fig. 1B**). Os outros 90% são drenados pela rede trabecular, que é constituída pelas redes uveal, corneoescleral e tecido justacanalicular (**Fig. 2**). Em seguida, o humor aquoso atravessa o endotélio do

canal de Schlemm, o canal coletor, o plexo escleral profundo, as veias aquosas, veias episclerais e veias da conjuntiva (Avtar e Srivastava, 2007; Toris, 2008).

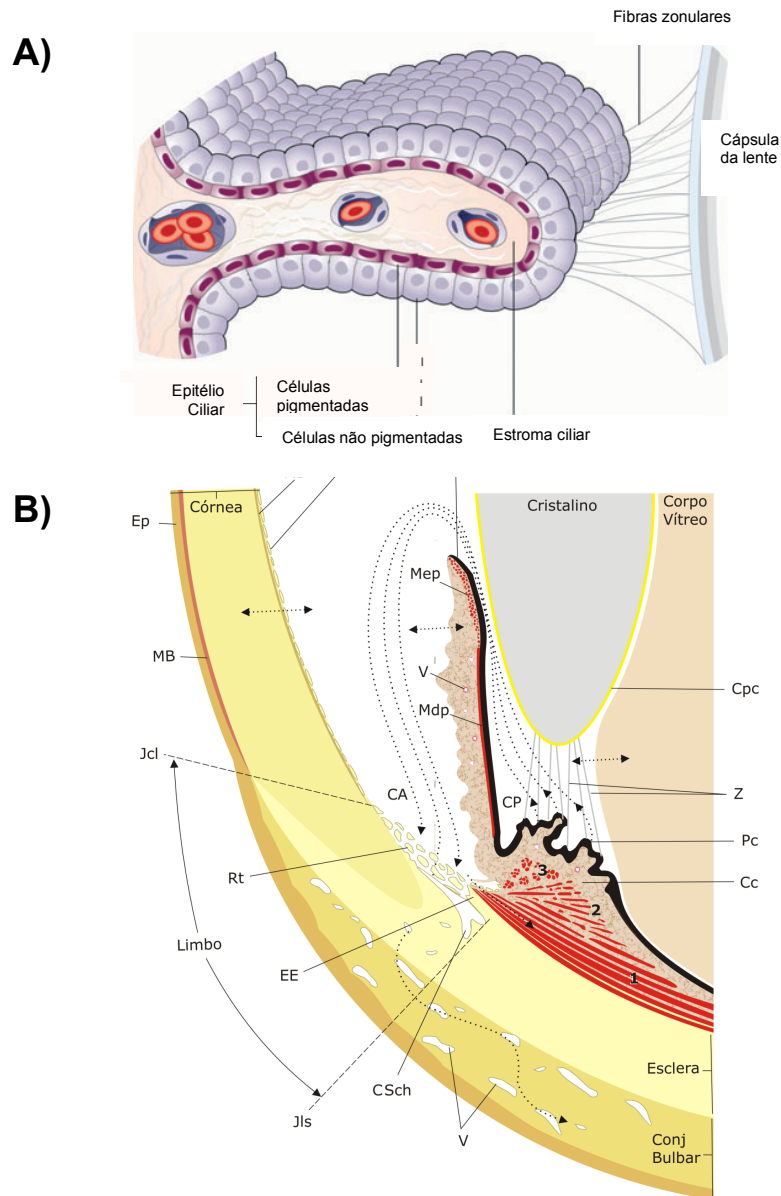


Fig. 1: (A) Desenho esquemático da histologia do processo ciliar. O humor aquoso é produzido pelas células epiteliais não-pigmentadas dos processos ciliares (Vaajanen e Vapaatalo, 2011). (B) Desenho esquemático de corte meridional da região do limbo e suas relações topográficas com outras estruturas oculares. As setas pontilhadas mostram o sítio de produção do humor aquoso (Pc - Processos ciliares) e seu trajeto da câmara posterior (CP) para a câmara anterior (CA), até penetrar no sistema de drenagem: Rt (Rede trabecular); CSch (Canal de Schlemm) e vasos (V) episclerais e da conjuntiva. Ep - Epitélio corneal; MB - Membrana de Bowman; MD - Membrana de Descemet; En - Endotélio; Jcl - Junção córneo-limbo; EE - Esporão escleral; Jls - Junção limbo-escleral; Mep - Músculo esfíncter da pupila; Mdp - Músculo dilatador da pupila; Cpc - Cápsula do cristalino; Z - Zônula; Cc - Corpo ciliar; 1 - Fibras longitudinais do músculo ciliar; 2 - Fibras radiais do músculo ciliar e 3 - fibras circulares do músculo ciliar. (Ferreira-Filho e Nogueira, 2008).

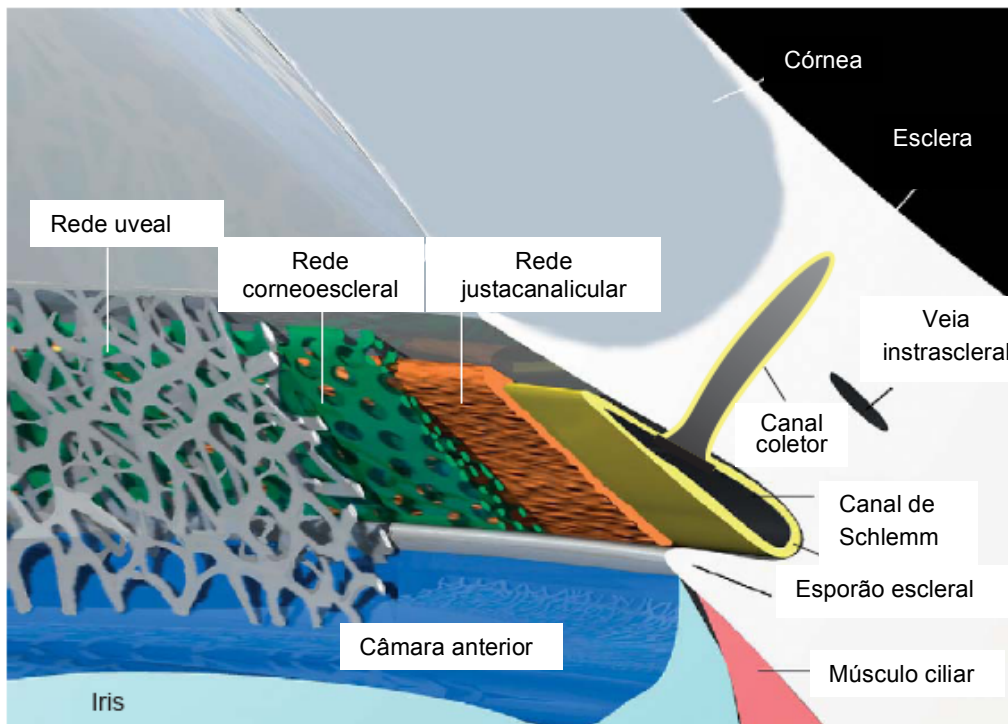


Fig. 2: O esquema mostra a rede trabecular e seus componentes: redes uveal, corneoescleral e justacanalicular. O humor aquoso após atravessá-las se direciona para o canal de Schlemm (seio venoso escleral), canal coletor, veias aquosas, plexo profundo e plexo superficial, e alcança a circulação sistêmica, através das veias episclerais (Toris, 2008).

Existem dois tipos principais de desenvolvimento do glaucoma: um denominado glaucoma primário de ângulo fechado (GPAF) e outro denominado glaucoma primário de ângulo aberto (GPAA). No primeiro (**Fig. 3**), há redução no ângulo da câmara anterior do olho gerando obstrução à passagem do humor aquoso da câmara posterior para a anterior através da pupila, geralmente devido a uma dilatação da íris. Com isto, a íris é “deslocada” estreitando o ângulo da câmara anterior (entre a córnea e o corpo ciliar) (Lewis, 2002). Já o GPAA, responsável por mais de 75% dos casos de cegueira (Navajas et al., 2005; Mckinnon et al., 2008), ocorre devido a um aumento da resistência na drenagem do humor aquoso pela rede trabecular (**Fig. 3**), culminando em elevação da PIO

que, por sua vez, desencadeará a morte das células ganglionares e degeneração do nervo óptico.

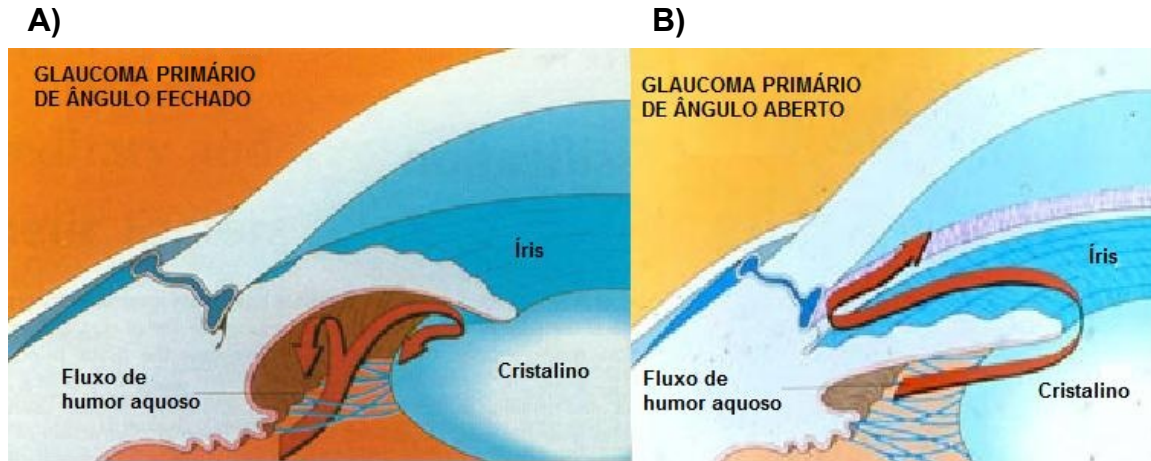


Fig. 3: Representação da obstrução da passagem do humor aquoso pela pupila no glaucoma de ângulo fechado (a) e do aumento da quantidade de humor aquoso no glaucoma de ângulo aberto (b) (Coleman, 1999).

1.2 Retina

A retina de mamíferos é formada por mais de 60 tipos de neurônios (**Fig. 4**), cada um desempenhando um papel específico no processamento da imagem visual, ou seja, os fotorreceptores são os cones, bastonetes e células ganglionares (através da melanopsina); as células bipolares e ganglionares são neurônios condutores; as células horizontais e amácrinas são neurônios associativos; e as células de sustentação (neuróglias) são formadas pelas células de Müller, astróglia e micróglia (Masland, 2001). O arranjo específico dos pericários e prolongamentos destas células, entremeados pelas células de Müller e seus processos, resultam na organização estrutural das 10 camadas da retina (**Fig. 5**).

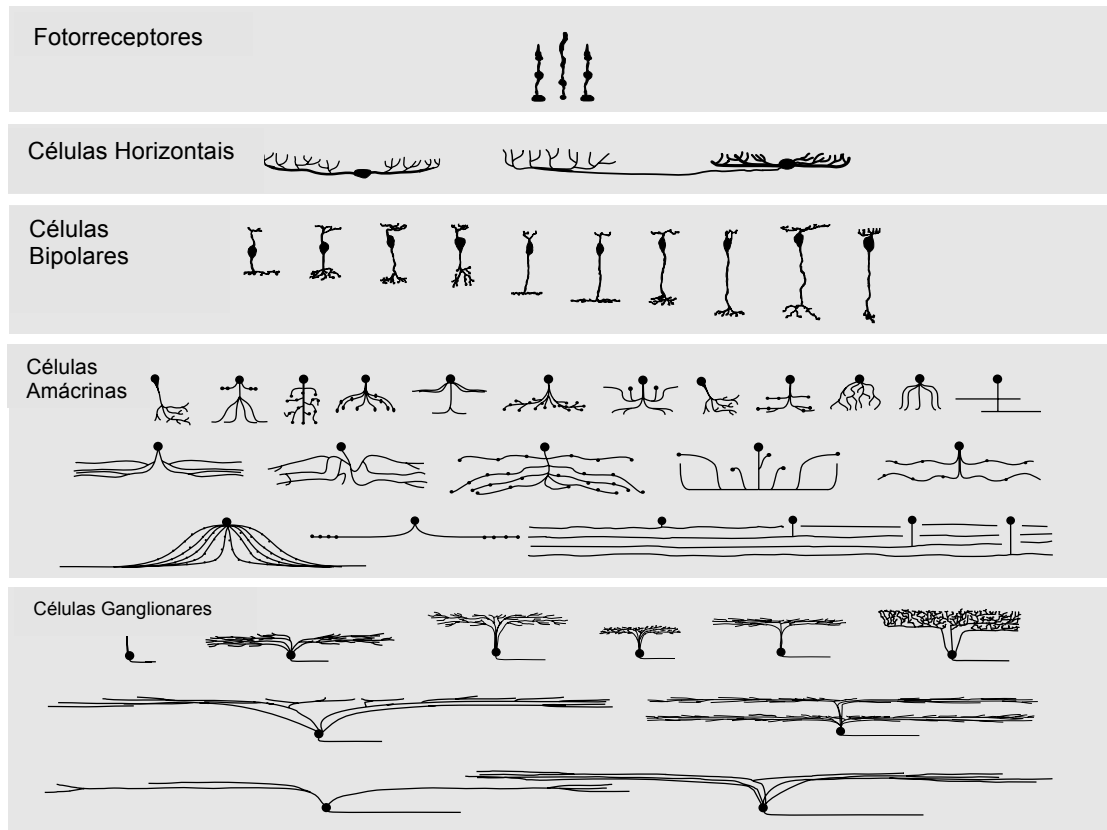


Fig. 4: Esquema dos diferentes tipos neuronais da retina de mamíferos. Na figura estão representados 49 tipos celulares que correspondem aos mais frequentes em mamíferos (Masland, 2001).

A camada mais externa da retina é constituída pelo epitélio pigmentado (**Fig. 5**), cujas células estão conectadas por junções comunicantes e zônulas de oclusão e de adesão. Tais junções formam a barreira hematorretinana externa (Ross e Pawlina, 2012). O epitélio pigmentado da retina por meio de suas microvilosidades apicais articula-se com os segmentos externos dos fotorreceptores sem, contudo, apresentarem junções celulares entre eles. Por este motivo, estas duas camadas, frequentemente se separam, ocasionando o deslocamento de retina durante o processamento histológico.

A camada dos fotorreceptores (**Fig. 5**) é formada pelos segmentos externos e internos de cones e bastonetes, sendo que o núcleo destas células

formam a camada nuclear externa. O segmento externo é o local da fotossensibilidade e o segmento interno contem a maquinaria metabólica necessária à atividade dos fotorreceptores.

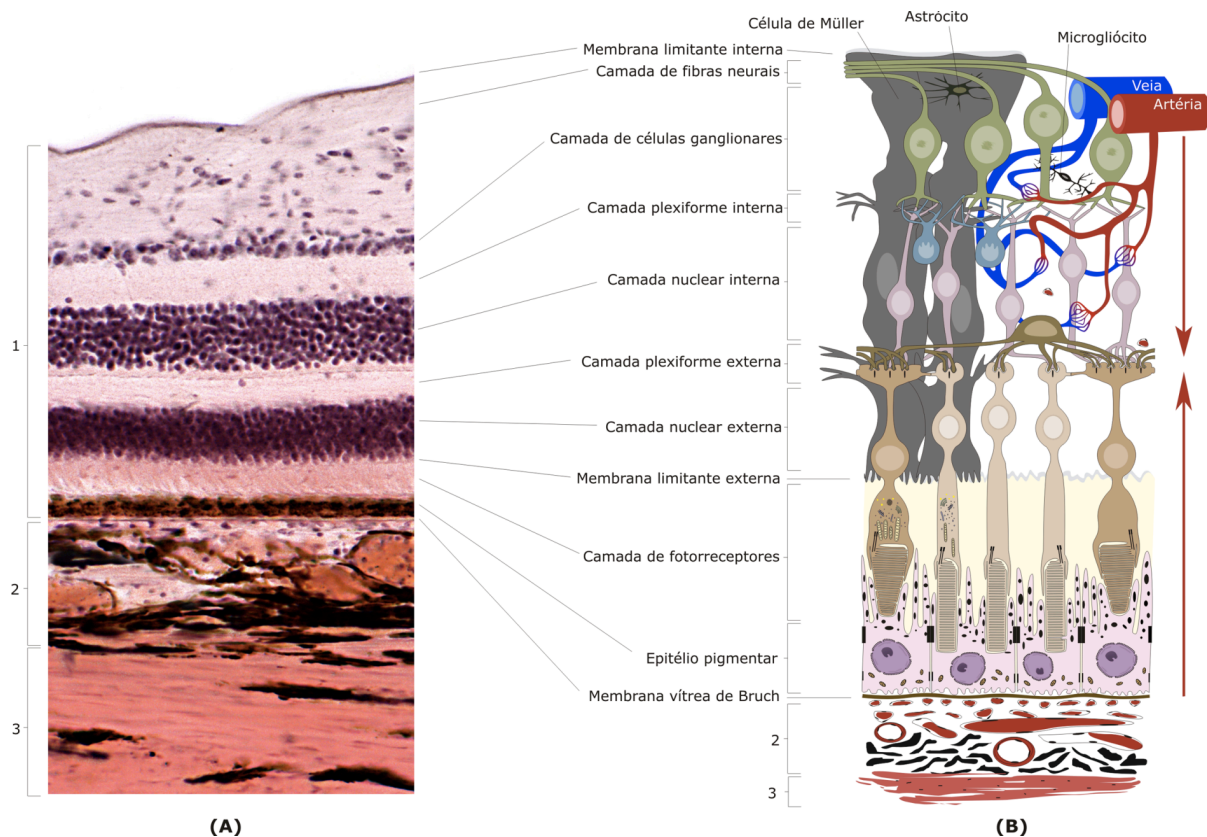


Fig. 5. (A) Fotomicrografia da parede ocular humana: 1 – Retina (próxima ao disco óptico); 2 – Coróide; 3 – Esclera (observam-se esparsos melanócitos). Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento pequeno. (B) Desenho esquemático da parede ocular, com ênfase na retina, mostrando as inter-relações de seus componentes formando suas dez camadas estruturais. (Ferreira-Filho e Nogueira, 2008).

A membrana limitante externa (**Fig. 5**) não é uma membrana verdadeira e sim uma fileira de zônulas de adesão das células de Müller com os cones e bastonetes, e das células de Müller entre si. Esta membrana parece desempenhar uma barreira metabólica que restringe a passagem de grandes moléculas em direção às camadas internas da retina (Ross e Pawlina, 2012).

A camada plexiforme externa (**Fig. 5**) é formada por axônios das células fotorreceptoras, que fazem sinapses com prolongamentos das células bipolares e horizontais. Estes prolongamentos permitem conexões neurais elaboradas (esférulas de bastonetes e pedículos de cones) nessa camada.

A camada nuclear interna (**Fig. 5**) é formada pelos núcleos das células bipolares, horizontais, amácrinas e de Müller. Os capilares provenientes dos vasos centrais da retina se estendem apenas até essa camada e nutrem a retina interna. A retina externa, por sua vez, é nutrida pelos capilares da camada coriocapilar da corióide (Ferreira-Filho e Nogueira, 2008).

A camada plexiforme interna (**Fig. 5**) consiste em conexões sinápticas entre os axônios das células bipolares e dendritos das células ganglionares, e também conexões sinápticas entre as células amácrinas e bipolares.

A camada das células ganglionares (**Fig. 5**) é formada por neurônios multipolares. Os axônios destas células emergem do corpo celular e irão formar a camada das fibras nervosas (amielínicas) (**Fig. 5**) e, posteriormente, irão convergir para formar o nervo óptico.

A membrana limitante interna (**Fig. 5**), forma o limite mais interno da retina e é constituída pela extremidade das células de Müller e sua lâmina basal.

1.3 Apoptose das células ganglionares

As células ganglionares (CGs) são responsáveis por conduzir os impulsos elétricos através de potenciais de ação clássicos para o corpo geniculado lateral (local da 1ª sinapse). Os axônios das CGs convergem na cabeça (ou disco) do

nervo óptico e deixam o olho atravessando a lâmina crivosa, formando assim o nervo óptico. Portanto, a apoptose das CGs impactará diretamente a via visual.

A apoptose é um processo fundamental para a manutenção da homeostase dos organismos. No entanto, qualquer desequilíbrio no processo apoptótico pode acarretar consequências drásticas, tais como: doenças autoimunes, tumores e neurodegeneração (Degterev et al., 2003). Tem sido demonstrado que as CGs morrem por apoptose em modelos de lesão aguda do nervo óptico (axotomia e esmagamento - Berkelaar et al., 1994), no glaucoma experimental (Garcia-Valenzuela et al., 1995) e em pacientes com glaucoma primário (Kerrigan et al., 1997). Além disso, a morte por apoptose das CGs foi confirmada por visualização em tempo real, *in vivo*, em olhos de ratos com hipertensão ocular (Cordeiro et al., 2004).

A apoptose é um evento controlado geneticamente que faz com que as células entrem em um complexo processo de morte envolvendo diversos fatores reguladores (Degterev et al., 2003). Durante este processo, as células sofrem alterações características, como retração celular, perda de aderência com a matriz celular e células vizinhas, fragmentação internucleossômica do DNA, translocação da fosfatidilserina para a membrana externa e fragmentação da célula em corpos apoptóticos que serão, posteriormente, fagocitados por macrófagos e/ou outras células vizinhas, sem modificações visíveis na vizinhança (Hengartner, 2000; Degterev et al., 2003).

O processo de morte celular pode ocorrer de duas formas: pela disfunção de organelas, onde a mitocôndria exerce papel crucial no processo (denominado via intrínseca); ou através de uma via conhecida como extrínseca, onde a

apoptose ocorre através da participação da grande família de proteínas cisteínas, denominadas caspases, caracterizadas pela presença de uma cisteína no sítio ativo capaz de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (Gross et al., 1999).

Na via intrínseca (**Fig. 6**) membros pro-apoptóticos da família Bcl-2 são ativados (como, por exemplo, Bax, Bak e Bid). Estes interagem com a mitocôndria, ocasionando a despolarização da membrana mitocondrial e consequente liberação do citocromo C (Pradelli et al., 2010). O citocromo C interage com Apaf-1 (Fator-1 de ativação de protease apoptótica) e procaspase-9 para formar o apoptossomo, o que resulta em clivagem e ativação da caspase-3.

A via extrínseca é ativada em resposta a sinais extracelulares que indicam que a existência da célula já não é necessária à higidez do organismo. Esta via é iniciada pela ativação de receptores de morte transmembrânico como o CD95/Fas/Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/Killer e DR6. A **Fig.6** mostra um receptor de morte ativo (exemplo, TNFR e FasR) que recruta procaspase-8 gerando caspase-8 ativa, que por sua vez ativa a caspase-3 (Almasieh et al., 2012).

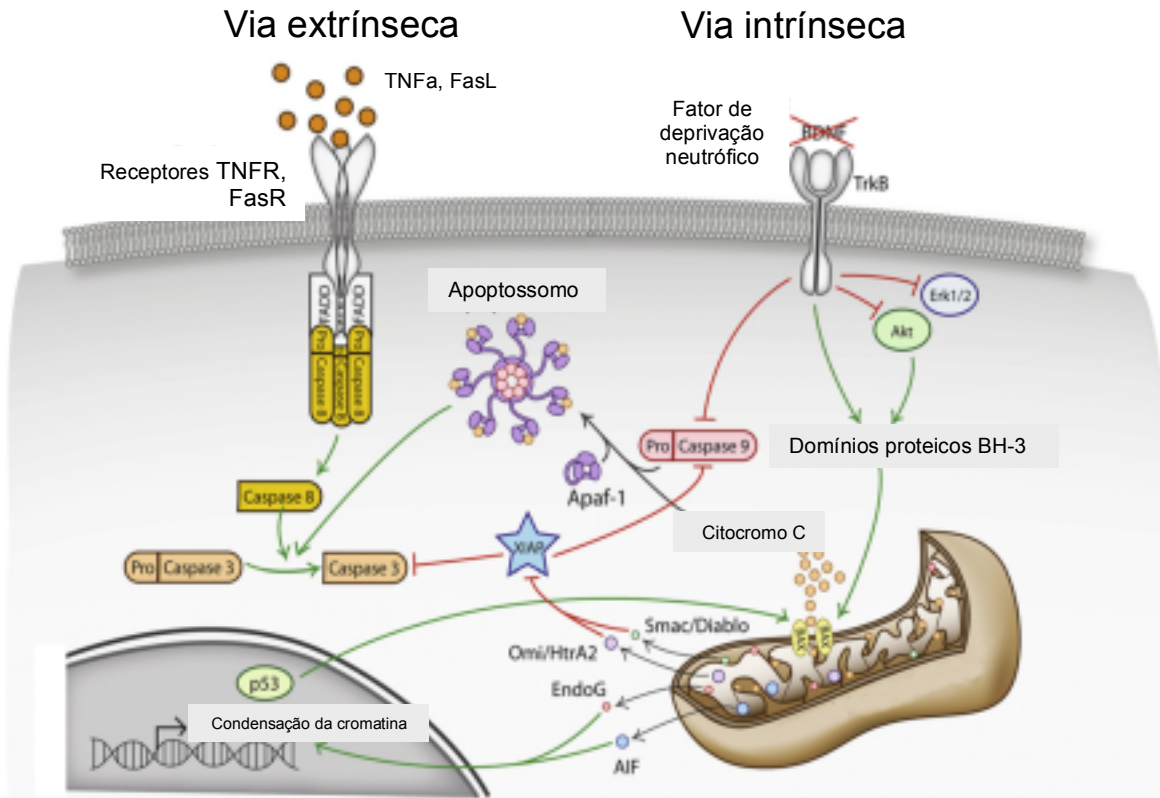


Fig. 6: Representação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Almasieh et al., 2012).

As caspases envolvidas diretamente na apoptose são divididas em dois grupos: caspases iniciadoras (caspase-2, 8, 9 e 10) e caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7) (Denault e Salvesen, 2002). As caspases iniciadoras são as primeiras a serem ativadas após o estímulo para a apoptose, sendo que ao serem ativadas formam homodímeros, onde cada monômero é formado por uma subunidade maior e outra menor (Hengartner, 2000). As caspases efetoras, por sua vez, são expressas como dímeros inativos que se tornam ativos ao serem clivados pelas caspases iniciadoras (Denault e Salvesen, 2002). Em seu estado ativado, as caspases provocam rapidamente a morte da célula (iniciando cerca de 30 minutos após o estímulo de morte). Por isso, a síntese das caspases como

pró-enzimas inativas e vias altamente complexas que controlam a ativação do processo apoptótico são potentes estratégias para manter um rigoroso controle, evitando assim, a ativação das caspases numa célula saudável.

A imunohistoquímica com anticorpos específicos para as caspases efetoras tem sido amplamente utilizada para a detecção da apoptose, e dentre elas a caspase-3 é a mais estudada, tanto por seu papel no processo da apoptose, quanto pelo fato de ser ativada por ambas as vias (extrínseca e intrínseca) (Snigdha et al., 2012).

1.4 Tratamentos atuais disponíveis para o glaucoma

O único método clinicamente estabelecido para o tratamento do glaucoma é a redução da PIO, que pode ser alcançada com tratamento farmacológico, terapia a laser e cirurgia, se necessário (Brubaker, 2003; Mckinnon et al., 2008).

No tratamento a laser (trabeculoplastia), um feixe de luz incide sobre a rede trabecular para reduzir a resistência à drenagem do humor aquoso. Esse tratamento costuma ser efetivo nos primeiros meses, mas perde seu efeito com o tempo (85% de falha terapêutica). As principais complicações da terapia a laser incluem aumento da PIO durante o procedimento e a ocorrência de inflamação após o procedimento (Lewis et al., 2002; Weinreb e Khaw, 2004).

A filtração cirúrgica, o tratamento cirúrgico mais utilizado, é realizado pela criação de um caminho alternativo para a drenagem do humor aquoso e redução da PIO. As principais complicações incluem fechamento de fístola (rota alternativa), hipotonia, uveíte e hemorragia supracoroidal (Lewis et al., 2002).

Outro tratamento cirúrgico do glaucoma é a trabeculectomia, que remove uma pequena porção da rede trabecular e dos tecidos adjacentes para aumentar a drenagem de humor aquoso. No entanto, esta técnica tem sido evitada pelo uso de agentes cancerígenos (5-fluorouracila e mitomicina) (Weinreb e Khaw, 2004).

Em relação ao tratamento farmacológico, a terapêutica inicial, na maioria dos casos, baseia-se na utilização de colírios hipotensores através da instilação de 1 gota, uma ou duas vezes ao dia (Lewis et al., 2002; McKinnon et al., 2008). Os fármacos disponíveis (**Tabela 1**) são os beta-bloqueadores, os análogos de prostaglandinas, os inibidores da anidrase carbônica, os agonistas α -2 seletivos e agentes colinérgicos (McKinnon et al., 2008; Rafuse, 2009)

Tabela 1: Antiglaucomatosos utilizados e seus efeitos no humor aquoso.

Composto	PIO %	Produção do humor aquoso (%)	Drenagem do humor aquoso (%)
β -bloqueador não seletivo	↓ 20-30	↓ 35	
β -bloqueador β 1 seletivo	↓ 15-25	↓ 25	
Agonista adrenérgico não seletivo	↓ 15-25		↑
Agonista α 2 seletivo	↓ 20-30	↓ 35	?
Inibidor da anidrase carbônica	↓ 20-35	↓ 35	
Análogo de prostaglandina	↓ 25-35		↑100

Referência: Vaajanen e Vapaatalo, 2011.

Dentre estes, os mais utilizados são os análogos de prostaglandinas (latanoprost, bimatoprost e travoprost), que reduzem a PIO pelo aumento da drenagem não convencional do humor aquoso. Contudo, o alto custo destes medicamentos e alguns efeitos adversos que podem ser observados (hiperpigmentação gradual e irreversível da íris por aumento de melanossomos, escurecimento das sobrancelhas, espessamento dos cílios, inflamação ocular e

ceratite) são aspectos desfavoráveis (Weinreb e Khaw, 2004). Os inibidores da anidrase carbônica (brinzolamida e dorzolamida) são utilizados, atualmente, em caso de falha terapêutica ou intolerância aos análogos de prostaglandinas, pois acarretam alguns efeitos adversos e apresentam menor potencial para redução da PIO quando comparado aos análogos de prostaglandinas (Weinreb e Khaw, 2004; Mincione et al., 2008).

1.5 Modelos de roedores para o estudo do glaucoma

Modelos de roedores para o estudo do glaucoma estão sendo cada vez mais utilizados tanto pelas similaridades com o olho humano (como, por exemplo, presença de um verdadeiro canal de Schlemm e similar dinâmica do humor aquoso), quanto pela acessibilidade aos animais e desenvolvimento de técnicas e instrumentos adequados para avaliar os processos envolvidos no glaucoma, nestes animais (Pang e Clark, 2007).

Dentre os modelos estão:

- O camundongo DBA/2J apresenta mutações em dois genes (Tyrp1 e Gpnmb) e desenvolve um aumento progressivo da PIO, que induz a morte das GCs. No entanto, o tamanho reduzido do bulbo do olho e a ausência de lâmina crivosa limitam a utilização desse modelo (Anderson et al., 2002).
 - Camundongos com deficiência para os transportadores de glutamato (GLAST ou EAAC1). Este modelo promove morte das CGs e degeneração do nervo óptico sem elevação da PIO (Harada et al., 2007).
-

- Cauterização da veia episcleral de ratos ou camundongos, cuja elevação da PIO pode ser mantida por até 6 meses (Shareef et al., 1995).
- Injeções de solução salina hipertônica na veia episcleral de ratos. Essa técnica necessita de microagulhas especializadas e micropipetas de vidro, além de apresentar elevado grau de variabilidade entre 0 e 30 mmHg em comparação com animais controle. Em alguns casos, as injeções repetidas são necessários se a PIO não elevar após um tratamento inicial (Morrison et al., 1997).
- Fotocoagulação a laser da rede trabecular (semanal) de ratos ou camundongos. Este modelo induz hipertensão ocular por até 12 semanas (Ueda et al., 1998).
- Transecção parcial ou completa do nervo óptico de camundongos ou ratos. Este modelo é indicado para estudo específico da morte das CGs (Levkovitch-Verbin et al., 2000).
- Indução de isquemia e reperfusão na retina de ratos e camundongos, causando a morte das CGs. Este modelo é usado para investigar o papel da insuficiência vascular no glaucoma (Buchi, 1992).
- Injeção de substâncias na câmara anterior de ratos, tais como injeções semanais de microesferas de látex (Urcola et al., 2006) e injeções semanais de ácido hialurônico (Moreno et al., 2005).

O ácido hialurônico é um dos glicosaminoglicanos mais abundantes na matriz extracelular da rede trabecular. Ele é sintetizado na superfície da célula e desempenha um papel importante em funções celulares como, adesão celular, migração, manutenção e gênese da matriz extracelular (Knepper et al., 1996).

Este glicosaminoglicano contribui para a consistência em gel da matriz extracelular e, devido à sua densidade de carga negativa, é capaz de atrair íons e água. Esta propriedade fornece permeabilidade seletiva para a rede trabecular, assim como um gradiente de pressão entre a câmara anterior e as vias de drenagem do humor (Knepper et al., 1996). Uma elevação da PIO foi demonstrada quando o ácido hialurônico foi usado como uma substância viscoelástica na cirurgia de catarata (Holzer et al., 2001), sugerindo que o ácido hialurônico pode ter uma faixa de concentração ótima na câmara anterior, sendo que altos níveis podem resultar em aumento da viscosidade e diminuição do fluxo na rede trabecular (Francois et al., 1984; Knepper et al., 1996).

Seguindo esse raciocínio, alguns modelos experimentais de glaucoma foram desenvolvidos a partir do ácido hialurônico. Benozzi et al. (2002) mostraram que uma única injeção de ácido hialurônico (25 μ L - 10mg/mL) foi capaz de produzir hipertensão ocular por 8 dias. Poucos anos depois, Moreno et al. (2005) descreveram um novo modelo crônico de glaucoma experimental através da injeção semanal de ácido hialurônico (25 μ L - 10mg/mL) na câmara anterior durante 6 e 10 semanas. Baseando neste último estudo, o nosso modelo de glaucoma experimental consistiu de injeções semanais e unilaterais de ácido hialurônico (30 μ L - 10mg/mL) também na câmara anterior, próximo ao limbo córneo-escleral, durante 4, 5 ou 6 semanas.

1.6 Mensuração da PIO

Os métodos de mensuração da PIO são categorizados em invasivos e não invasivos, caso perfurem, ou não, o limbo e a córnea. Técnicas invasivas incluem a microcanulação e técnicas não invasivas incluem o uso de pneumotonômetro, modificação do tonômetro de aplanção de Goldmann, tonômetro de recuo Schiøtz e o tonômetro de rebote. Um dos métodos não invasivos mais populares para mensurar a PIO é o uso do tonômetro de aplanção de mão, Moore e colaboradores (1993) foram os primeiros a descrever o uso deste equipamento em ratos anestesiados e mostraram que o tonômetro de aplanção pode ser usado para gerar leituras que se correlacionam com precisão à PIO nos olhos de ratos. O tonômetro de aplanção mensura eletronicamente as mudanças de pressão com toques na região central da córnea. Neste sentido, quando a superfície plana da extremidade do tonômetro é pressionada contra a córnea, a PIO é mensurada de acordo com a força de reação da córnea nesta superfície plana. Atualmente, as mensurações da PIO com o tonômetro de aplanção passaram a ser rotineiramente realizadas em animais conscientes (Reitsamer et al., 2004).

1.7 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é formado por diversos peptídeos biologicamente ativos que atuam na regulação da pressão arterial, na homeostase hidroeletrólítica, no tônus vascular e na função celular (Vaajanen et

al., 2008; Vaajanen et al., 2009). Desequilíbrios neste sistema, além de estarem relacionados a diversas patologias cardiovasculares e renais, tais como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, remodelamento cardíaco, hipertrofia ventricular e insuficiência renal crônica (Ferreira et al., 2012) também estão envolvidos no glaucoma (Bonomi et al., 2000; Vaajanen et al., 2009).

Classicamente, o SRA envolve uma reação em cascata (**Fig. 7**), na qual a renina, sintetizada principalmente pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes dos corpúsculos renais, cliva o angiotensinogênio hepático circulante e produz o decapeptídeo, Angiotensina I (Ang I), que por sua vez é convertido em Angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo, pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Bader et al., 2001; Senanayake et al., 2007; Fyhrquist e Saijonmaa, 2008; Vaajanen et al., 2008; Bader, 2010).

O estudo clássico da descoberta de renina pelo fisiologista finlandês Robert Tigerstedt e seu aluno Per Bergman em 1898 (Tigerstedt e Bergman, 1898) foi baseado em extratos salinos do rim de coelho. Estes pesquisadores mostraram que tais extratos aumentavam a pressão arterial quando injetados em coelhos, e por se tratar de uma proteína que estava no rim, a denominaram renina. Tigerstedt e Bergman ainda especularam que a renina poderia estar associada, de forma direta ou indireta, com a hipertrofia do coração encontrada na doença renal.

A Ang II, o fragmento mais importante e estudado do SRA, é um determinante importante das funções biológicas, tanto em condições fisiológicas quanto em situações patológicas (Nadal et al., 1999; Senanayake et al., 2007). Estudos têm demonstrado que o peptídeo Ang II não é apenas um potente

vasoconstritor e estimulador da liberação de aldosterona pelas glândulas supra-renais (adrenais), mas é também um fator de crescimento e modulador que influencia a apoptose, a proliferação celular, a fibrose tecidual e as respostas inflamatórias (Vaajanen et al., 2008). A Ang II é capaz de gerar uma variedade de respostas dependendo do tipo de célula e do receptor que é ativado com a consequente sinalização celular. Este peptídeo possui dois receptores acoplados à proteína G com 7 domínios transmembrana que possuem características farmacológica e estruturais distintas, os receptores tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) (Nadal et al., 1999; Senanayake et al., 2007; Vaajanen et al., 2008; Vaajanen et al., 2009), sendo que a maioria dos efeitos da Ang II são mediados pelo AT₁. Enquanto a Ang II, ao se ligar ao AT₁, ativa a sinalização de diversas vias que culminam em vasoconstrição, disfunção endotelial, expressão de mediadores pró-inflamatórios, proliferação celular, efeitos pró-fibróticos e pró-trombóticos (Sampaio et al., 2007); ao se ligar ao receptor AT₂ parece desencadear efeitos que são contrários às respostas decorrentes da ligação ao receptor AT₁, como por exemplo, vasodilatação, liberação de óxido nítrico e inibição da proliferação celular (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). Entretanto, os efeitos da estimulação do receptor AT₂ são controversos e ainda não existe uma evidência conclusiva da relevância clínica deste receptor.

O conceito do SRA ampliou consideravelmente com a descoberta de novos componentes nas últimas décadas, como, por exemplo, o eixo ECA2, Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e o receptor Mas (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000; Santos et al., 2003) (**Fig. 7**). A ECA2, descoberta em 2000 simultaneamente por Donoghue e colaboradores (Donoghue et al. 2000) e por

Tipnis e colaboradores (Tipnis et al. 2000), é uma enzima que apresenta aproximadamente 40% de homologia com a ECA (Diez-Freire et al., 2006) e converte, principalmente, a Ang II em Ang-(1-7), cujo receptor acoplado à proteína G é denominado Mas (Santos et al. 2003).

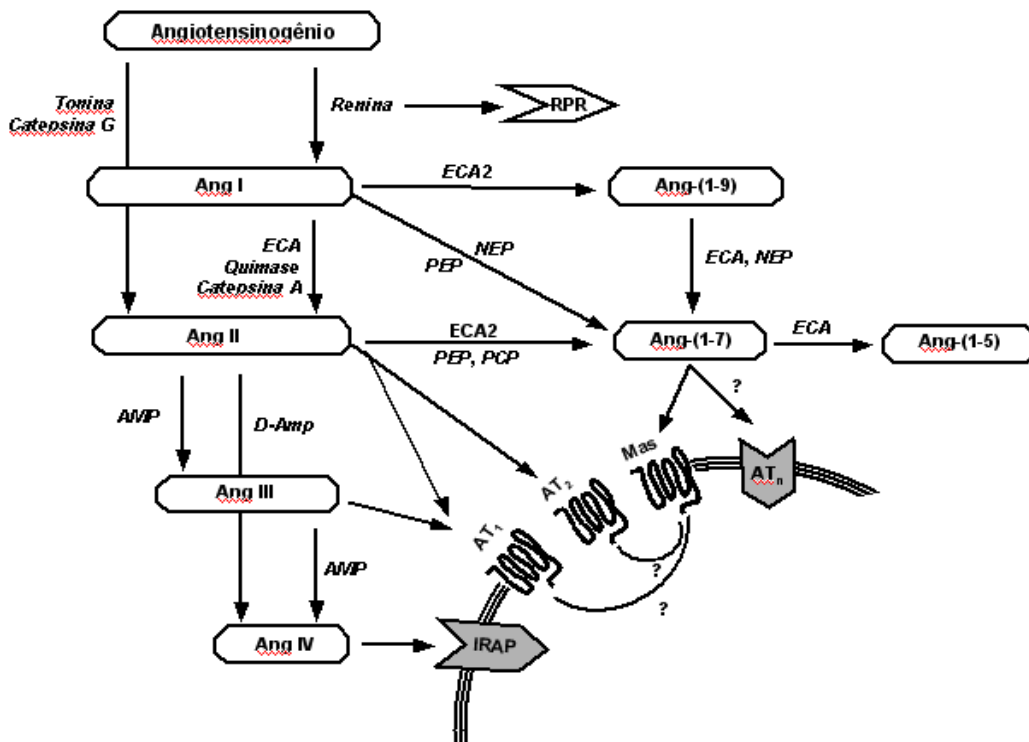


Fig. 7: Visão atual do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora da angiotensina; AMP: aminopeptidase; D-Amp: aminopeptidase-D; Ang: angiotensina; AT₁: receptor de Ang II do tipo 1; AT₂: receptor de Ang II do tipo 2; IRAP: aminopeptidase regulada pela insulina; Mas: receptor da Ang-(1-7); NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolilendopeptidase; RPR: receptor de prorenina/renina (Ferreira et al., 2009).

Assim, enquanto a ECA produz a Ang II, a ECA2, por sua vez, cliva a Ang II para produzir a Ang-(1-7) (Vickers et al., 2002). Logo, a ECA2 tem um duplo papel benéfico no SRA: degradar a Ang II e gerar a Ang-(1-7) (Ferreira et al., 2012), um heptapeptídeo que promove efeitos vasodilatadores, anti-hipertensivos,

anti-proliferativos, anti-hipertróficos e anti-fibróticos (**Fig. 8**) que são contrarreguladores das ações da Ang II (Ferrario, 2006; Schindler et al., 2007; Santos et al., 2008; Rabelo et al., 2011). A Ang-(1-7) também pode ser gerada pela ação da ECA2 sobre a Ang I, formando o peptídeo intermediário Ang-(1-9) que será clivado em Ang-(1-7) pela ECA e/ou pela endopeptidase neutra. Assim, crescente importância tem sido atribuída à Ang-(1-7), principalmente por ser capaz de produzir ações benéficas que atenuam os efeitos deletérios promovidos pela Ang II.

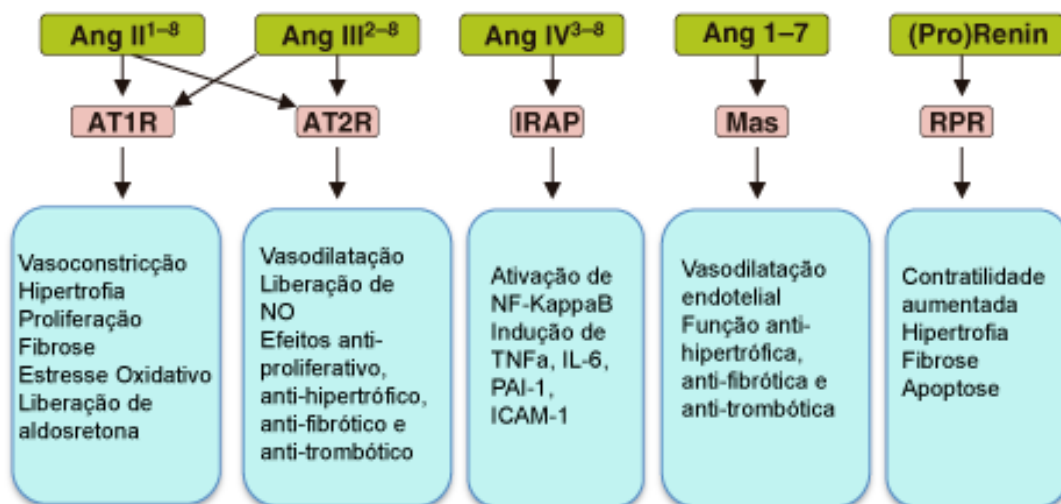


Fig. 8: Efeitos dos peptídeos efetores do SRA mediados por seus respectivos receptores. (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008).

Outros peptídeos do SRA são o heptapeptídeo Angiotensina-(2-8) (Ang III) e hexapeptídeo Angiotensina-(3-8) (Ang IV). Ang III, conhecida desde a década de 70, é gerada a partir de Ang II através da aminopeptidase A (**Fig. 7**). Enquanto Ang II é considerada o principal efector do SRA, a Ang III pode ser tão, ou mais importante, em algumas ações mediadas pelo receptor AT₁ (**Fig. 8**), como, por

exemplo, liberação de vasopressina (Zini et al., 1996). A infusão sistêmica de Ang II ou Ang III em cães conscientes resultou em efeitos similares na pressão arterial, secreção de sódio e atividade da renina no plasma. No entanto, a taxa de depuração metabólica da Ang III foi 5 vezes maior que a Ang II, o que sugere que a Ang II desempenha um papel dominante como um efector do "clássico" SRA (Gammelgaard et al., 2006).

Já a Ang IV pode ser gerada a partir da Ang II ou Ang III através da ação de aminopeptidases (**Fig. 7**) e suas ações, mediadas pelo receptor de insulina-regulado por aminopeptidase (IRAP) (**Fig. 8**), incluem: vasodilatação renal, hipertrofia e ativação de NF-kB (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). Ang IV regula o crescimento celular de fibroblastos cardíacos, células endoteliais e células musculares lisas vasculares. Além disso, parece que a Ang IV está envolvida na resposta inflamatória vascular.

1.8 Sistema renina-angiotensina ocular

Além do SRA circulatório, existem sistemas teciduais similares que regulam mudanças a longo prazo na maioria dos órgãos (Fyhrquist and Saijonmaa 2008), incluindo os olhos (Rojanapongpun et al., 1993; Wagner et al., 1996; Savaskan et al., 2004; Luhtala et al., 2009; Vaajanen et al., 2009).

Uma questão que tem-se discutido se refere à origem dos componentes do SRA ocular. Tais componentes são formados a partir de uma produção local ou partir da produção sistêmica e captados pelos olhos? Kramkowski e colaboradores (2006) afirmaram que, nos tecidos, a Ang II pode ser derivada da

circulação sistêmica ou da produção local e que a formação local de Ang II pode ser catalisada por outras enzimas além da clássica ECA, tais como: quimase e catepsina G. Além disso, já foi mostrado que a Ang I, Ang II e angiotensinogênio são incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica (Danser et al., 1994) e a barreira hemoretiniana parece ser similar à hematoencefálica (Cunha-Vaz, 1979). Isto sugere que, se não todos, vários componentes do SRA podem ser formados intra-ocularmente. Outros indicativos da produção local de componentes do SRA no olho são: a) maior concentração de Ang II no olho quando comparado com o plasma (Kohler et al., 1997) e b) existência de um receptor de pró-renina (PRR) tecidual que parece atuar no rim, no coração e na retina (Wilkinson-Berka et al., 2010; Nguyen, 2011). O PRR aumenta a atividade enzimática da renina, logo, se os componentes do SRA ocular não fossem produzidos localmente, não faria sentido a presença do PRR na retina para iniciar as reações em cascata que envolvem o SRA.

Embora vários componentes do SRA (**Tabela 2**) já tenham sido identificados nas estruturas oculares de animais e humanos, a sua função ainda não está bem estabelecida. Existem evidências de que o SRA intraocular tenha um papel significativo na formação e drenagem do humor aquoso.

Laliberte e colaboradores (1988) detectaram a presença da ECA no epitélio não-pigmentado do corpo ciliar de ratos, sugerindo a participação do SRA na produção do humor aquoso, uma vez que ele é produzido por tais células. Posteriormente, Luhtala e colaboradores (2009) foram os primeiros a observarem a atividade da ECA2 no corpo ciliar de porcos e também ressaltaram a sua possível função na produção do humor aquoso. Por outro lado, a expressão de

componentes do SRA na rede trabecular, sugere uma participação na drenagem do humor aquoso (Shen et al., 2001).

Tabela 2: *Sítios de localização de componentes do SRA no olho de diferentes mamíferos.*

Prorrenina	Retina	Humano	(Sramek et al., 1988)
	Corpo ciliar	Humano	(Danser et al., 1989)
	Humor vítreo	Humano	
Renina	Retina	Humano, coelho	(Danser et al., 1989)
	Corpo ciliar	Coelho	(Wagner et al., 1996)
	Corióide	Humano, coelho	(Ramirez et al., 1996)
	Íris	Coelho	
	Humor vítreo	Humano, coelho	
Angotensinogênio	Humor aquoso	Coelho	
	Retina	Humano, coelho	(Sramek et al., 1992)
	Corpo ciliar	Humano, coelho	(Ramirez et al., 1996)
	Corióide	Humano, coelho	(Wagner et al., 1996)
	Íris	Humano, coelho	
ECA	Humor vítreo	Humano, coelho	
	Humor aquoso	Coelho	(Vita et al., 1981)
	Retina	Humano, macaco, cão, coelho, porco	(Weinreb et al., 1985)
	Corpo ciliar	Humano, porco, coelho	(Immonem et al., 1987)
	Corióide	Humano, macaco, cão, coelho, porco	(Ramirez et al., 1996)
	Esclera	Macaco, cão	(Wagner et al., 1996)
	Íris	Porco, coelho	(Shiota et al., 1997)
	Córnea	Humano	(Geng et al., 2003)
	Humor vítreo	Macaco, cão, coelho	(Savaskan et al., 2004)
	Humor aquoso	Humano, macaco, cão, coelho,	
ECA2	Lágrima	Humano, coelho	
	Retina	Humanos, roedores	(Tikellis et al., 2004) (Senanayake et al., 2007)
	Corióide	Cão	(Shiota et al., 1997)
	Esclera	Cão	(Maruichi et al., 2004)
Receptor AT1	Humor vítreo	Humano	
	Retina	Humano	(Savaskan et al., 2004)
Receptor AT2	Córnea	Humano	(Senanayake et al., 2007)
	Retina	Humano	(Senanayake et al., 2007)
Ang I	Retina	Humano	(Senanayake et al., 2007)
	Corióide	Porco	
	Humor vítreo	Humano, porco	
Ang II	Humor aquoso	Humano	
	Retina	Humano, porco, coelho,	(Danser et al., 1989)
	Corpo ciliar	Humano, coelho	(Ramirez et al., 1996)
	Corióide	Humano, coelho, porco	(Savaskan et al., 2004)
	Íris	Coelho	(Senanayake et al., 2007)
	Córnea	Humano	
	Humor vítreo	Humano, coelho, porco	
	Humor aquoso	Humano, coelho	
Retina	Humano	(Senanayake et al., 2007)	

Referência: Vaajanen e Vapaatalo, 2011.

Além da ECA e da ECA2, outros componentes do SRA também já foram encontrados no olho, tais como, a Ang II (Nadal et al. 1999), Ang-(1-7) (Senanayake et al. 2007) e os receptores AT₁, AT₂ e Mas (Vaajanen et al. 2009; Savaskan et al, 2004).

A Ang II, considerada um peptídeo chave do SRA, tem sido detectada em estruturas oculares humanos, incluindo o epitélio ciliar não-pigmentado, córnea, conjuntiva, células da rede trabecular, CGs, fotorreceptores e as células endoteliais dos vasos da retina e coriósia (Savaskan et al, 2004; Vaajanen et al, 2008; Wang et al., 2012). Esse peptídeo foi capaz de aumentar a PIO em ratos (Funk et al., 1985; Palm, 1995), induzir proliferação celular na rede trabecular de bovinos e aumentar a síntese de colágeno *in vitro*, o que poderia diminuir a drenagem do humor aquoso (Shen et al., 2001). Em outro estudo, (Inoue et al., 2001) verificaram que Ang II administrada intra-ocularmente diminuiu a drenagem através da via uveoescleral em coelhos (Inoue et al., 2001).

Inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT₁ (ARBs) estão bem estabelecidos quanto às suas benéficas ações na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008) e já foram associados a efeitos positivos na redução da PIO. Um estudo em humano demonstrou que a administração oral do inibidor da ECA (captopril) reduziu a PIO em pacientes normotensos e glaucomatosos (Costagliola et al., 1995) e sugeriu um possível efeito na diminuição da produção do humor aquoso. Inibidores da ECA parecem promover a síntese de prostaglandinas, impedindo a quebra da bradicinina, o que poderia, conseqüentemente, reduzir a PIO (Lotti e Pawlowski, 1990). Além disso, ao impedir a quebra da bradicinina, os inibidores da ECA também podem ativar a

via do óxido nítrico, bem como a reduzir a formação do peptídeo vasoconstritor endotelina-1. Haefliger e colaboradores (1992) demonstraram que a endotelina-1 pode provocar a contração das artérias oftálmicas e ciliares de porcos, assim como da artéria oftálmica humana. Outros estudos também mostraram redução da PIO com administração tópica de inibidores da ECA em animais (Shah et al., 2000; Loftsson et al., 2010), bem como em administração tópica de ARBs em coelhos hipertensos e macacos glaucomatosos (Inoue et al., 2001; Wang et al., 2005).

Atualmente, além dos clássicos inibidores da ECA e ARBs, outros compostos relacionados ao SRA começaram a ser administrados no olho. Vaajanen e colaboradores (2008) ao administrarem Ang-(1-7), através de injeções intravítreas, observaram redução da PIO em coelhos normotensos. Mais recentemente, Wang e colaboradores (2012) demonstraram que 5 dias de aplicação tópica de SPP635, um inibidor de renina, reduziu a PIO em macacos com glaucoma.

Agentes terapêuticos que também estão sob intensa investigação para o tratamento do glaucoma são os neuroprotetores. Neuroproteção é uma estratégia terapêutica direcionada à manutenção das CGs vivas e funcionais (Weinreb, 2007). Em outras palavras, a neuroproteção no glaucoma é direcionada ao principal neurônio da via visual e, embora as terapias de redução da PIO possam ser consideradas, indiretamente, como neuroprotetoras, por definição, neuroproteção é especificamente orientada para o neurônio e independente da redução da PIO. As CGs são o ponto alvo para a neuroproteção, pois: (1) as CGs morrem em decorrência do glaucoma e neuropatia óptica; (2) a perda das CGs é

irreversível, uma vez que estas células são neurônios do sistema nervoso central; e (3) os axônios das CGs irão formar o nervo óptico e, sendo assim, participam da via óptica (Levin, 2003). Drogas que modulam o SRA parecem ser neuroprotetoras contra a perda das CGs, uma vez que Yang e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento contínuo com o captopril (inibidor da ECA) e candesartan, um antagonista do receptor AT₁, promoveram neuroproteção em ratos com glaucoma crônico.

1.9 O ativador da ECA2 – Aceturato de Diminazeno (DIZE)

O DIZE é uma diamidina aromática disponível na forma de aceturato de diminazeno. Trata-se de uma especialidade farmacêutica veterinária utilizada como antiparasitário que tem demonstrado significativa atividade tripanocida (exceto para *Trypanosoma cruzi*) e leishmanicida (Jean-Moreno et al., 2006; Kroubi et al., 2010). Esta droga foi recentemente identificada como ativador da ECA2 (Gjymishka et al., 2010) e potencial precursor de novos agentes anti-hipertensivos.

Embora o DIZE ainda não tenha sido aprovado para uso humano, alguns estudos tem sido realizados utilizando a droga em humanos, para prevenção de encefalopatia em pacientes com doença do sono (tripanossomíase humana africana) (Bailey, 1968), e desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo o fármaco, para potencial liberação cerebral da droga no tratamento da doença do sono (Olbrich et al., 2004).

1.10 Sistemas de liberação controlada de drogas

O glaucoma é uma doença crônica que, na maioria dos casos, requer permanente tratamento farmacêutico (Quigley, 2005). Os colírios ainda são a base para o tratamento do glaucoma, respondendo por aproximadamente 90% de todos os tratamentos oftalmológicos (Bourlais et al., 1998). No entanto, apenas 1% a 7% das drogas administradas realmente atingem o humor aquoso (Bourlais et al., 1998; Gulsen et al., 2005; Ludwig et al., 2005). Isso se deve à depuração do medicamento através da lágrima e à barreira corneal (Ghate e Edelhauser, 2008), o que implica na administração de soluções altamente concentradas e instilações frequentes. Soma-se a isso a adesão do paciente ao tratamento devido à dificuldade de instilação ou mesmo esquecimento. Estes fatores são muito imprevisíveis e difíceis de controlar, principalmente em tratamento prolongado (Ghate e Edelhauser, 2008).

Neste contexto, sistemas de liberação controlada de drogas estão sendo amplamente investigados, pois podem fornecer quantidades terapêuticamente eficazes de medicamentos por um período de tempo prolongado, eliminando a necessidade de múltiplas doses de um fármaco durante o dia ou semana e podem limitar a exposição sistêmica e efeitos colaterais, além de melhorar a aderência do paciente e os resultados da terapia (Del Amo e Urtili, 2008; Lee et al., 2010).

Entre as formulações de sistemas de liberação prolongada de drogas

podemos citar as microesferas (Zimmer e Kreuter, 1995), as nanopartículas (Langer et al., 1997) e lipossomas (Meisner e Mezei, 1995). Quando esses sistemas não são implantáveis, eles são conhecidos como *inserts* (Saettone e Salminen, 1995), pois são colocados no fórnice conjuntival (entre a pálpebra inferior e o olho), onde são expostos à lágrima (**Fig. 9**). Tais dispositivos são frequentemente baseados em uma matriz composta de polímeros degradáveis, sendo a quitosana uma matriz polimérica adequada para estes *inserts*, uma vez que é um polímero não-tóxico, biocompatível e biodegradável (Chen et al., 1994; Ghate e Edelhauser, 2008).

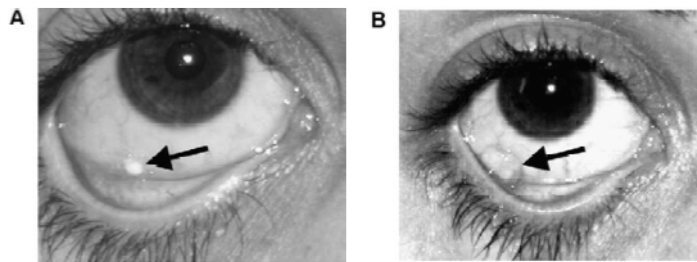


Fig. 9: Dispositivo ocular colocado no fórnice conjuntival humano, imediatamente após (A) e após 8 horas (B), já hidratado (Hornof et al., 2003).

2 JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A terapia para o tratamento do glaucoma geralmente é baseada em agentes que reduzem a PIO ou previnem seu aumento de modo a minimizar a morte celular. Fármacos antiglaucomatosos disponíveis no mercado estão listados na **Tabela 1** (página 29) . Esses medicamentos são administrados topicamente e atuam reduzindo a formação do humor aquoso no corpo ciliar ou aumentando a drenagem do mesmo.

No entanto, mesmo diante da PIO controlada, alguns pacientes evoluem com morte das CGs e perda progressiva da visão. Conseqüentemente, existe grande interesse em desenvolver agentes que não só reduzem a PIO, mas também que sejam capazes de prevenir a morte neuronal, promovendo neuroproteção. Assim, mesmo que potentes drogas utilizadas por oftalmologistas para o tratamento de pacientes com glaucoma sejam eficientes em reduzir a PIO, ainda se faz necessário uma abordagem terapêutica voltada para a neuroproteção, pois é relativamente comum os pacientes apresentarem piora do campo visual após a redução da PIO (Levin 2003). Isso significa que, mesmo diante de um controle clínico excelente da PIO, alguns pacientes podem progredir com prejuízo da função visual.

Drogas moduladoras do SRA foram capazes de reduzir a PIO em animais (Inoue et al. 2001; Wang et al. 2005; Vaajanen et al. 2008) e em humanos (Costagliola et al., 2000), bem como foram capazes de promover neuroproteção (Fletcher et al., 2010). Nesse contexto, devido ao fato da ECA2 catalisar a

hidrólise da porção C-terminal da Ang II para formar o peptídeo Ang-(1-7), essa enzima apresenta um duplo papel benéfico no SRA: degradar um peptídeo com ações relacionadas à vasoconstrição e disfunção endotelial, (Sampaio et al., 2007); e sintetizar outro, que contra-regula essas ações deletérias da Ang II. Logo, a ativação da ECA2 pode vir a ser uma estratégia terapêutica para o tratamento do glaucoma.

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena utilizando o composto aceturato de diminazeno (DIZE) em ratos com glaucoma induzido por injeção de ácido hialurônico (HA) na câmara anterior.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da ECA2, através da imunohistoquímica, em estruturas oculares de animais normais e com glaucoma tratados ou não com o DIZE;
 - Analisar a capacidade do DIZE em prevenir a elevação da PIO através da administração sistêmica e tópica do DIZE;
 - Analisar a capacidade do DIZE em reduzir a PIO de ratos com hipertensão ocular;
 - Avaliar a participação do receptor Mas nos efeitos do DIZE através do implante de bombas osmóticas contendo seu antagonista A-779;
 - Avaliar os efeitos neuroprotetores do DIZE em ratos glaucomatosos;
-

- Avaliar os efeitos do DIZE na drenagem do humor aquoso em ratos normais e com glaucoma;
 - Comparar os efeitos do DIZE com um colírio comercial (Dorzolamida) em ratos com glaucoma;
 - Desenvolver dispositivos de liberação prolongada de quitosana contendo DIZE e avaliar os efeitos deste dispositivo no tratamento do glaucoma.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso corporal entre 180 e 220g fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram alojados em biotério com temperatura controlada (22-23°C) e ciclo claro-escuro de 12-12h. Água e comida foram disponíveis *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (CETEA-UFMG) que estão de acordo com as diretrizes dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos Estados Unidos da América para o cuidado e uso de animais de laboratório (protocolo no11/11) (**anexo 1**).

4.2 Tonometria

Todas as mensurações da PIO foram realizadas utilizando o tonômetro de aplanção TonoPen XL (Mentor, Norwell) que foi calibrado antes de sua utilização. Para a realização destas medidas, inicialmente foi instilado na córnea dos animais um anestésico local à base de cloridrato de benoxinato 0,4%. A seguir, os animais foram cuidadosamente contidos com uma pequena toalha e, em cada mensuração, três leituras da PIO foram obtidas em cada olho, sendo que a média dessas três

medidas foi considerada o valor correspondente da PIO para aquele dia. Durante a indução do glaucoma e tratamento com o DIZE as mensurações da PIO foram realizadas semanalmente, sempre no mesmo dia e horário (entre 11:00h e 12:00h).

4.3 Mensuração da pressão arterial sistêmica

A pressão arterial média (PAM) foi avaliada através de um pletismógrafo que é um sistema computadorizado não invasivo para a mensuração da pressão arterial (Kent Scientific Corporation, Torrington). Este sistema utiliza um manguito com sensor para medir a pressão arterial na cauda de ratos. Os animais foram aclimatados um dia antes do início do experimento e a plataforma de retenção foi mantida a aproximadamente 32-35 °C. Para cada sessão, os ratos foram colocados numa caixa de contenção de acrílico e as caudas foram envolvidas pelo manguito. A seguir, a pressão arterial foi mensurada 15 vezes para calcular a média e erro padrão da média.

4.4 Indução do glaucoma

O glaucoma unilateral foi induzido no olho direito (OD) por injeção transcorneana de 30 μ L de HA (10mg/mL) na câmara anterior próximo ao limbo, uma vez por semana, durante 4, 5 ou 6 semanas, sempre no mesmo dia e horário, seguindo o protocolo descrito por Moreno et al. em 2005. O animal foi anestesiado por via intramuscular (i.m.) com cloridrato de ketamina (70 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Além desse procedimento, também foi instilado, diretamente na córnea, o anestésico local cloridrato de benoxinato 0,4%. Nenhum

procedimento foi realizado no olho contralateral, estes constituíram os grupos controles. Avaliação da PIO foi realizada um dia antes da injeção seguinte de HA.

4.5 Protocolos experimentais

Os olhos foram divididos em 4 grupos: 1) olhos normais + salina (grupo CNT): sem glaucoma e tratados apenas com veículo; 2) olhos normais + DIZE (grupo CT): sem glaucoma e tratados com DIZE; 3) olhos glaucomatosos + salina (grupo GNT): com glaucoma induzido e tratados com veículo; 4) olhos glaucomatosos + DIZE (grupo GT): com glaucoma induzido e tratados com DIZE. Os protocolos experimentais estão descritos abaixo e representados na **Fig. 10**.

A. Protocolo preventivo e sistêmico (gavagem): indução do glaucoma unilateral no OD (n=8), uma vez por semana, por 4 semanas. A mensuração da PIO e da PAM foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. Os animais foram tratados diariamente com DIZE (1mg/kg diluído em salina; ~ 0,5 mL por animal, uma vez por dia) de forma sistêmica (através de gavagem). O tratamento iniciou-se imediatamente após a 1ª indução e perdurou por 4 semanas. Os animais que não foram submetidos ao tratamento com DIZE (grupos CNT e GNT) receberam gavagem de solução salina.

B. Protocolo preventivo e tópico (instilação): indução do glaucoma unilateral no OD (n=7-8), uma vez por semana, durante 4 semanas. A mensuração da PIO e da PAM foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. Os animais foram tratados com DIZE na concentração de 1mg/kg diluído em salina (~

20 µL por animal, uma vez por dia) diariamente e de forma tópica (através de instilação). O tratamento iniciou-se imediatamente após a 1ª indução e perdurou por 4 semanas. Os animais que não foram submetidos ao tratamento com DIZE (grupos CNT e GNT) foram instilados com solução salina.

C. Protocolo de tratamento tópico (instilação): indução do glaucoma unilateral no OD (n=7), uma vez por semana, por 4 semanas. A mensuração da PIO e da PAM também foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. O tratamento tópico (instilação) e diário com DIZE, na concentração de 1mg/kg diluído em salina (~ 20 µL por animal, uma vez por dia), teve início após a segunda indução, ou seja, depois de confirmada a PIO elevada. O tratamento perdurou por 3 semanas. Os animais que não foram submetidos ao tratamento com DIZE (grupos CNT e GNT) foram instilados com solução salina.

D. Efeitos do DIZE vs. Dorzolamida: indução do glaucoma unilateral no OD (n=5-7), uma vez por semana, por 5 semanas. A mensuração da PIO e da PAM também foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. O tratamento tópico (instilação) e diário com DIZE (na concentração de 1mg/kg diluído em salina; ~ 20 µL por animal, uma vez por dia) ou com cloridrato de dorzolamida 2% (~ 5 uL por animal, uma vez por dia) teve início após a segunda indução, ou seja, depois de confirmada a PIO elevada e prolongou-se por 2 semanas, quando os tratamentos foram finalizados. Em seguida, a PIO e PAM foram mensuradas por mais 2 semanas. Os animais que não foram submetidos

ao tratamento com DIZE (grupos CNT e GNT) foram instilados com solução salina.

E. Papel do receptor Mas nos efeitos do DIZE: indução do glaucoma unilateral no OD (n=5), uma vez por semana, por 3 semanas. A mensuração da PIO e da PAM também foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. O tratamento tópico (instilação) e diário com DIZE, na concentração de 1mg/kg diluído em salina, teve início após a segunda indução, ou seja, depois de confirmada a PIO elevada. Concomitantemente ao início do tratamento com DIZE, os animais foram submetidos ao implante subcutâneo de mini-bombas osmóticas contendo o antagonista do receptor Mas (A-779) cuja taxa de liberação foi de 120 µg/dia. O tratamento com ambas as drogas (DIZE e A-779) teve duração de 14 dias.

F. Protocolo de tratamento com o dispositivo de liberação controlada: indução do glaucoma unilateral no OD (n=5), uma vez por semana, por 5 semanas. A mensuração da PIO e da PAM também foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. Depois da confirmação da PIO elevada, os *inserts* contendo DIZE foram colocados no fórnice conjuntival dos animais CT e GT e os *inserts* placebo foram colocados no fórnice conjuntival dos animais CNT e GNT. O tratamento perdurou por 4 semanas.

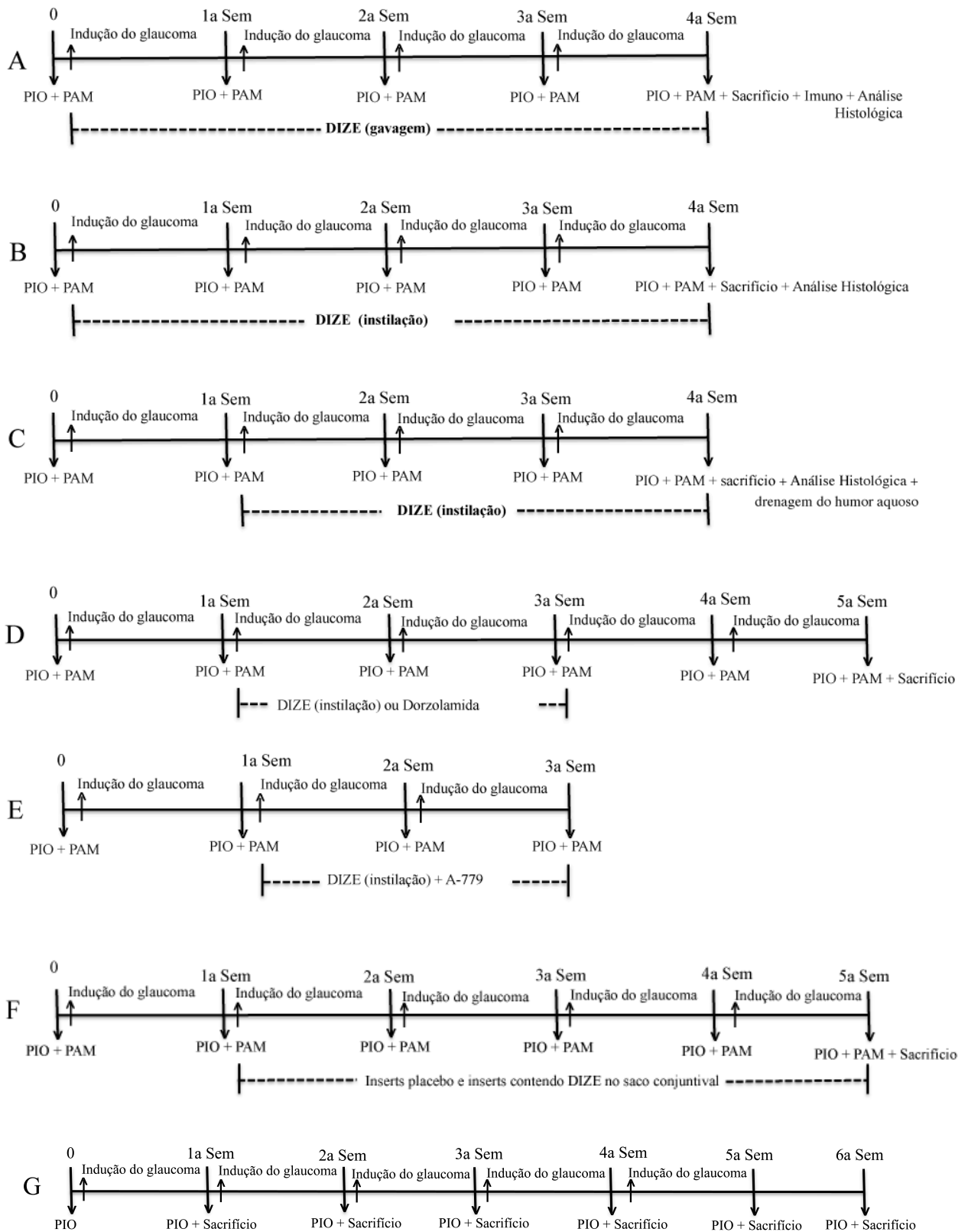


Fig. 10: Representação esquemática dos procedimentos experimentais. A) Protocolo preventivo e sistêmico. B) Protocolo preventivo e tópico. C) Protocolo de tratamento tópico. D) Efeitos do DIZE vs. Dorzolamida. E) Papel do receptor Mas. F) Protocolo de tratamento com o dispositivo de liberação controlada. G) Protocolo de sacrifício semanal.

G. Protocolo de sacrifício semanal (início e tipo do dano neuronal): indução do glaucoma unilateral no OD (n=4), uma vez por semana, durante 4 semanas. A mensuração da PIO foi realizada semanalmente, no dia anterior à indução seguinte. Após a 4^a semana, a PIO foi mensurada por mais duas semanas adicionais. A cada semana um grupo de animais foi sacrificado, para sabermos quando iniciava o dano neuronal, assim como para sabermos qual o tipo do dano neuronal, através da imunofluorescência.

4.6 Microscopia de luz

Após enucleação, foram retiradas duas pequenas calotas sagitais do bulbo do olho (uma nasal e outra temporal) para permitir melhor penetração do fixador (líquido de Bouin: formaldeído, ácido pícrico e ácido acético glacial) no interior do olho. Os olhos permaneceram imersos no fixador por aproximadamente 24 horas. A seguir, foram desidratados em série de etanol em concentração crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em paraplast. A microtomia do órgão incluído foi realizada em micrótomo da marca Microm, modelo HM335E, de forma semi-seriada (intervalo de 10 cortes de 6µm) até atingir as proximidades do disco óptico, quando então os cortes passaram a ser seriados, com a finalidade de analisar a escavação óptica. Para o estudo histológico de rotina e contagem das CGs da retina periférica e central, os cortes obtidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE). A contagem das CGs de toda a retina presente no corte histológico foi realizada diretamente no

microscópio de luz. Para estudo imunohistoquímico, os cortes seguiram o protocolo de rotina descrito a seguir.

4.7 Imunohistoquímica

Para avaliação da expressão da ECA2 na retina utilizamos a técnica da imunohistoquímica. Cortes histológicos com 6µm de espessura foram diafanizados e hidratados em álcool etílico 100, 95, 80, 70, 50 e 25%. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase com H₂O₂ a 3% por 15 minutos, prosseguindo com o bloqueio das ligações inespecíficas através da solução de BSA (2%) + Tween 20 (0,1%) por uma hora em câmara úmida. O anticorpo primário (anti-ECA2) (Gene Tex, CA, USA) foi diluído em uma solução de PBS + BSA 2% + Tween 20 a 0,1% para obter a concentração de 1:500 e a incubação ocorreu em câmara úmida durante toda a noite à temperatura de 4 °C. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por uma 1 hora. A amplificação do sinal foi realizada através da incubação com a streptavidina-biotina-peroxidase do *kit* LSAB/DAKO. A revelação foi realizada através do DAB 0,025% e a contra-coloração com a Hematoxilina de Harris. Após obtenção das imagens sob a objetiva de 40x, a expressão da ECA2 foi quantificada usando o software Image Pro-Plus. Para isso, 10 imagens da retina de cada animal foram obtidas sob as mesmas condições de luz e de contraste e os resultados foram expressos em percentual de área ocupada pelos *pixels* castanhos, que representavam a expressão da ECA2.

4.8 Imunofluorescência

Para avaliar a expressão da caspase-3 nas CGs, utilizamos a imunofluorescência. A preparação dos cortes histológicos foi realizada como descrito anteriormente para a técnica de imunohistoquímica. O bloqueio da peroxidase foi realizado utilizando H_2O_2 a 3%, durante 15 minutos, seguido pelo bloqueio de ligações inespecíficas utilizando uma solução de BSA a 2% contendo 0,1% de Tween 20, durante uma hora em câmara úmida. O anticorpo primário (anti-caspase-3, 1:500, Sigma, Mo, USA) foi diluído em solução de bloqueio e incubado durante a noite à 4 °C em câmara úmida. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488, Oregon, EUA) durante uma hora. Subsequentemente, os cortes foram corados com iodeto de propídio (1:50). As imagens foram analisadas usando o microscópio confocal (BX61 Olympus; laser em 488nm, objetiva de 10x, zoom digital de 2x) e capturadas pelo modo Kaplan (10 vezes; software FluoView).

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação ultra-estrutural da retina, após a enucleação e a retirada das calotas sagitais, os olhos foram imersos em uma solução de glutaraldeído 5% e formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (por 2 horas) à temperatura ambiente (25 °C) e agitação constante (Karnovsky, 1965).

Posteriormente à fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 10 minutos (cada vez) e posteriormente foram pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1 hora. A seguir, o material foi novamente lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 3 vezes durante 10 minutos (cada vez). O material foi desidratado em série de etanol em concentração crescente 70% e 90% uma vez, por 15 minutos e 100% por duas vezes de 15 minutos cada e, posteriormente, em óxido de propileno duas vezes por 15 minutos (cada vez). A seguir, o material foi submetido ao tratamento com óxido de propileno/resina Epon (2:1) por 3 horas, seguido de óxido de propileno/resina Epon (1:1) durante à noite, sendo que no dia seguinte foi colocado em resina pura por 2 horas, seguido de mais 2 horas em uma câmara de vácuo. Para polimerização, o material foi colocado em estufa a 60 °C por 48 horas. Os cortes semi-finos (espessura de 250 a 300nm) foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrótomo (Leica EM-UC6) e corados em solução aquosa de azul de toluidina + borato de sódio 1%. Os cortes ultra-finos (finos) também foram obtidos em um ultramicrótomo (Leica EM-UC6) utilizando navalhas de diamante onde foram coletados com espessura de 70 a 90nm em telas de cobre de 200 *mesh*. As telas com os cortes foram contrastadas em uma placa de Petri com solução aquosa de acetato de uranila saturada e citrato de chumbo por 10 minutos. Após este procedimento, as telas foram lavadas em água destilada e colocadas em estufa a 37 °C para secagem. A análise dos cortes foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit - FEI.

4.10 Cintilografia

Para avaliar a drenagem do humor aquoso, imagens cintilográficas dos animais foram obtidas utilizando uma câmara gama. Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina (70 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e com duas gotas de cloridrato de benoxinato 0,4% que foram instiladas na córnea como um anestésico local. Posteriormente, os animais foram colocados em decúbito lateral sobre a câmara gama equipada com um colimador de baixa energia (TM Nuclide Th22) e alíquotas de 50 µL contendo 3,7 MBq de solução estéril de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) foram injetados na câmara anterior dos olhos. As imagens estáticas planares, expostas durante 5 minutos usando uma matriz de 256 X 256 *pixels*, foram adquiridas a cada 30 minutos, durante 3 horas. A análise quantitativa das imagens foi realizada na região de interesse (ROI da tiróide, olho e estômago) através da contagem total de radioatividade, tal como foi previamente descrito por (Diniz et al., 2008).

4.11 Desenvolvimento dos *inserts* poliméricos de quitosana

Os *inserts* de quitosana foram preparados utilizando o método de solubilização e evaporação de solvente descrito por Fulgêncio e colaboradores (2012). De acordo com esse método, uma dispersão do polímero é seca em uma superfície lisa e a formação do filme polimérico é espontânea. Foram preparados *inserts* placebo de quitosana (PI) e *inserts* de quitosana contendo DIZE (DI) na forma de filmes monocamadas.

4.11.1 Preparo dos *inserts* placebo de quitosana

Os *inserts* placebo de quitosana (PI) foram preparados pela adição de 5% m/v de quitosana a uma solução contendo ácido acético 1,5% v/v em água milliQ. A dispersão foi agitada em agitador magnético, à temperatura ambiente, por 24 horas para a obtenção de um gel espesso. Esse gel foi espalhado sobre uma placa siliconada perfurada e seco por 24 horas, à temperatura ambiente, para a obtenção dos *inserts*.

4.11.2 Preparo dos *inserts* de quitosana carreando DIZE

Para a obtenção dos *inserts* de quitosana carreando DIZE (DI), preparou-se uma solução contendo 4 mg/mL de DIZE em ácido acético 1,5 %. Foi adicionado a esta solução quitosana na concentração de 5% m/v. A dispersão obtida foi agitada por 24 horas em agitador magnético para a obtenção de um gel viscoso contendo o fármaco. Esse gel foi espalhado em uma placa siliconada perfurada para secagem por cerca de 24 horas, à temperatura ambiente, para a obtenção dos DI.

4.12 Caracterização dos *inserts* poliméricos de quitosana

A fim de analisar as características físicas e químicas dos *inserts* obtidos, os filmes secos sob a forma de dispositivos circulares de 5 mm de diâmetro foram

utilizados para avaliação dos seguintes parâmetros: porcentagem de hidratação, espectro na região do infravermelho, termogramas com curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG), teor de fármaco, potencial de liberação do fármaco incorporado e perfil de liberação *in vitro*.

4.12.1 Porcentagem de hidratação

A propriedade de intumescimento dos *inserts* foi avaliada pela determinação da porcentagem de hidratação. Para isso, foi utilizado o método descrito por Eroglu e colaboradores (2007) segundo o qual a capacidade de hidratação dos dispositivos é determinada pela diferença de peso antes e depois de serem imersos em tampão fosfato básico salino (PBS) pH 7,4. Seis amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$. Posteriormente, cada amostra foi imersa em 2 mL de PBS. O tempo de imersão foi de 5, 10, 20, 40, 60, 90 min para a primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta amostras, respectivamente. Após imersão durante o tempo determinado, as amostras foram removidas do meio e pesadas depois de o excesso de água ser retirado da superfície usando um papel filtro (aproximadamente três minutos). A porcentagem de hidratação foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{hidratação} = \left[\frac{x_t - x_0}{x_0} \right] \times 100$$

onde x_t é o peso do *insert* intumescido após o tempo t e x_0 é o peso original do *insert* no tempo zero. Esse experimento foi realizado em triplicata.

4.12.2 Espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (ATR-FTIR)

A espectrometria de absorção na região do infravermelho identifica as estruturas moleculares presentes nas substâncias, baseando nas bandas de absorção característica no espectro de absorção na região do infravermelho. Essa técnica é comumente usada para avaliar possíveis reações entre a quitosana e as substâncias a ela associada (Koev et al., 2010). O polímero (quitosana), os *inserts* placebo e os *inserts* carreando DIZE foram analisados por espectrometria na região do infravermelho para avaliação e caracterização das alterações moleculares decorrentes do processo de produção do *insert*, bem como para a avaliação da capacidade dos *inserts* de incorporar o fármaco. Para a análise dos materiais, os *inserts* foram finamente cortados com lâmina de bisturi e, os pedaços obtidos, bem como o polímero e o fármaco sozinhos foram avaliados diretamente em espectrômetro PerkinElmer FTIR, Modelo Spectrum One (Estados Unidos).

4.12.3 Análise térmica

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que mede a variação na diferença de fluxo de calor de uma amostra e de uma referência enquanto elas são submetidas a um programa de temperatura controlada (Höhne et al., 2003). DSC é um método empregado para determinar possíveis modificações estruturais das moléculas de uma substância quando a ela se

associa outras substâncias. Assim, as propriedades térmicas da matriz dos *inserts* placebo, do fármaco, bem como dos *inserts* carreando o fármaco foram caracterizadas através de um DSC50 da Shimadzu. Nitrogênio à taxa de 20 mL/min foi utilizado como gás de purga. Os espécimes foram acondicionados e aquecidos de -50 a 200 °C (1ª corrida) à taxa de aquecimento de 10 °C/min sob uma atmosfera de nitrogênio para eliminação de água. Em seguida, os espécimes foram reaquecidos a 350 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min (2ª corrida) para avaliação da estabilidade térmica do material. Paralelamente, foi avaliada a perda de massa do material por TG. Para tanto, amostras foram acuradamente pesadas e aquecidas até 800 °C para determinação de perda de massa do material.

4.12.4 Teor de fármaco no dispositivo

O teor médio de fármaco no dispositivo foi avaliado pela imersão de um *pool* de 10 *inserts* aleatoriamente selecionados em um mililitro de ácido acético glacial. Após trinta minutos de imersão, o volume da solução foi completado para 10 mL com água Mili-Q e o material foi reservado por 24 horas para completa destruição do *insert*. Três alíquotas da dispersão obtida foram, então, devidamente filtradas, diluídas e quantificadas para a avaliação do teor médio de fármaco no dispositivo. Esse procedimento de imersão prévia em ácido foi adotado porque foi observado na prática que os *inserts* não se dissolviam quando eram imersos diretamente na solução de ácido acético diluído (contendo 1,5; 5 ou 10% v/v de ácido acético). Para os *inserts* carreando DIZE, trinta minutos após a imersão em ácido, foram

adicionados cerca de 7 mL de água Mili-Q. A seguir, adicionou-se 1 mL de solução de NaOH 10% m/V e completou-se o volume para 10 mL com água Mili-Q. Todas as dispersões obtidas foram filtradas antes da quantificação do fármaco.

4.12.5 Perfil de liberação *in vitro*

A célula de difusão de Franz possui um pequeno compartimento doador e um compartimento receptor maior que contém um líquido receptor em constante agitação, separados por uma membrana cilíndrica (Friend, 1992). A capacidade dos *inserts* de liberar o fármaco de forma prolongada (perfil de liberação *in vitro*) foi avaliada por teste de liberação nesta célula de difusão. Para esse experimento, foi utilizado um sistema de célula de Franz com banho a 37 °C. Para a seleção da membrana, adicionou-se uma quantidade conhecida de fármaco na forma de colírio na porção superior do sistema e coletou-se o líquido após uma, duas e quatro horas de incubação. Após ter sido observado que a membrana de acetato de celulose 0,45 µm permitia a passagem de pelo menos cerca de 60% do fármaco em duas horas, essa membrana foi selecionada como meio de difusão. PBS foi utilizado como líquido receptor em todos os experimentos.

4.13 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. Os resultados referentes aos efeitos do DIZE na PIO, assim como a análise quantitativa das CGs e da expressão da ECA2, foram analisados utilizando o teste One-way

ANOVA seguido do pós teste de Newman-Keuls. Os resultados da PAM e da drenagem do humor aquoso foram analisados utilizando o teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. Todos estes testes foram realizados no programa GraphPad Prism 5. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Identificação das camadas da retina

Todas as camadas da retina, com exceção do seu epitélio pigmentado que frequentemente se separa da retina neural e permanece aderido à membrana de Bruch, estão representadas na fotomicrografia abaixo (**Fig. 11**).

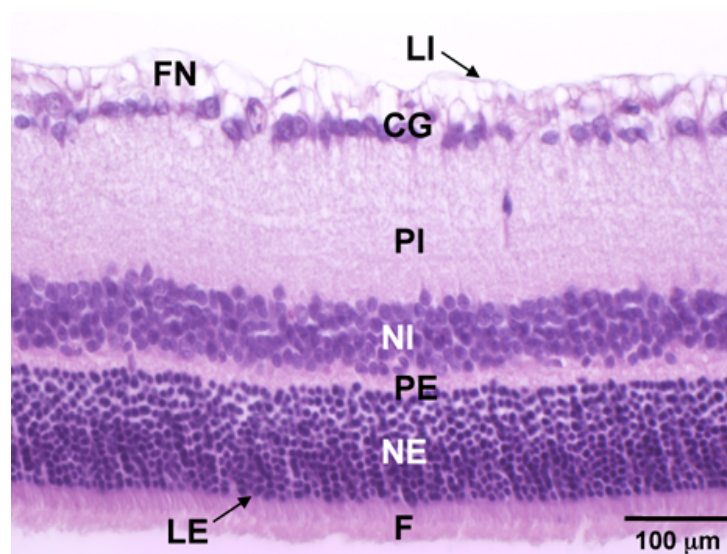


Fig. 11: Fotomicrografia da retina de rato Wistar normal. Camada dos fotorreceptores (F), camada limitante externa (LE), camada nuclear externa (NE), camada plexiforme externa (PE), camada nuclear interna (NI), camada plexiforme interna (PI), camada de células ganglionares (CG), camada das fibras nervosas (FN) e camada limitante interna (LI). HE.

5.2 Mensuração da PIO basal

A medida da PIO basal de ratos normais, mensurada uma vez por semana durante 4 semanas, revelou os respectivos valores para os olhos direito e esquerdo: $10,1 \pm 0,66$ mmHg e $9,8 \pm 0,27$ mmHg (**Fig. 12**).

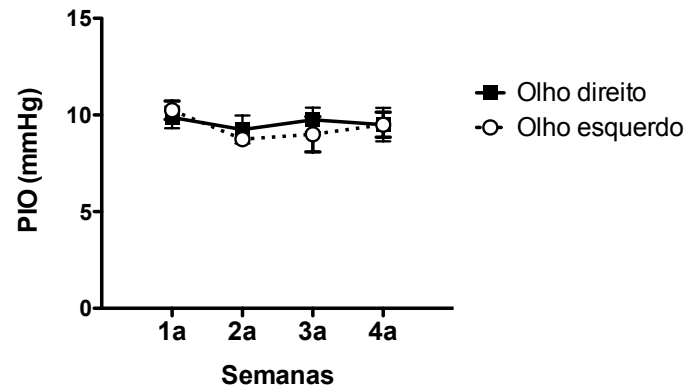


Fig. 12: Acompanhamento da PIO em ratos Wistar normais para determinação dos valores basais.

5.3 Expressão da ECA2 na retina

A ECA2 é expressa de maneira uniforme nas camadas da retina de ratos normais e glaucomatosos (**Fig. 13A**). A administração do DIZE diariamente, por 4 semanas, foi capaz de aumentar a expressão da ECA2 na camada dos segmentos internos dos fotorreceptores, nas camadas plexiformes externa e interna, na camada das CGs e na camada das fibras nervosas, como pode ser observado nas fotomicrografias de retinas dos animais que receberam tratamento, ou seja, CT (controle tratado) e GT (glaucoma tratado) quando comparado com os animais que não receberam o tratamento CNT (controle não tratado) e GNT (glaucoma não tratado) (**Fig. 13A**). Esse resultado também pode ser visto na **Fig. 13B** que mostra a quantificação da expressão da ECA2 em percentual de área (**Fig. 13B**), cujos valores foram significativamente maiores nos animais tratados, $33,0 \pm 9,6$ % no grupo CT e $33,5 \pm 6,6$ % no grupo GT vs. $20,2 \pm 6,7$ % no grupo CNT e $19,78 \pm 6,7$ % no grupo GNT.

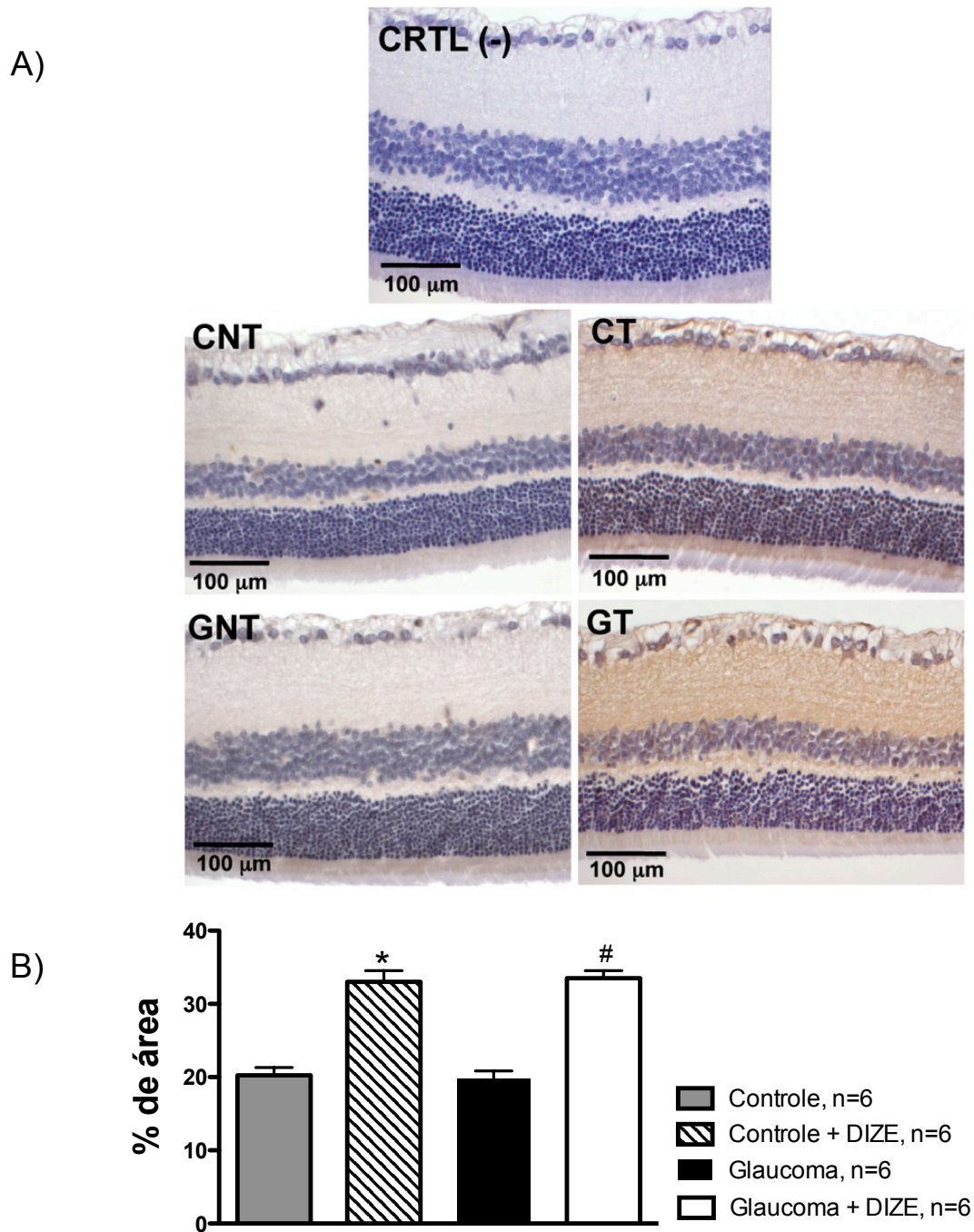


Fig. 13: (A) Fotomicrografias representativas de retinas de ratos Wistar mostrando o aumento da expressão da ECA2 detectada pela imunohistoquímica nos animais tratados com DIZE (CT e GT) em relação aos animais não tratados (CNT e GNT). CRTL (-): controle negativo da imunohistoquímica. (B) Quantificação da expressão da ECA2 no olho. A expressão desta enzima está aumentada nos animais que foram tratados com o DIZE. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento.

5.4 Efeitos da administração sistêmica do DIZE na prevenção da elevação da PIO

A administração diária e sistêmica (através de gavagem) do DIZE iniciou juntamente com a primeira indução do glaucoma e perdurou por 4 semanas. A **Fig. 14** mostra os valores da PIO em todos os grupos de animais e semanas. Observa-se que a PIO do grupo GNT foi significativamente maior que todos os outros grupos nas 4 semanas do protocolo. O tratamento dos animais glaucomatosos com o DIZE significativamente preveniu a elevação da PIO nesses animais durante as 4 semanas de tratamento (GNT: $27,9 \pm 7,0$ mmHg; GT: $11,2 \pm 4,6$ mmHg e GNT: $35,8 \pm 12,6$ mmHg; GT: $15,6 \pm 6,6$ mmHg – valores da primeira e quarta semanas, respectivamente), indicando que a administração do DIZE impediu o aumento da PIO. O tratamento com o DIZE não interferiu na PAM (**Fig. 15**).

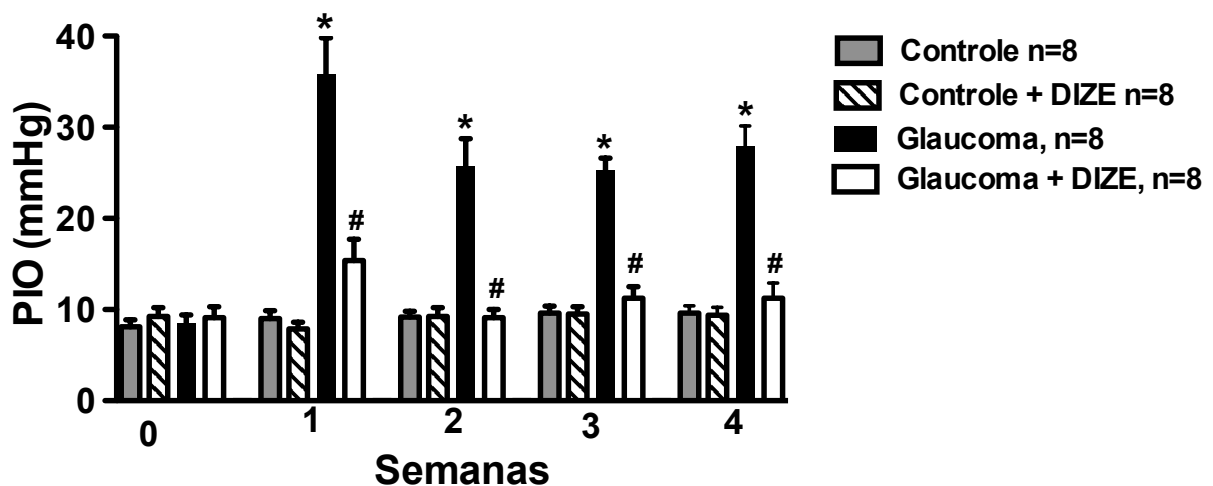


Fig. 14: PIO durante a administração sistêmica (via gavagem) do DIZE. Observar que o DIZE foi capaz de impedir o aumento da PIO. (*) $p < 0,05$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,05$ vs. glaucoma sem tratamento.

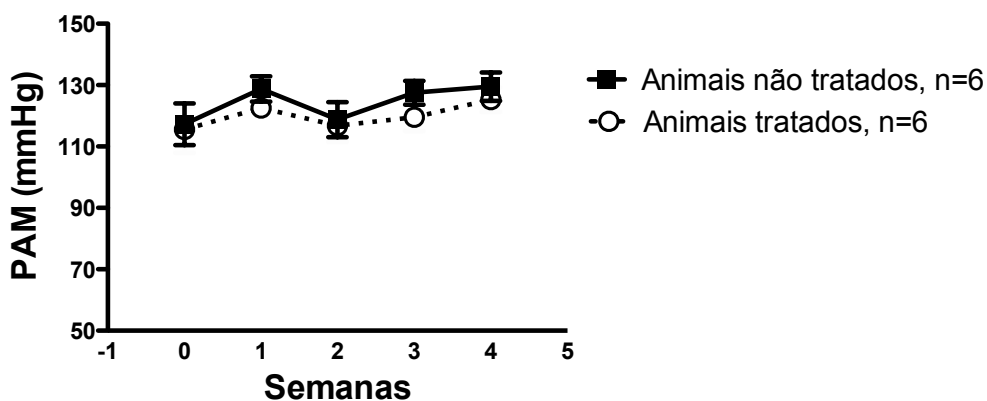


Fig. 15: PAM durante a administração sistêmica (via gavagem) do DIZE. Observar que o DIZE não interferiu na PAM.

5.5 Efeitos da administração tópica do DIZE na prevenção da elevação da PIO

Após verificarmos que o DIZE foi capaz de impedir o aumento da PIO com a administração sistêmica desta droga, resolvemos elaborar um colírio contendo solução salina e DIZE, com concentração equivalente à utilizada na abordagem sistêmica, porém com um volume de aproximadamente 10% da dose utilizada na gavagem. A administração diária e tópica (através de instilação) do DIZE iniciou com a primeira indução do glaucoma e perdurou por 4 semanas. A **Fig. 16** mostra os valores da PIO em todos os grupos e semanas sendo possível observar que, de forma semelhante à abordagem sistêmica, a PIO do grupo GT ($8,7 \pm 1,1$ mmHg – quarta semana) foi menor que a do grupo GNT ($27,1 \pm 5,0$ mmHg), indicando que a aplicação tópica do DIZE também se mostrou capaz de impedir o aumento da PIO sem interferir na PAM, como pode ser visto na **Fig. 17**.

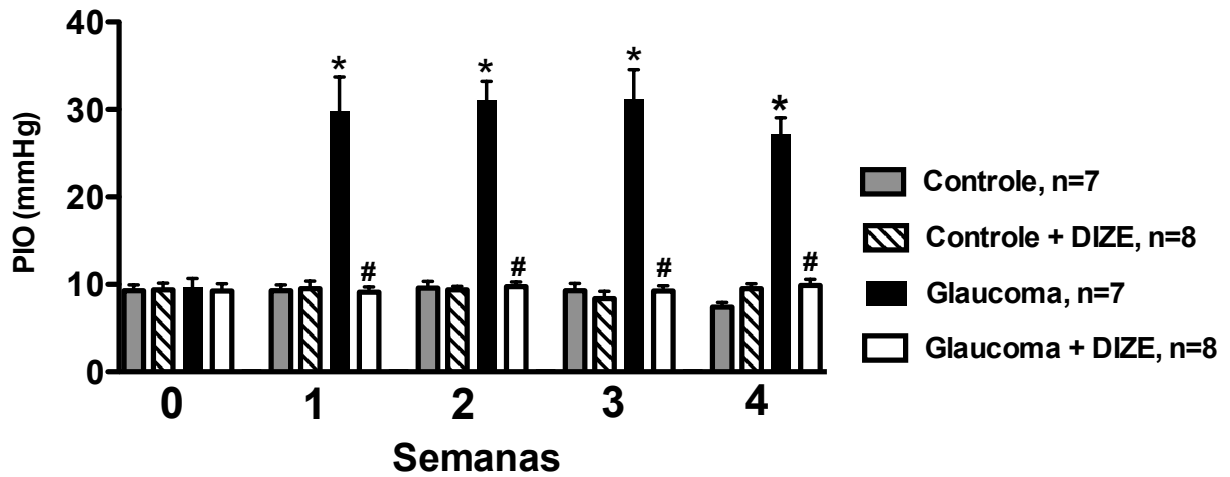


Fig. 16: PIO durante a administração tópica (via instilação) do DIZE. Observar que o DIZE foi capaz de impedir o aumento da PIO. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento.

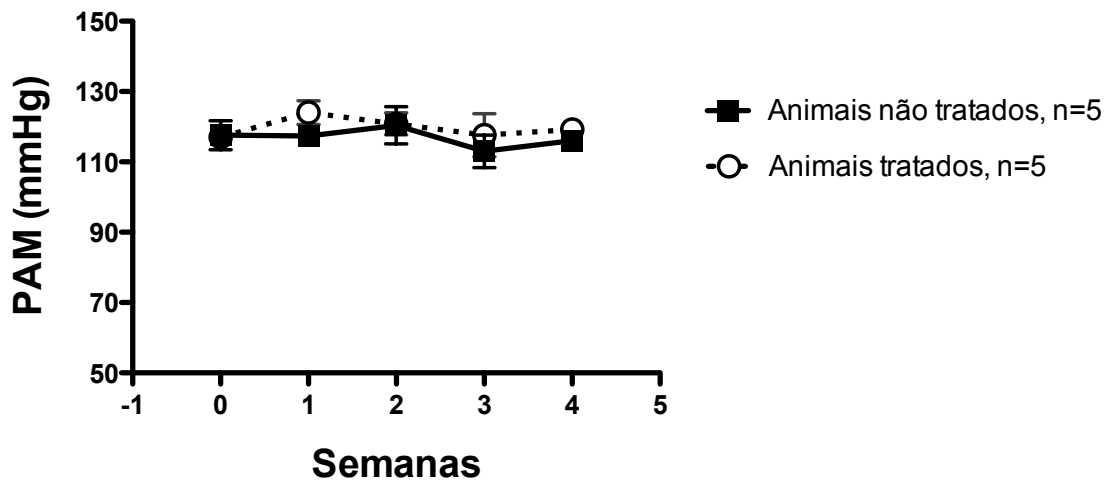


Fig. 17: PAM durante o período de administração tópica (via instilação) do DIZE. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.6 Efeitos da administração tópica do DIZE no tratamento do glaucoma

Em seguida, decidimos analisar se o DIZE também seria capaz de reduzir a PIO. Para isso, o tratamento com o composto iniciou depois da confirmação da PIO elevada. A **Fig. 18** mostra que mesmo depois de estabelecida a hipertensão ocular, o DIZE foi capaz de reduzir a PIO do grupo GT ($36,5 \pm 1,7$ mmHg antes do tratamento vs. $11,0 \pm 0,5$ mmHg depois do início do tratamento) retornando aos valores basais, enquanto que a PIO do grupo GNT se manteve elevada durante todo o período experimental. O DIZE, mais uma vez, não interferiu na PAM (**Fig. 19**).

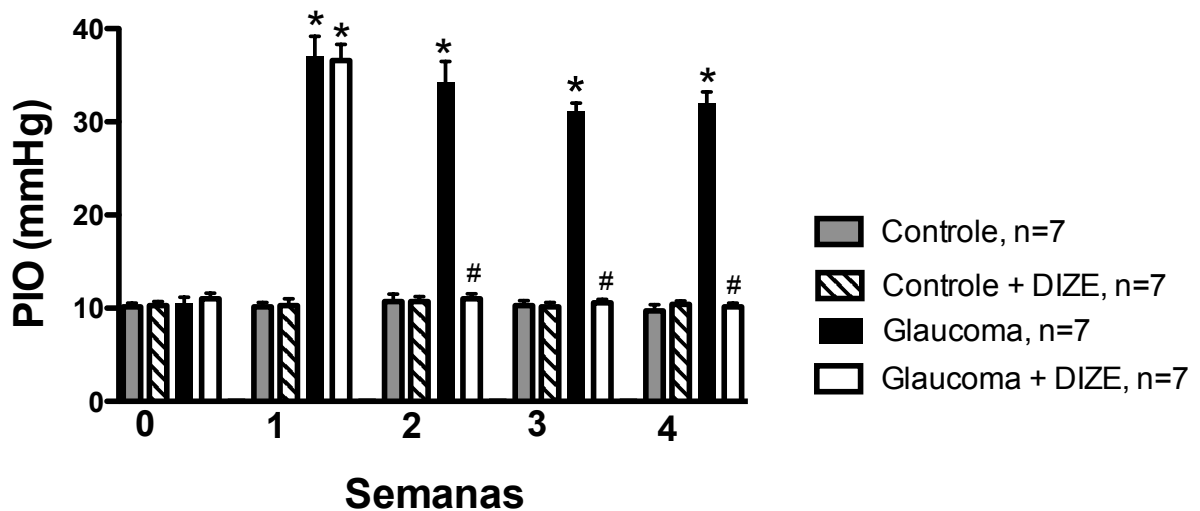


Fig. 18: PIO durante o tratamento tópico (via instilação) do DIZE. Observar que o DIZE foi capaz de reduzir a PIO no grupo GT. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento.

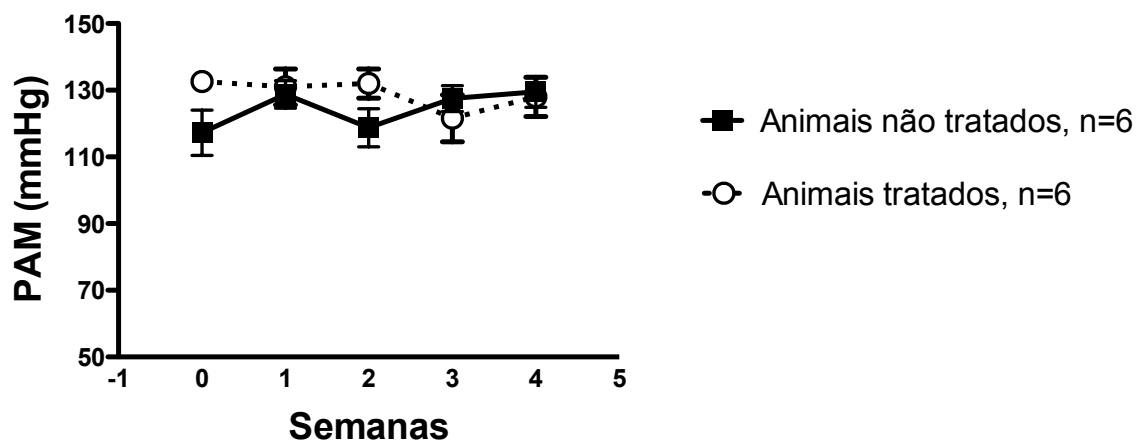


Fig. 19: PAM durante o tratamento tópico (via instilação) do DIZE. Observar que o DIZE não interferiu na PAM.

5.7 Papel do Mas no efeito hipotensor ocular do DIZE

Simultaneamente ao início do tratamento com o DIZE (após a 1^a semana), minibombas osmóticas contendo o antagonista do receptor Mas (A-779) foram implantadas na região subcutânea dorsal dos ratos. A **Fig. 20** mostra que o A-779 foi capaz de bloquear completamente o efeito hipotensor do DIZE sobre a PIO, uma vez que o grupo GT+A-779 não foi estatisticamente diferente do grupo GNT ($31,8 \pm 3,9$ mmHg vs. $28,6 \pm 3,5$ mmHg, respectivamente), mas mostrou diferença significativa quando comparado do grupo GT ($9,0 \pm 1,4$ mmHg).



Fig. 20: PIO durante o tratamento tópico (via instilação) com o DIZE de ratos Wistar tratados com o antagonista do Mas A-779. Notar que o A-779 bloqueou completamente os efeitos do DIZE. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento e sem bloqueio e glaucoma tratado com o DIZE e com o A-779.

5.8 Efeitos da administração tópica do DIZE na neuroproteção

A análise histológica da retina, próximo ao disco do nervo óptico, evidenciou acentuada escavação da cabeça do nervo óptico nos animais do grupo GNT (**Fig. 21**). Além disso, as fotomicrografias de secções do nervo óptico da **Fig. 22** também revelaram grande redução das fibras neurais no grupo GNT. Todos estes efeitos foram abolidos pelo tratamento com o ativador da ECA2. A análise histológica (**Fig. 23A**) e quantitativa das CGs (**Fig. 23B**) revelou uma redução no número de CGs nos animais glaucomatosos que não foram submetidos ao tratamento (GNT: $40,9 \pm 24,7$ células), sendo que a administração do DIZE impediu a morte das CGs nos animais glaucomatosos ($629 \pm 23,4$ células).

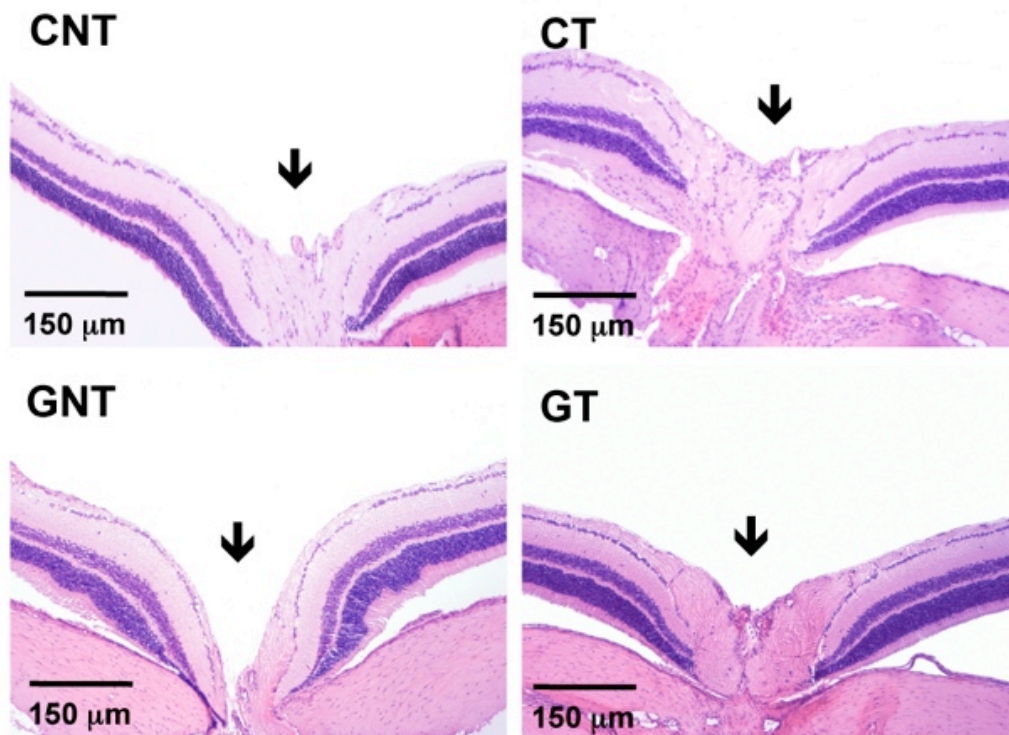


Fig. 21: Fotomicrografias representativas do disco do nervo óptico de ratos Wistar mostrando o aumento da escavação no grupo GNT; o tratamento com DIZE (GT) preveniu este dano histológico. HE

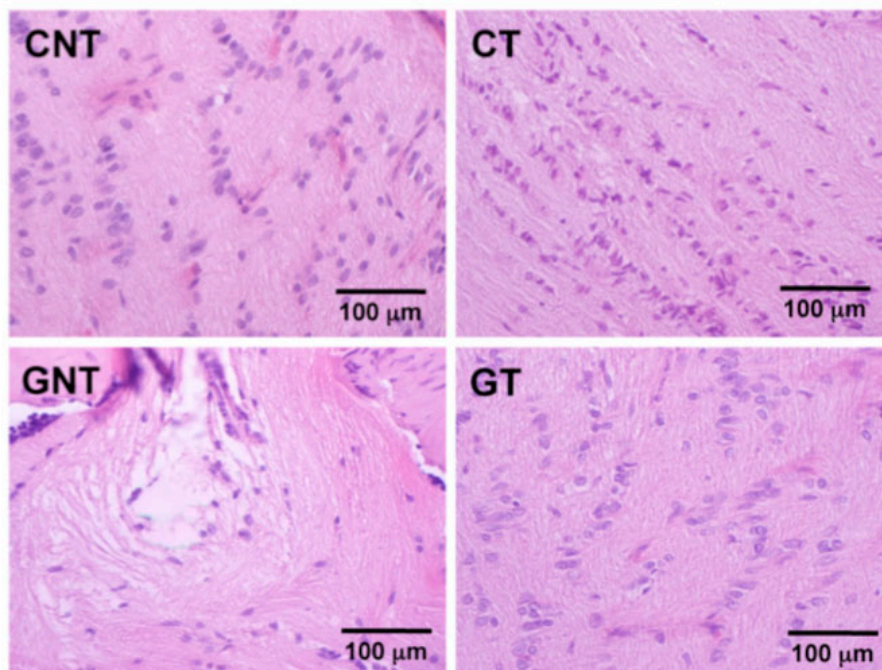
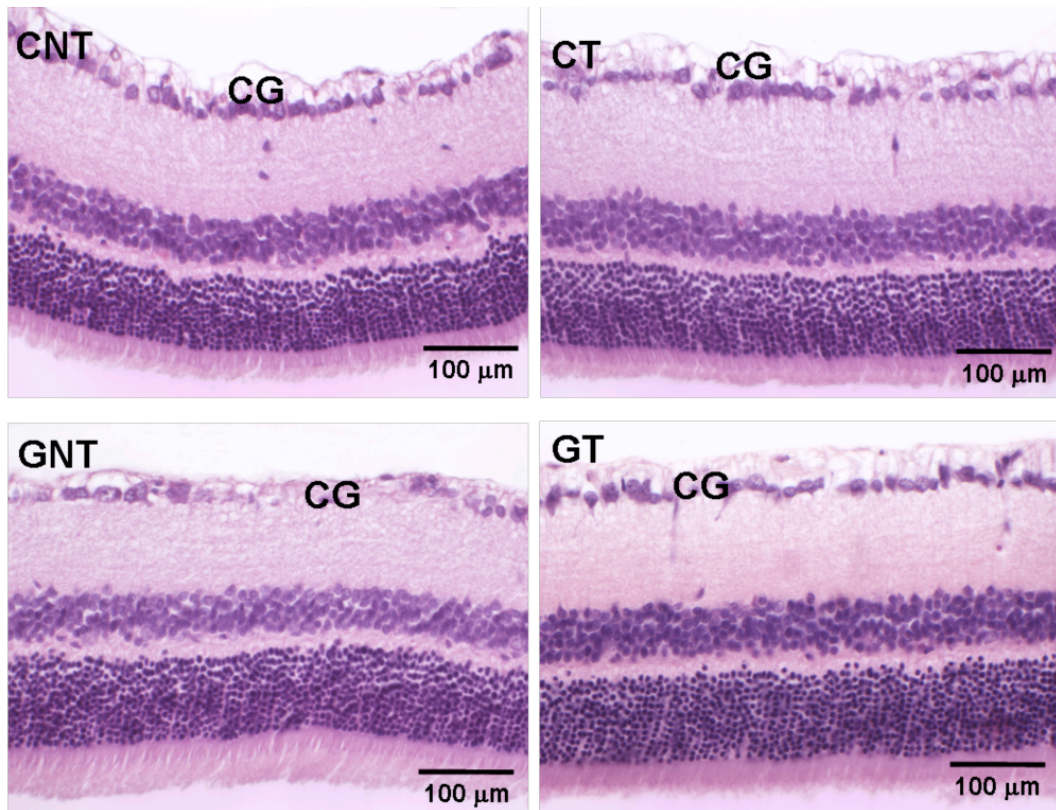


Fig. 22: Fotomicrografias representativas de secções ligeiramente oblíquas do nervo óptico de ratos Wistar dos 4 grupos experimentais. HE. Notar que o nervo óptico do grupo com glaucoma que não recebeu tratamento com DIZE (GNT) apresenta acentuada perda de fibras neurais. Este efeito não foi observado nos animais tratados com o DIZE (GT).

A)



B)

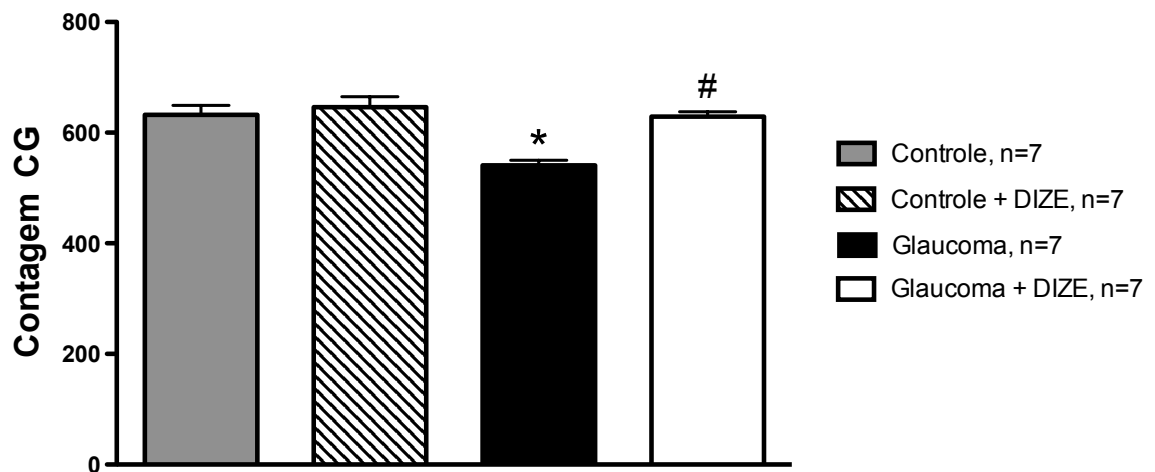


Fig. 23: A) Fotomicrografias representativas de retina de ratos Wistar coradas em HE. Observar o número de CGs nos diferentes grupos. B) quantificação das CGs da retina, indicando que a administração do DIZE impediu a morte destas células. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento.

Análise ultraestrutural na camada das CGs e na camada das fibras neurais dos animais com glaucoma que não receberam o DIZE, como pode ser visto na **Fig. 24**, revelaram fibras amielínicas de diferentes diâmetros parcialmente envolvidas pelos prolongamentos das células de Muller, sendo possível observar fibras em diferentes estágios de alterações das estruturas axoplasmáticas, além da presença de corpos multilamelares (**Fig. 24C**).

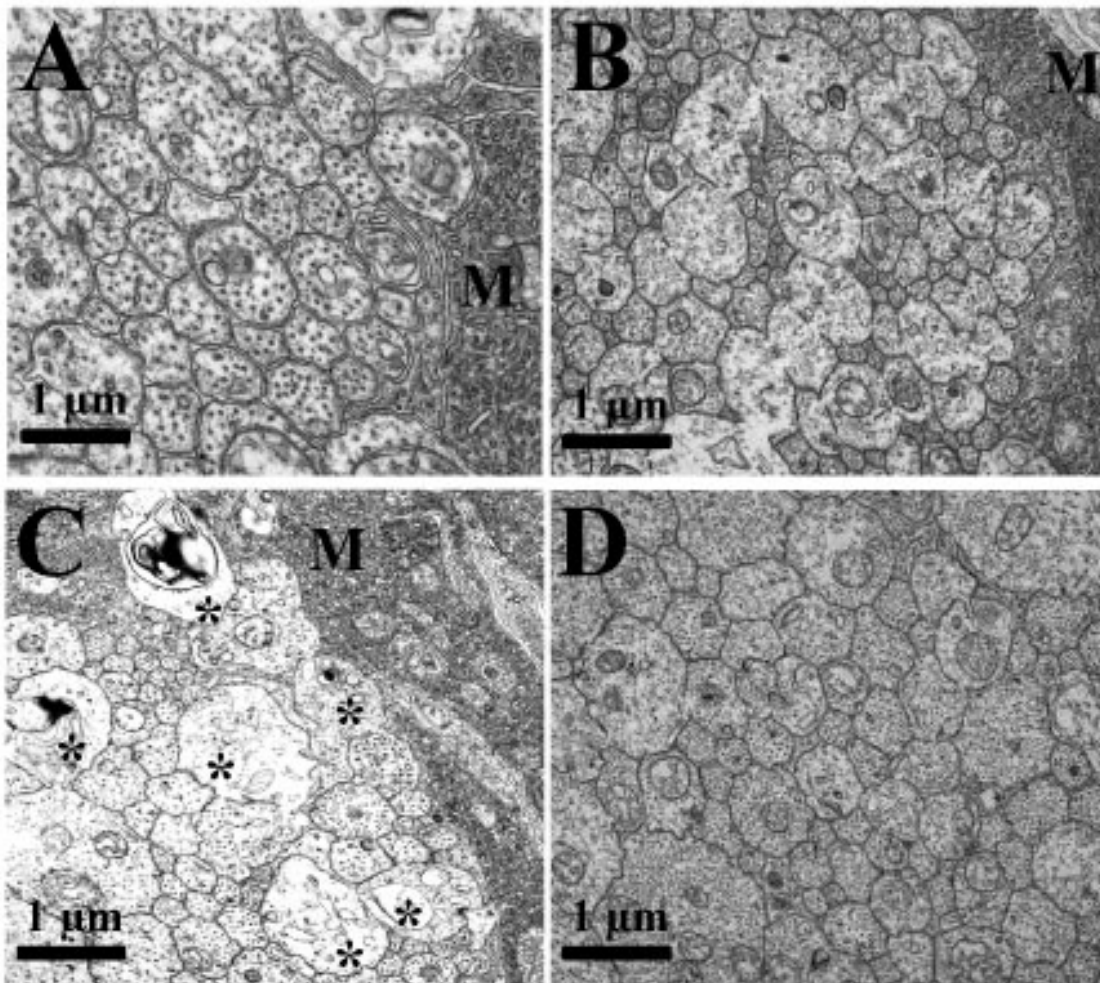


Fig. 24: Micrografia eletrônica da camada das fibras neurais da retina de rato Wistar. Observar os diferentes diâmetros das fibras amielínicas, envolvidas parcialmente por prolongamentos de células de Müller (M). Em A, CNT; B, CT; C, GNT; D, GT. Verificar em C várias fibras em diferentes estágios de alterações das estruturas axoplasmáticas (*).

Para sabermos em que momento iniciava esta redução no número das CGs, fizemos um experimento de 6 semanas onde a cada semana um grupo de animais era sacrificado para análise das CGs. A **Fig. 25** mostra a PIO dos animais durante as 4 semanas de indução do glaucoma seguidas de 2 semanas adicionais sem indução. É possível observar que depois do período de indução do glaucoma, a PIO diminuiu, mas ainda permaneceu elevada comparada com os animais controles. A contagem semanal das CGs (**Fig. 26**) mostrou que a partir da 2ª semana há uma redução progressiva no número de CGs. Esta redução no número de CGs não foi reversível, uma vez que a interrupção da indução do glaucoma não estabilizou, e menos ainda, reverteu a morte das CGs.

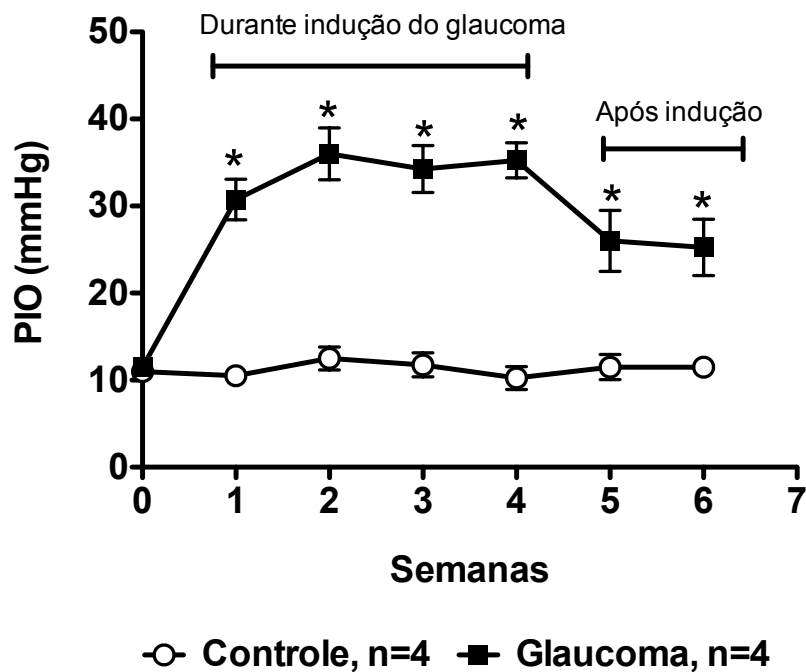


Fig.25: PIO durante 4 semanas de indução do glaucoma seguidas de 2 semanas adicionais. Observar que a PIO dos animais induzidos foi significativamente diferente em todas as semanas, mesmo após o período de indução. * $p < 0.05$ vs. controle.

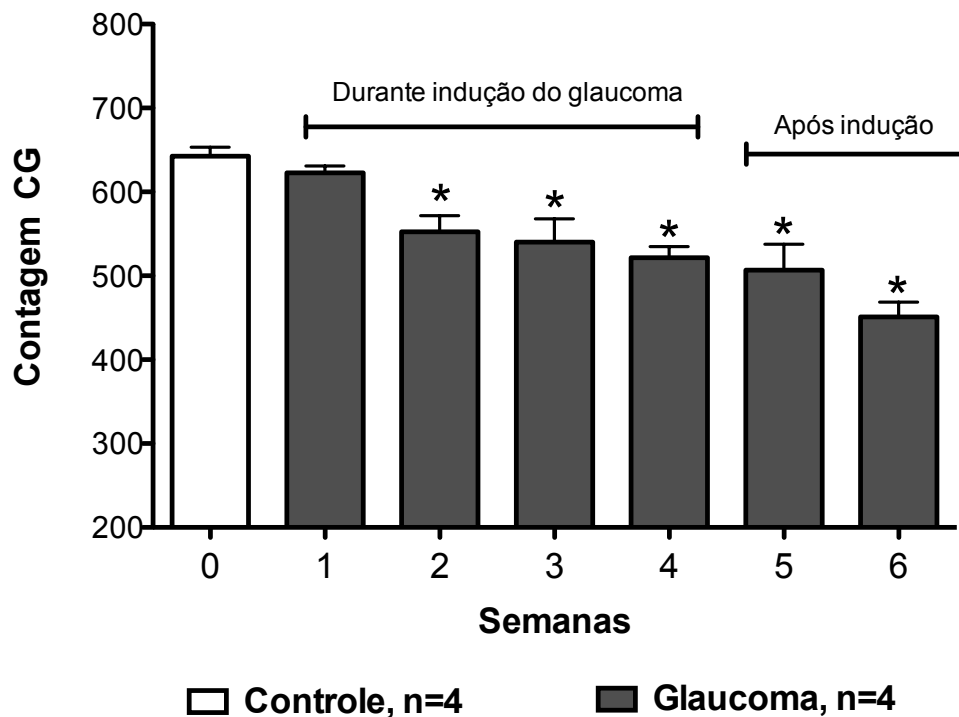


Fig. 26: Contagem das CGs durante 4 semanas de indução do glaucoma seguidas de 2 semanas adicionais. Observar a redução significativa no número destas células a partir da 2ª semana. Notar ainda que, mesmo após o período de indução do glaucoma, estas células continuam em processo de morte. * $p < 0.05$ vs. controle.

Os resultados da imunofluorescência mostraram um aumento acentuado na expressão da caspase-3 na camada das GCs do grupo GNT em comparação com os animais do grupo controle, o qual foi impedido pelo tratamento com o DIZE (**Fig. 27**). A **Fig. 28** mostra a expressão semanal da caspase-3 nos animais com glaucoma induzido, onde também é possível observar aumento desta expressão a partir da 2ª semana. Estes dados sugerem que os mecanismos subjacentes aos efeitos antiglaucomatosos mediados pelo DIZE podem ser, em parte, decorrentes da redução da morte celular por apoptose.

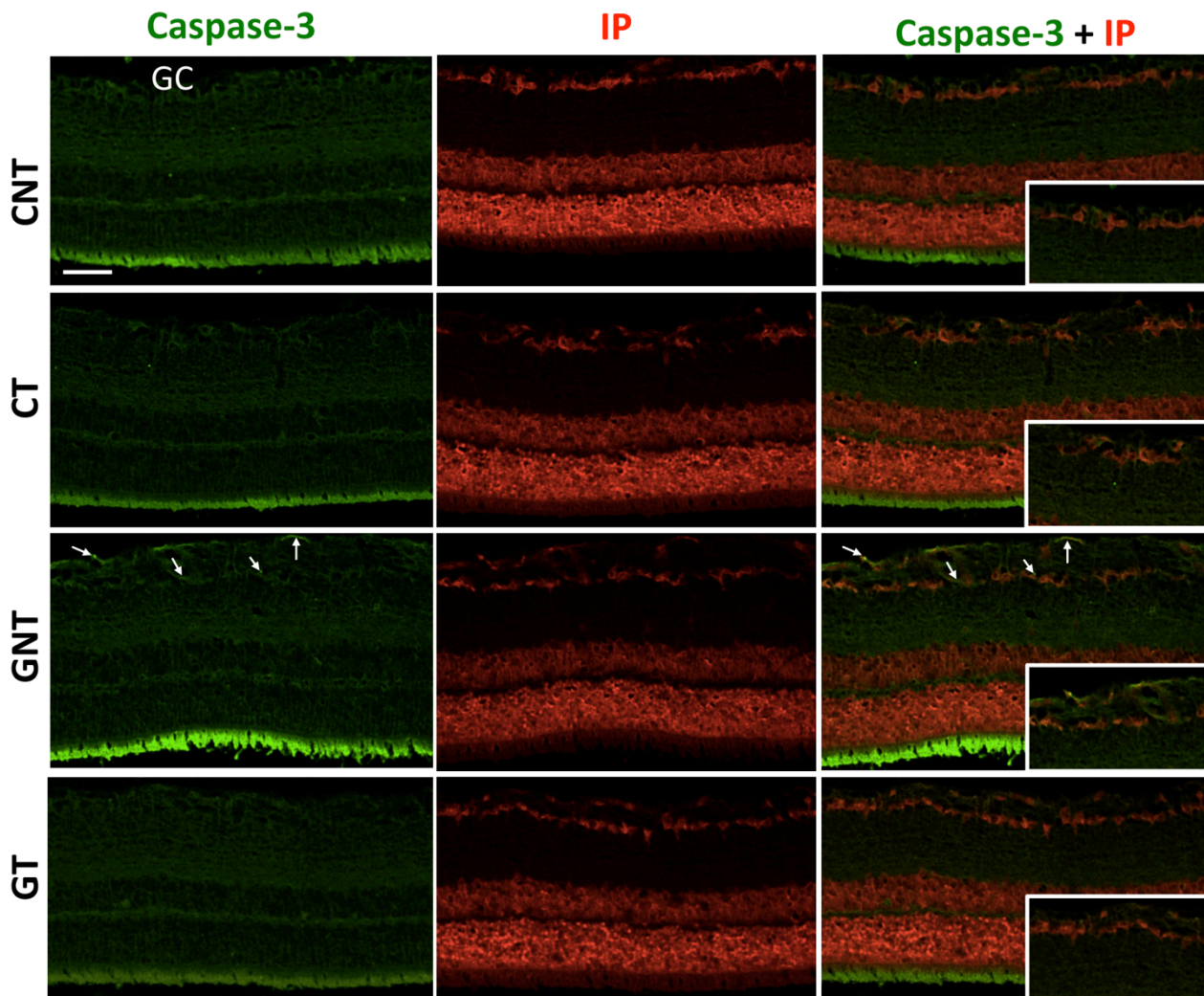


Fig. 27: Imunofluorescência da retina de rato Wistar mostrando a expressão da caspase-3 nas GCs. Notar a expressão aumentada da caspase-3 nos animais com glaucoma não tratados, GNT (setas). O tratamento com o ativador da ECA2 (grupo GT) impediu a apoptose das CGs. Barra=50 μ m.

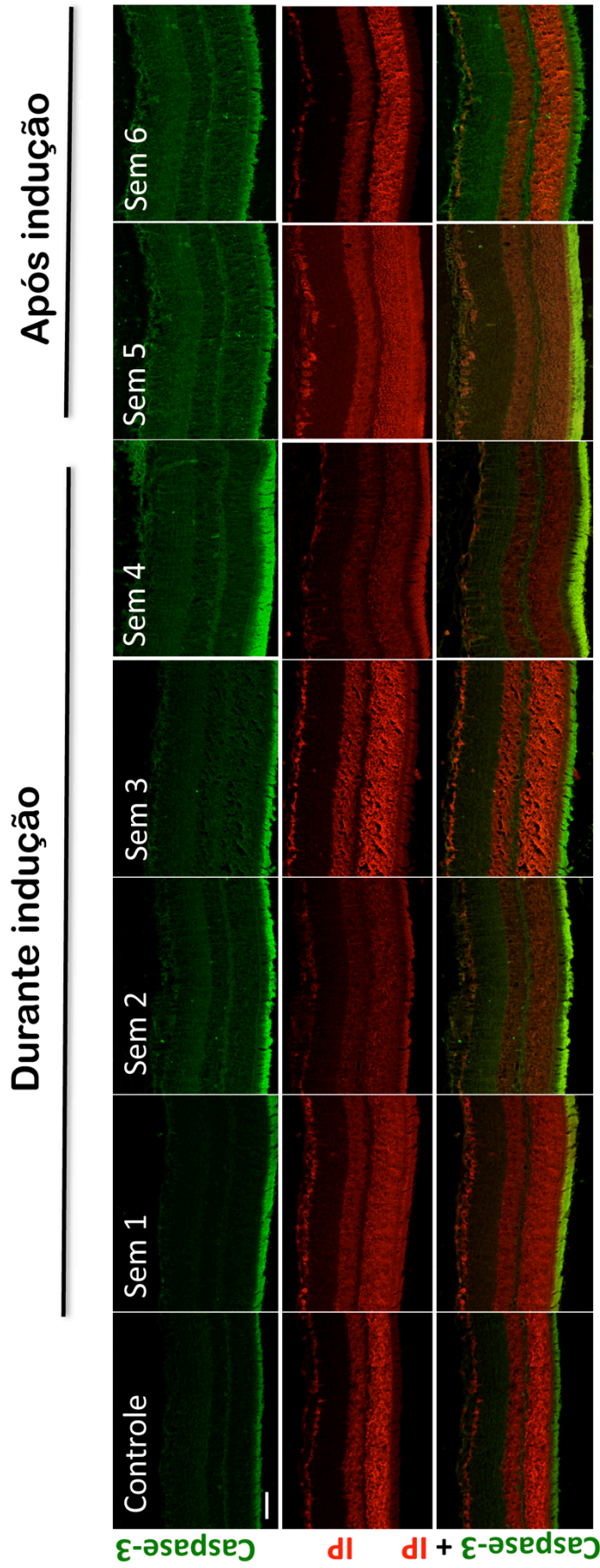


Fig. 28: Imunofluorescência mostrando a expressão da caspase-3 na camada das CGs durante as 4 semanas de indução do glaucoma, seguida por mais duas semanas sem indução. Observar aumento da expressão da caspase-3, a partir da segunda semana. PI: iodeto de propídio. Barra=50 μ m.

5.9 Efeitos do DIZE vs. Dorzolamida sobre a PIO

Neste protocolo, o tratamento com DIZE ou Dorzolamida (antiglaucomatoso comercialmente disponível) iniciou após a 1ª semana e teve duração de 15 dias. Após a interrupção do tratamento, acompanhamos a PIO por mais 15 dias. Ambas as drogas reduziram a PIO na mesma magnitude (DIZE: $11,6 \pm 2,0$ mmHg e Dorzolamida: $9,2 \pm 0,8$ mmHg na terceira semana) (**Fig. 29**). Além disso, após a interrupção dos tratamentos (DIZE e Dorzolamida), a PIO aumentou significativamente atingindo os níveis observados antes do início dos tratamentos (semana 1): $31,0 \pm 4,6$ mmHg vs. $29,4 \pm 5,5$ mmHg para DIZE e Dorzolamida, respectivamente.

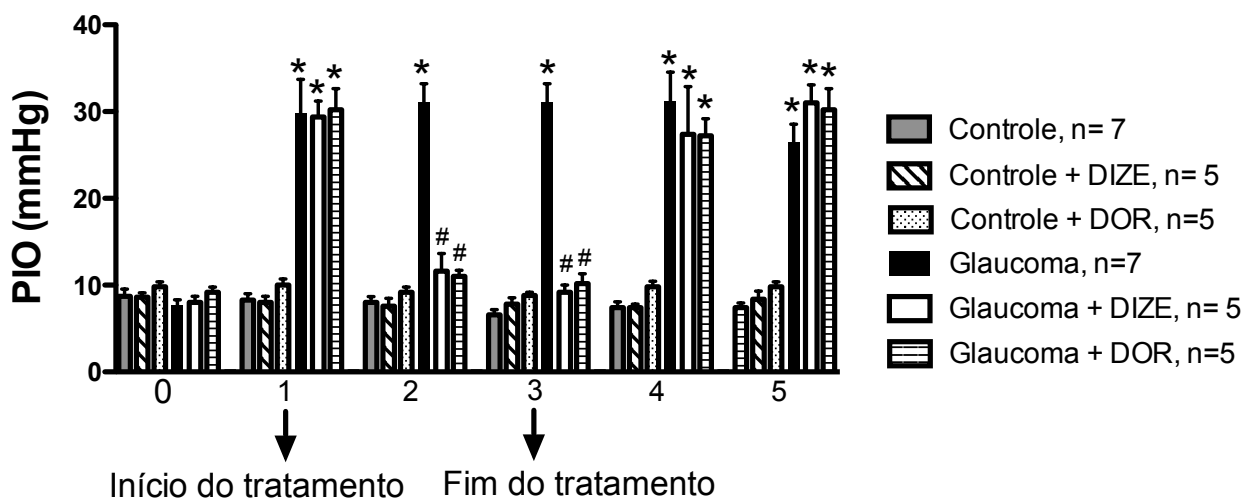


Figura 29: PIO durante o tratamento com DIZE ou Dorzolamida. Observar que o DIZE foi capaz de reduzir a PIO de forma similar ao antiglaucomatoso comercial, sendo que a interrupção dos tratamentos culminou em aumento da PIO. (*) $p < 0,001$ vs. controle sem tratamento; (#) $p < 0,001$ vs. glaucoma sem tratamento.

5.10 Efeitos do tratamento tópico com o DIZE na drenagem do humor aquoso

O DIZE foi capaz de facilitar a drenagem do humor aquoso. A **Fig. 30** mostra as imagens cintilográficas de todos os grupos de animais capturadas sob gama câmara a cada 30 minutos, durante 3 horas. É possível observar que a drenagem do radioisótopo no grupo GNT foi significativamente mais lenta do que no grupo CNT em todos os tempos analisados (**Figs. 30 e 31**). O tratamento com o DIZE (grupo GT) melhorou a drenagem do humor aquoso (**Figs. 30 e 31**).

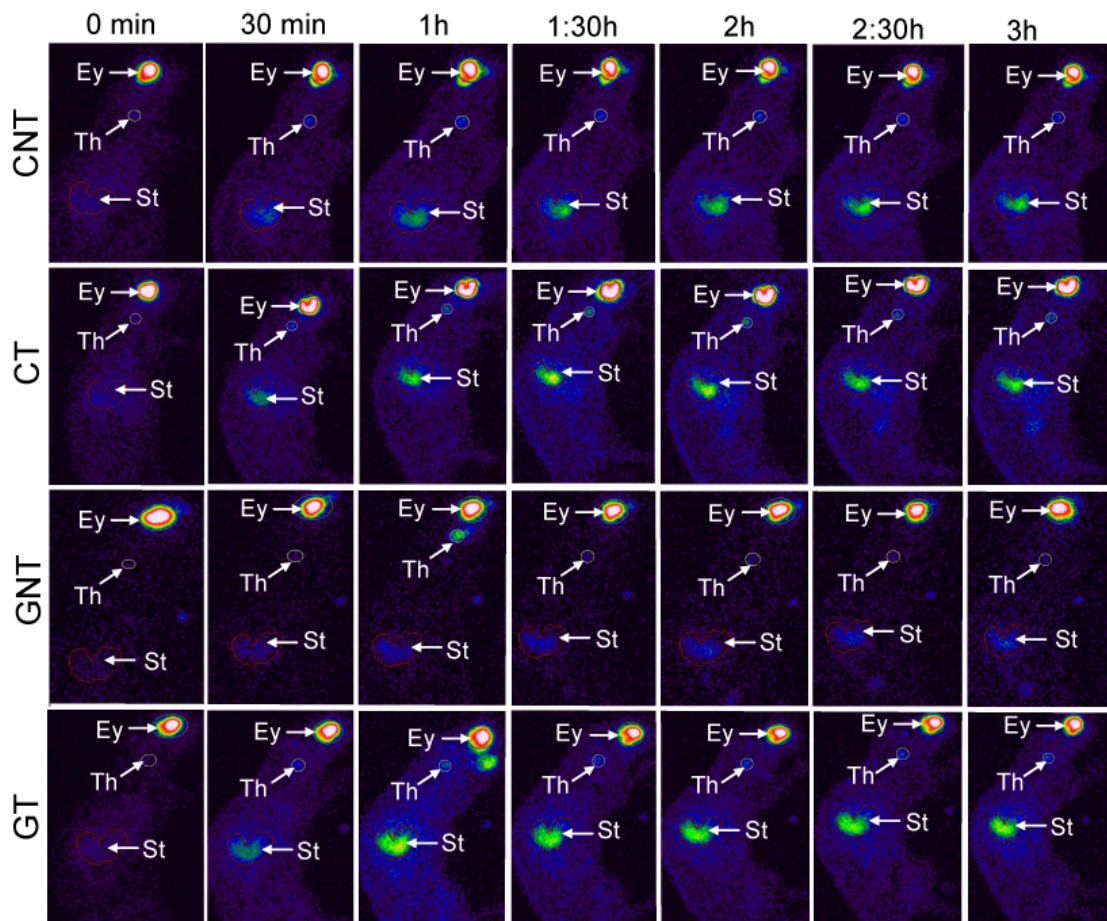


Fig. 30: Imagens cintilográficas representativas da drenagem do humor aquoso nas 3 primeiras horas após a injeção do pertecnetato de sódio na câmara anterior de rato Wistar. (Ey) olho; (Th) tireóide; (St) estômago. Observar que no grupo GT o aparecimento do tecnécio na circulação sistêmica e consequente captação pela tireóide e estômago é maior quando comparado ao grupo GNT.

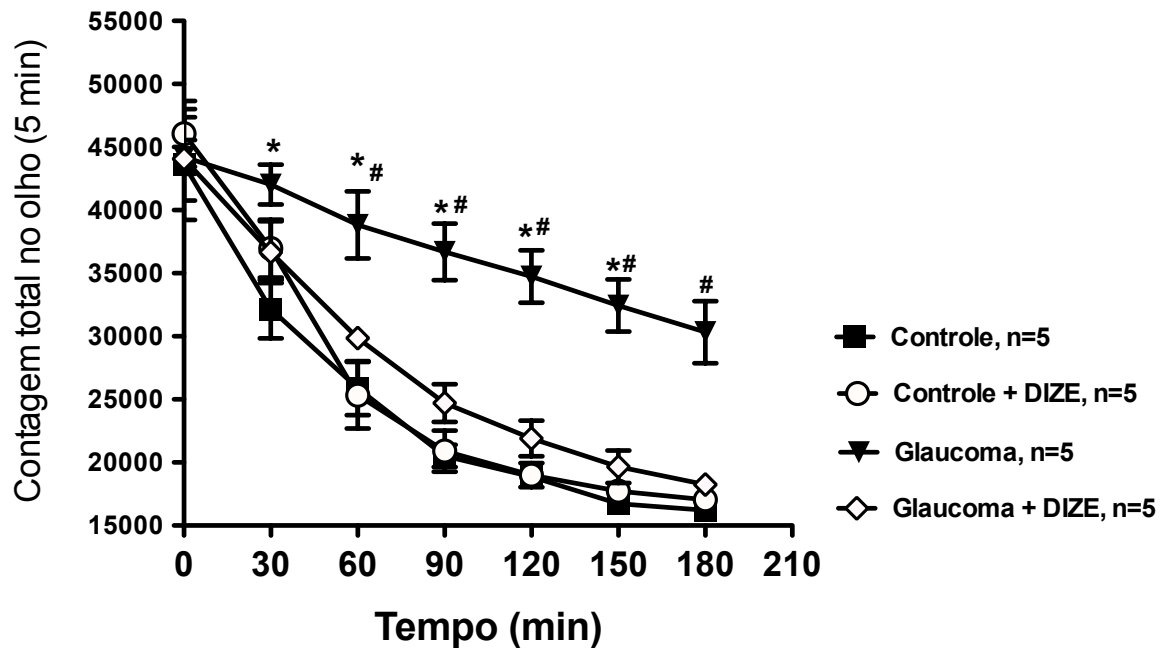


Fig. 31: Drenagem do humor aquoso determinada pela injeção do pertecnetato de sódio na câmara anterior. A drenagem do grupo GNT foi significativamente mais lenta que nos demais grupos. * $p < 0,05$ vs. controle. # $P < 0,05$ vs. glaucoma tratado.

Corroborando com estes resultados, o aparecimento de tecnécio na corrente sanguínea e sua absorção pela glândula tireóide (**Figs. 30 e 32**) e pelo estômago (**Figs. 30 e 33**) foram maiores no grupo GT (glândula tireóide em 90 min: $179,4 \pm 60,2$ no grupo GNT vs $348,8 \pm 29,9$ no grupo GT e estômago em 90 min: $1990,0 \pm 102,3$ no grupo GNT vs $4045,0 \pm 147,9$ no grupo GT).

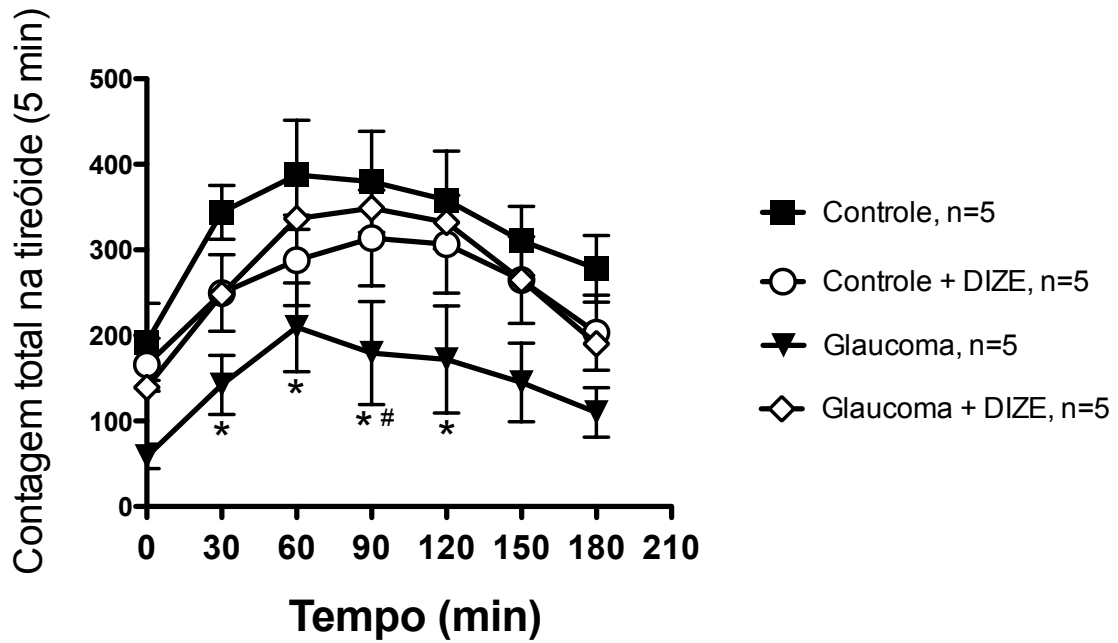


Fig. 32: O aparecimento do tecnécio na tireóide do grupo GNT foi mais lento durante as 2 primeiras horas se comparado ao CNT e também no tempo de 90 minutos se comparado ao GT. * $P < 0,05$ vs. controle. # $p < 0,05$ vs. glaucoma tratado.

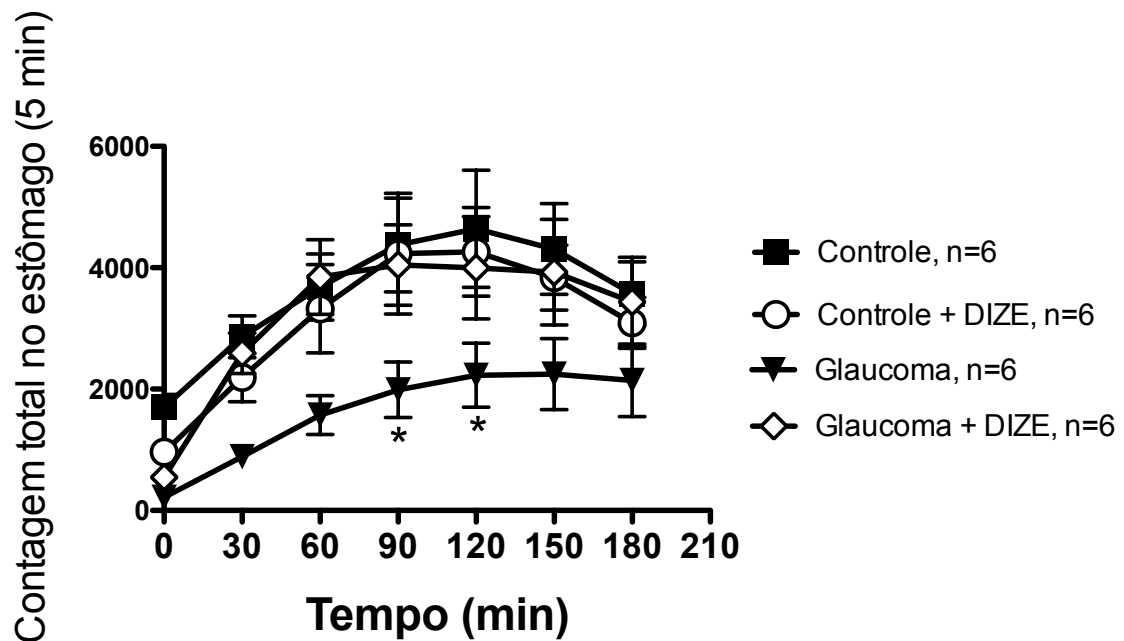


Fig. 33: O aparecimento do tecnécio no estômago foi significativamente menor no grupo GNT se comparado ao grupo CNT entre 90 e 120 minutos. (*) $p < 0,05$ vs. controle sem tratamento.

5.11 Porcentagem de hidratação dos *inserts*

Índices de hidratação dos *inserts* são mostrados na **Fig. 34**. É possível observar que os *inserts* carregando DIZE apresentaram captação de água aumentada. Os *inserts* hidratam rapidamente atingindo mais de 80% da hidratação total nos primeiros 20 min de imersão em água.

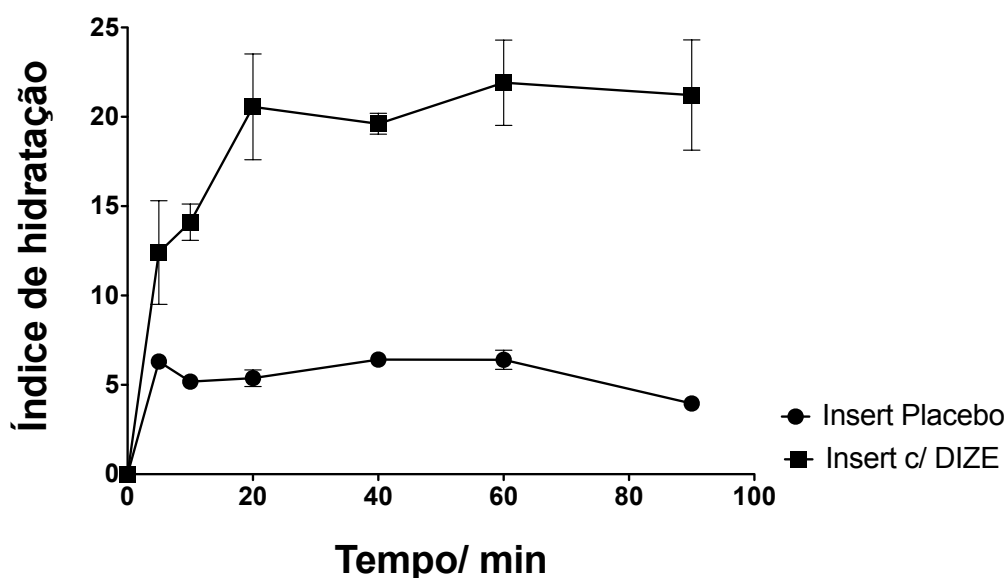


Fig. 34: Índice de hidratação dos *inserts* placebo e carregando DIZE em uma solução tampão (PBS; pH 7,4).

5.12 Análise ATR-FTIR

A **Fig. 35** mostra os espectros FTIR-ATR do DIZE, dos *inserts* placebo (PI) e dos *inserts* carregando DIZE (DI). No espectro PI (curva b) foram detectadas duas bandas de absorção características em 1633 e 1539 cm^{-1} , que correspondem, respectivamente, à banda I de amida e à superposição da banda de vibração de amina (N-H) com a banda II de amida. A banda de absorção larga em 3256 cm^{-1} corresponde à sobreposição das bandas de estiramento de ligações

OH e NH. Nos espectros de FTIR do DI (curva c) é possível observar que a banda de estiramento de ligações O-H e N-H foi deslocada para uma frequência mais elevada (de 3256 para 3271 cm^{-1}) e alargada, o que sugere a presença de ligações de hidrogênio entre o fármaco e a matriz. Outras bandas características do DI e do PI foram identificados nos espectros FTIR do DI, indicando que não houve reação química óbvia entre o fármaco e a matriz, de modo que o fármaco não perdeu a sua atividade no *insert*.

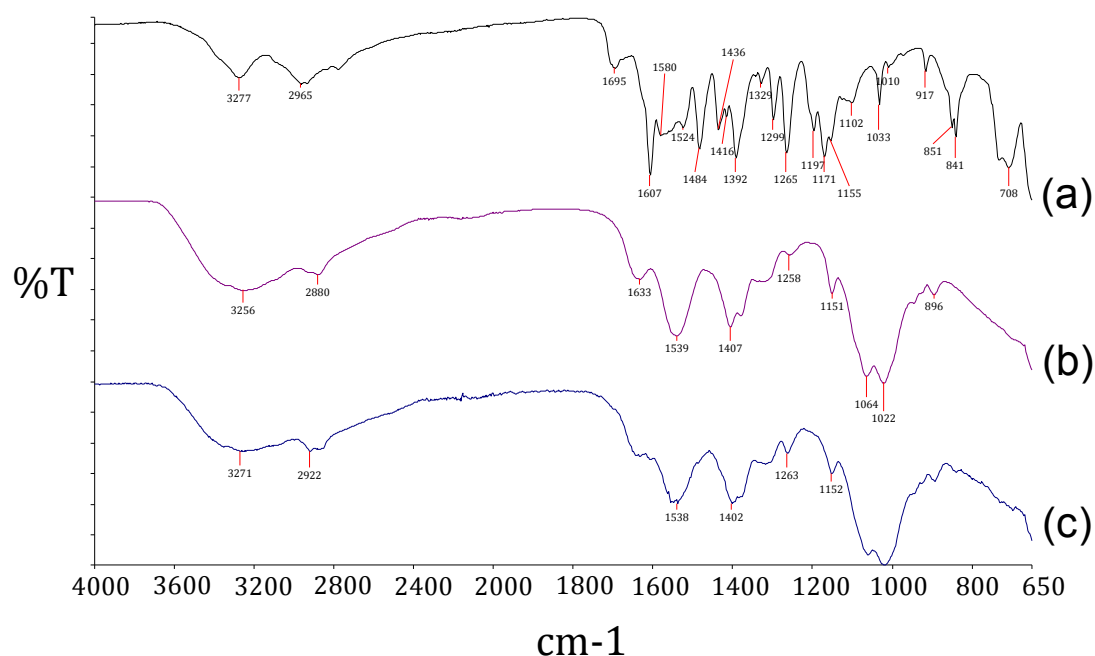
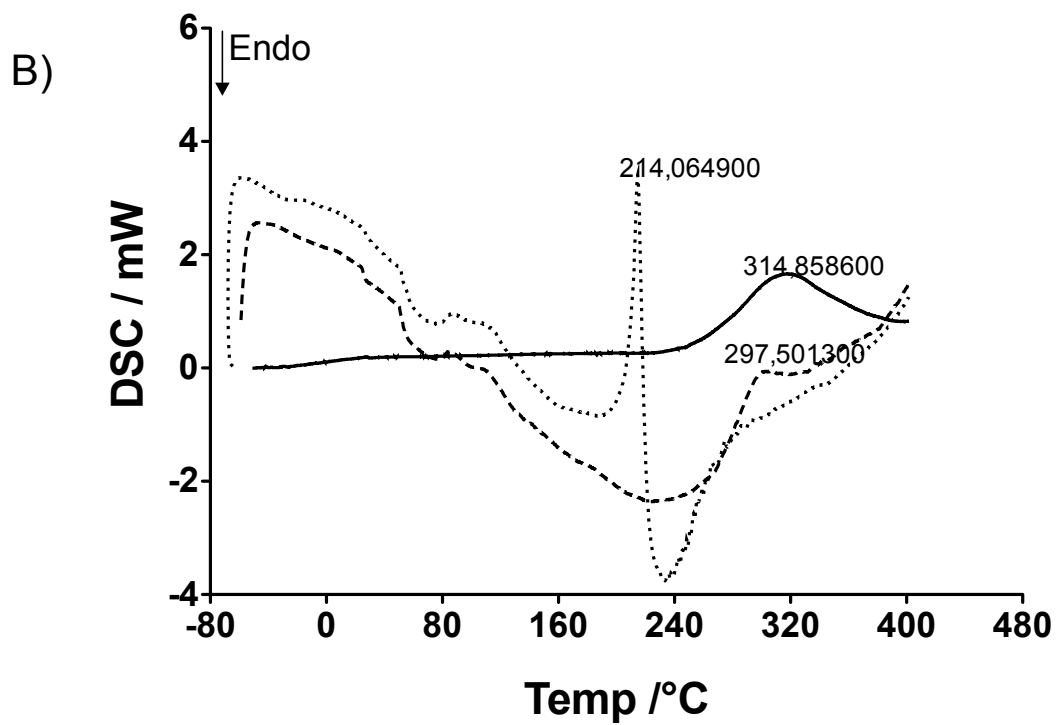
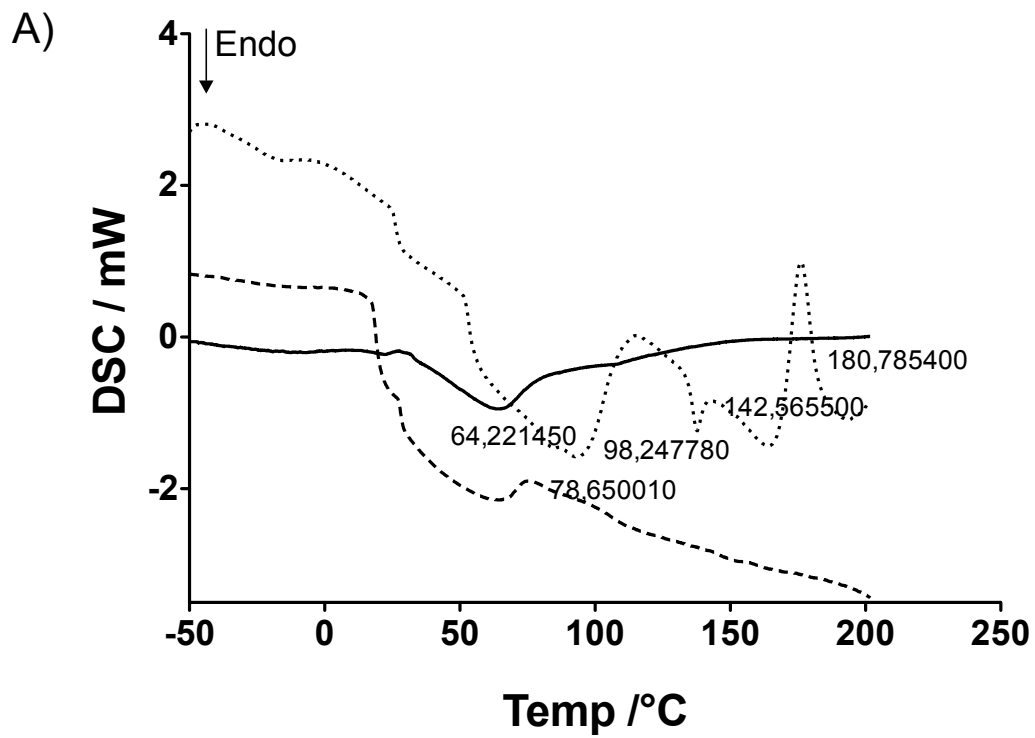


Fig. 35: Espectro de FTIR-ATR do DIZE (a), dos inserts placebo (b) e dos inserts carregando DIZE (c). O espectro mostrou bandas características tanto para os inserts placebo quanto para os inserts carregando DIZE. Não foram observadas novas bandas nos inserts carregando DIZE, indicando que a droga não reagiu com a matriz polimérica.

5.13 Análise térmica

A **Fig. 36A** (1ª corrida) e **Fig. 36B** (2ª corrida) mostram curvas DSC do DIZE, dos *inserts* placebo e dos *inserts* carreando DIZE. Os *inserts* placebo apresentaram um pico endotérmico largo a 64,22 °C e um pico exotérmico largo a 314,86 °C na primeira e segunda corridas, respectivamente. Ambos os picos foram irregulares e podem ser atribuídos à evaporação da água residual e à degradação da cadeia polimérica principal, respectivamente. A curva do DIZE mostrou uma longa fase endotérmica com valor máximo de 98,24 °C e um pico endotérmico a 142,56 °C, a qual está relacionada com a perda de água a partir do sal. Em 175,15 °C, foi observado um segundo pico endotérmico, indicando o processo de fusão do DIZE. Em 214,06 °C, um evento agudo exotérmico foi detectado na primeira e na segunda curva, o que pode ser explicado pela decomposição do fármaco. Picos de fusão e decomposição do DIZE não foram detectados em curvas dos *inserts* carreando DIZE, indicando que o fármaco foi, molecularmente, disperso na matriz. Além disso, observou-se uma diminuição da temperatura de degradação da quitosana (de 314,85 °C para 297,50 °C) quando foi adicionado o DIZE. Estes dados indicam que o fármaco interagiu com a matriz, diminuindo a temperatura de degradação da matriz polimérica, mas não reagindo quimicamente com ela.



.... DIZE

— *Insert Placebo*

--- *Insert c/ DIZE*

Fig. 36: Curvas DSC do DIZE, do insert placebo e do insert carreando DIZE em 1ª (a) e 2ª (b) corridas.

As curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do PI, DIZE e DI estão apresentadas nas **Figs. 37, 38 e 39**, respectivamente. Os eventos térmicos encontrados foram similares aos observados nas curvas de DSC. As perdas de massa próximas a 100 e a 300 °C podem ser atribuídas à perda de água residual e à decomposição do polímero, respectivamente. Nos *inserts* carreando DIZE não foram identificadas perdas de massa que pudessem ser atribuídas à decomposição isolada do fármaco, mais uma vez indicando a dispersão molecular do fármaco na matriz polimérica.

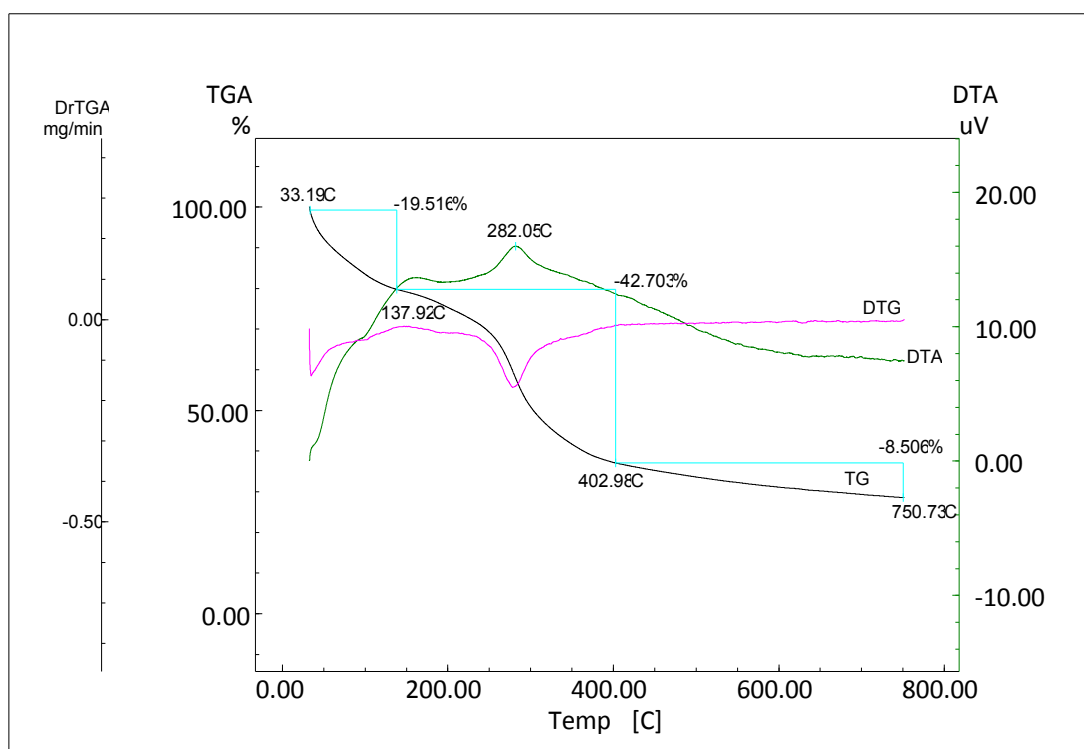


Fig. 37: Curvas de DTG, DTA e TG dos inserts placebo (PI).

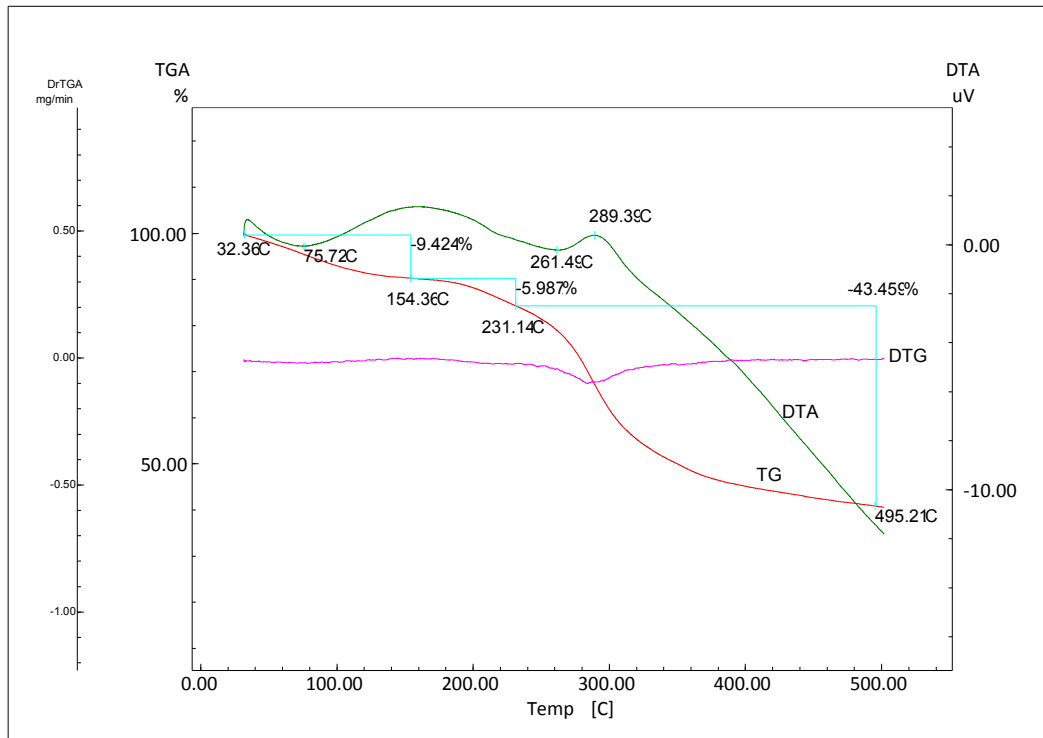


Fig. 38: Curvas de DTG, DTA e TG do DIZE.

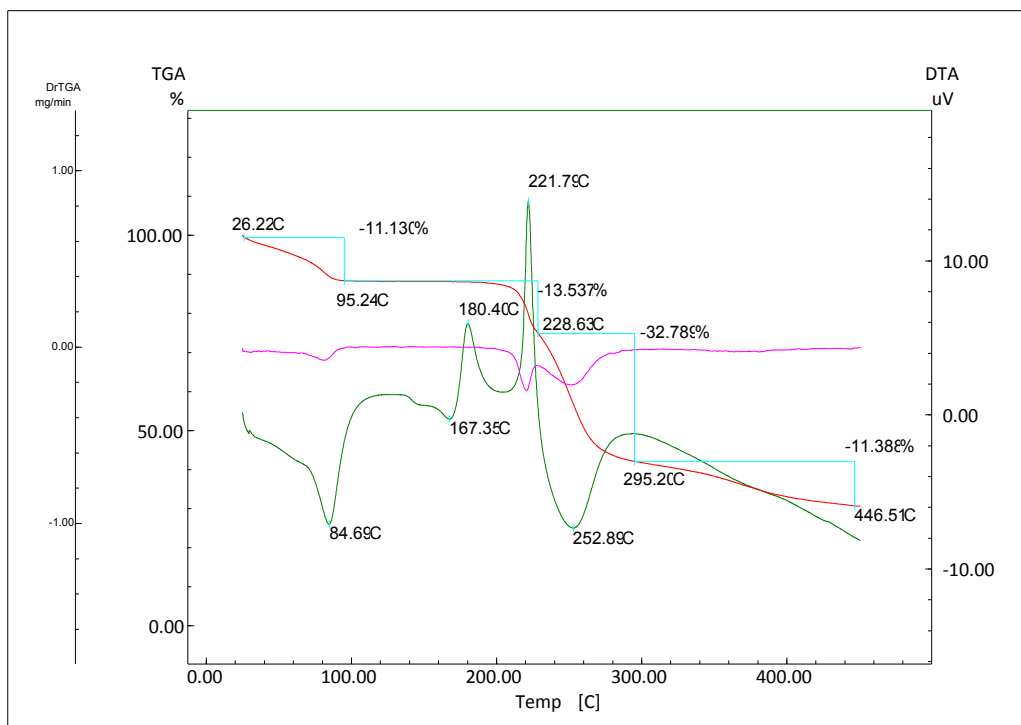


Fig. 39: Curvas de DTG, DTA e TG dos inserts contendo DIZE (DI).

5.14 Teor de fármaco no dispositivo

A quantidade de DIZE nos *inserts* foi de $179,88 \pm 11,67$ mg por *insert*, o que corresponde a uma incorporação de 89,9 % do fármaco adicionado. Os dados obtidos no doseamento foram utilizados para determinação da porcentagem de liberação do fármaco no teste de perfil de liberação *in vitro*.

5.15 Perfil de liberação *in vitro*

A liberação do DIZE, a partir do *insert* carregando a droga, foi monitorada *in vitro*. O perfil registrado sob condições fisiológicas de pH revela uma liberação de aproximadamente 80% nas 4 primeiras horas, sendo que 60% desta liberação ocorreu na primeira hora (**Fig. 40**). Não foi observado liberação adicional.

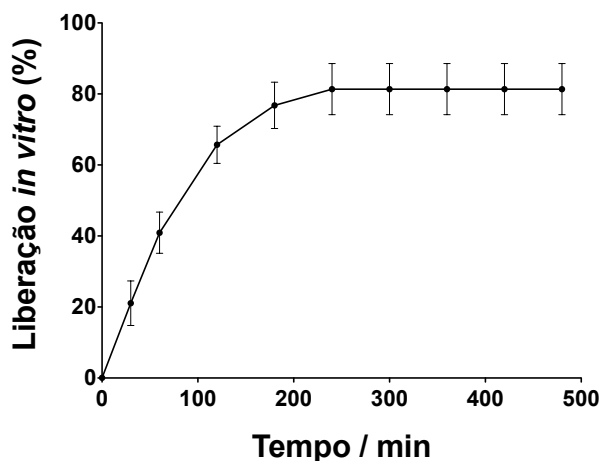


Fig. 40: Perfil de liberação *in vitro* do DIZE a partir do *insert* mostrando que aproximadamente 80% do DIZE foi liberada nas 4 primeiras horas.

5.16 Efeitos do *insert* contendo DIZE na PIO e nas CGs

Funcionalmente, a eficiência biológica destes *inserts* foi testada em nosso modelo de glaucoma A **Fig. 41** mostra a PIO de todos os grupos experimentais durante 5 semanas. Podemos observar que a PIO dos animais com glaucoma que não receberam nenhum tratamento (Glaucoma: $33,2 \pm 1,6$ mmHg na última semana) e a PIO dos animais com glaucoma que receberam os *inserts* placebo (Glaucoma + placebo *inserts*: $31,8 \pm 1,5$ mmHg na última semana) foram significativamente maiores que a PIO dos animais controle não tratados e controle tratados com os *inserts* placebo (Controle na última semana: $9,6 \pm 0,67$ mmHg e Controle + placebo *inserts* na última semana: $10,4 \pm 0,6$ mmHg). Após uma semana de tratamento com o DIZE, a PIO dos animais reduziu, retornando aos níveis dos animais controle (Glaucoma + DIZE *inserts* na última semana: $11,0 \pm 0,7$ mmHg). É importante ressaltar que o efeito do DIZE sobre a PIO foi observado durante as 4 semanas de tratamento. Nenhuma alteração significativa na PIO foi induzida pelos *inserts* carregando DIZE em animais controles (Controle + DIZE *inserts*). Os efeitos anti-glaucomatosos dos *inserts* carregando DIZE não causaram alterações significativas na PAM (**Fig. 42**).

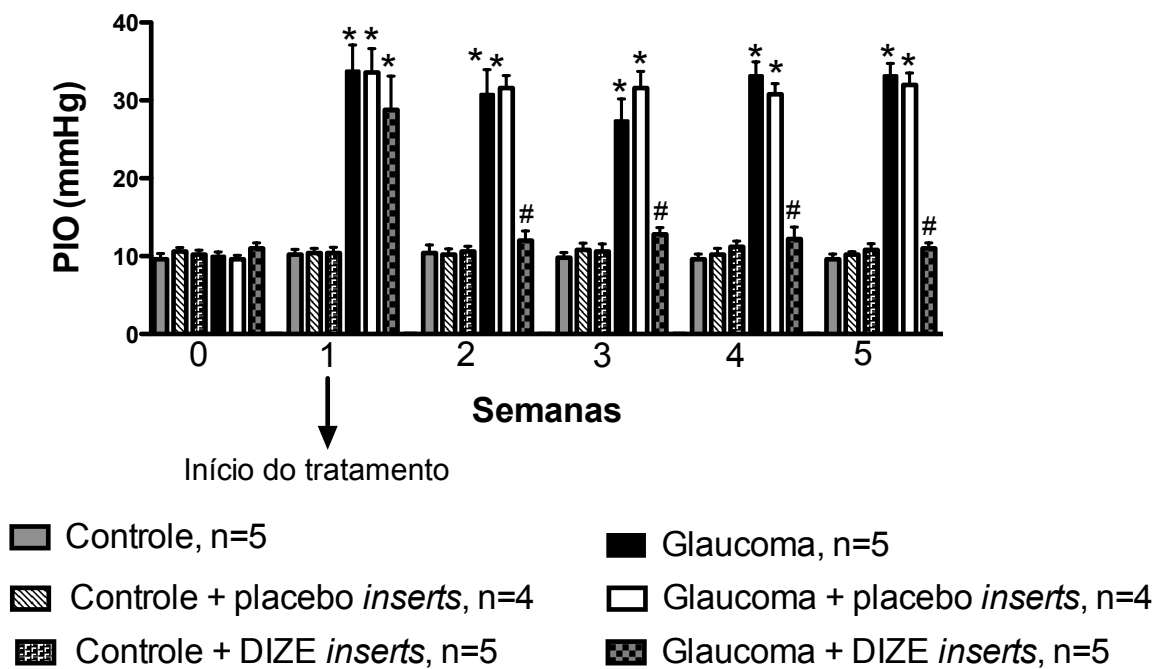


Fig. 41: Efeitos dos inserts sobre a PIO. Os inserts foram colocadas no fórnice conjuntival após a confirmação da PIO elevada e permaneceram por 4 semanas. Observe que, mesmo após o estabelecimento da hipertensão ocular, a ativação da ECA2 carregada pelos inserts foi capaz de reduzir a PIO, retornando aos valores basais. * $p < 0,05$ vs. controle e # $p < 0,05$ vs. glaucoma.

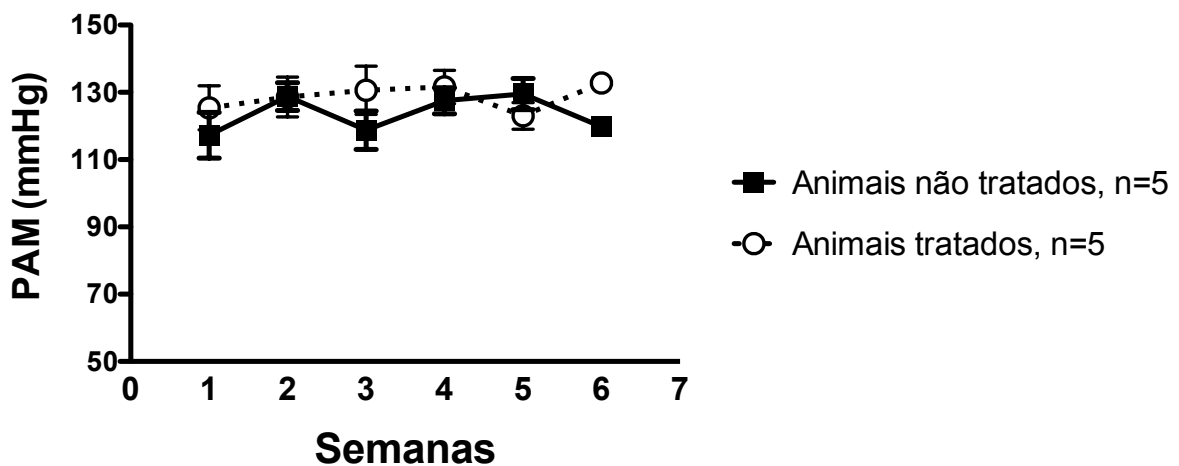


Fig. 42: Efeitos dos inserts sobre a PAM. Os efeitos anti-glaucomatosos dos inserts carregando DIZE não interferem na PAM.

As **Figs. 43A** e **43B** mostram que os animais glaucomatosos que não receberam nenhum tratamento (GLAU) e os animais glaucomatosos que receberam os *inserts* placebo (GLAU + PI) apresentaram grande redução no número de CGs (GLAU: $461,6 \pm 16,6$ células e GLAU + PI: $476,4 \pm 11,0$ células), o que foi completamente prevenido pelos *inserts* carreando DIZE (CRTL: $595,3 \pm 11,7$ células vs. GLAU + PI: $589,7 \pm 10,9$ células). Novamente, os *inserts* carreando DIZE não induziram alterações significativas nos animais controle (CRTL + DI). Além disso, a redução no número de CGs causada pela PIO elevada levaram a uma grande perda de fibras neurais com consequente aumento da escavação da cabeça do nervo óptico (**Fig. 44**). Estes efeitos foram prevenidos pelo tratamento com o dispositivo de liberação prolongada carreando DIZE. Juntos, estes dados indicam que o dispositivo de liberação prolongada, através do *insert* carreando DIZE, promoveu neuroproteção ao prevenir a morte das CGs, aumento da escavação do nervo óptico bem como a perda de fibras neurais.

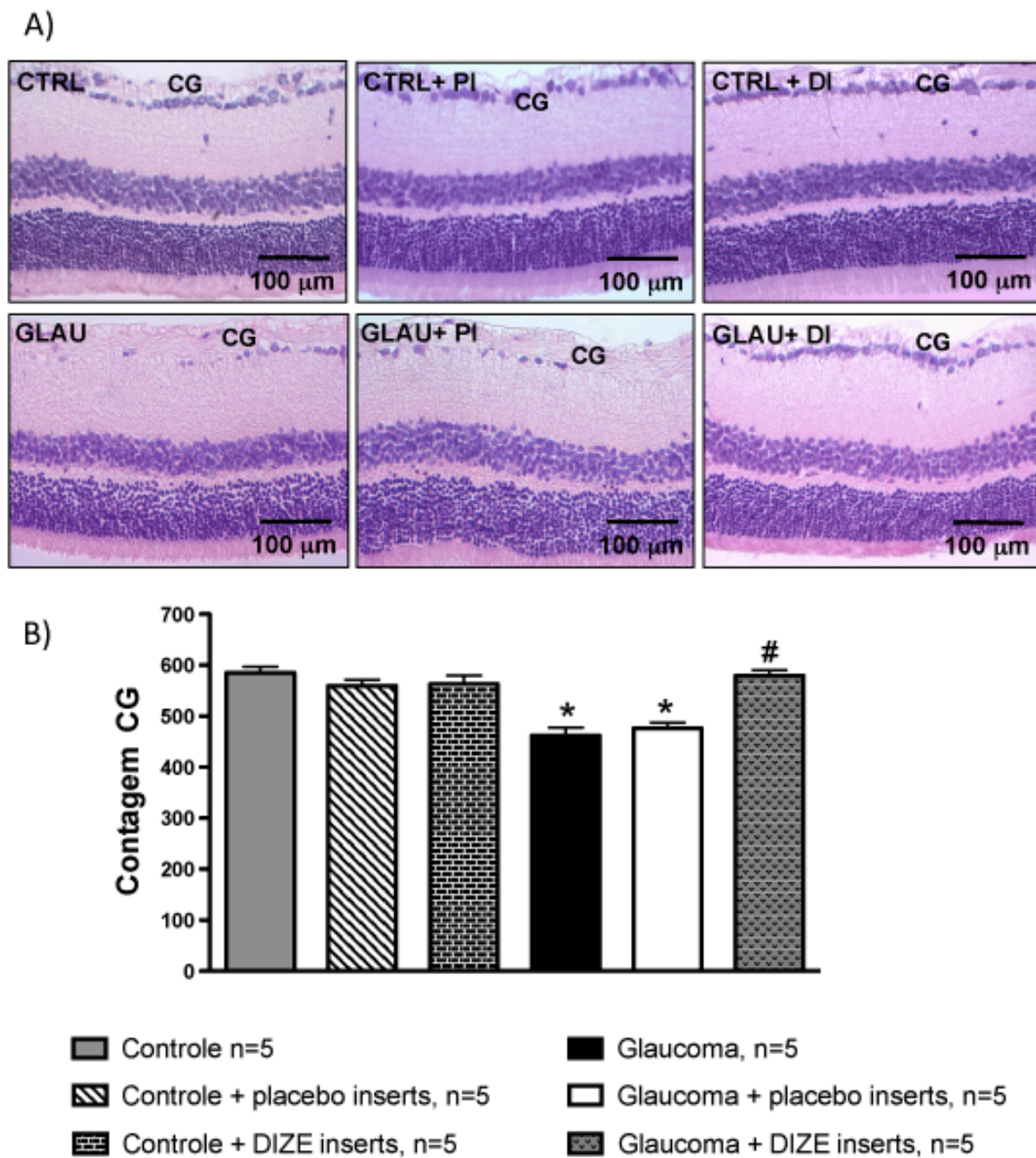


Fig. 43: Análise histológica das CGs. CTRL: grupo controle não tratado; CTRL + PI: grupo controle que recebeu o insert placebo; CTRL + DI: grupo controle que recebeu o insert carregando DIZE; GLAU: grupo glaucoma não tratado; GLAU + PI: grupo glaucoma que recebeu insert placebo; GLAU + DI: grupo glaucoma que recebeu o insert carregando DIZE. (A) Fotomicrografias representativas de retinas mostrando menor número de CGs no grupo GLAU e GLAU + PI, note os efeitos benéficos dos inserts carregando DIZE neste parâmetro (GLAU + DI). (B) Quantificação da CGs em retinas de ratos. * $p < 0,05$ vs. controle e # $p < 0,05$ vs. glaucoma. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

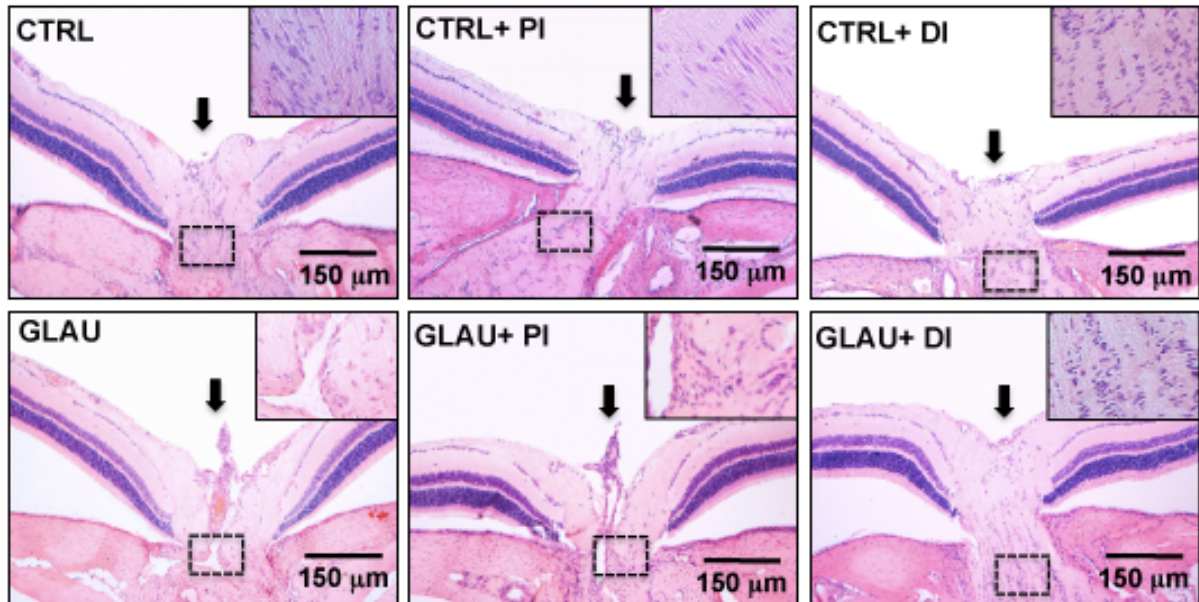


Fig. 44: Fotomicrografias representativas da escavação do nervo óptico (setas). CTRL: grupo controle não tratado; CTRL + PI: grupo controle que recebeu o insert placebo; CTRL + DI: grupo controle que recebeu o insert carregando DIZE; GLAU: grupo glaucoma não tratado; GLAU + PI: grupo glaucoma que recebeu insert placebo; GLAU + DI: grupo glaucoma que recebeu o insert carregando DIZE. Observar a maior escavação do nervo óptico nos animais GLAU e GLAU + PI. O dispositivo de liberação prolongada, foi capaz de impedir este dano histológico (observar os animais GLAU + DI). Em detalhe: fotomicrografias de cortes longitudinais do nervo óptico, mostrando uma grande redução nas fibras neurais nos grupos GLAU e GLAU + PI, o que não foi observado nos animais GLAU + DI.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena no glaucoma experimental em ratos Wistar. Nossos principais achados foram que o DIZE impediu, assim como reverteu, a elevação da PIO induzida por injeções semanais de ácido hialurônico na câmara anterior. Estes efeitos foram, provavelmente, mediados pelo receptor Mas, uma vez que o composto A-779 bloqueou completamente os efeitos do DIZE. Além disso, estes efeitos antiglaucomatosos da ativação da ECA2 envolveram neuroproteção e melhora na drenagem do humor aquoso. Após verificarmos os efeitos deste ativador da ECA2 no glaucoma, desenvolvemos um dispositivo de liberação prolongada a base de quitosana e DIZE, e avaliamos os efeitos deste *insert* no glaucoma após a sua implatação no fórnice conjuntival dos animais por 30 dias. Os principais resultados mostraram que estes *inserts* também foram capazes de reduzir a PIO e promover neuroproteção. Cabe ainda ressaltar que o volume do fármaco dos *inserts* foi equivalente ao usado em uma única dose do tratamento tópico. Em outras palavras, o conteúdo de uma única instilação foi suficiente para promover os mesmos efeitos com o dispositivo de liberação prolongada por, pelo menos, 30 dias (período de duração do experimento).

A expressão da ECA2 tem sido documentada tanto em retina de humanos (Senanayake et al., 2007) quanto de roedores (Tikellis et al., 2004). Esta enzima também já foi identificada no humor vítreo e corpo ciliar de porcos (Luhtala et al., 2009). Em conformidade com estes estudos, identificamos a expressão da ECA2 na retina de ratos e, notavelmente, o tratamento com DIZE aumentou significativamente a expressão desta enzima na retina. Um aumento na

expressão da ECA2 é um achado frequente quando se utiliza ativadores da ECA2 (Ferreira et al., 2011; Murça et al., 2012). Isto sugere que os efeitos benéficos deste composto não se devem apenas à formação de Ang-(1-7) e/ou degradação de Ang II ao agir como um ativador enzimático, mas também a um mecanismo ainda não-identificado capaz de induzir o aumento da expressão da ECA2. É importante observar que a eficácia do DIZE como um ativador da ECA2 foi previamente demonstrado por análise da hidrólise da Ang II (Kulemina e Ostrov, 2011).

A redução da PIO pela ativação da ECA2 endógena foi evidente em nosso modelo de glaucoma. Modelos de roedores tem sido muito bem caracterizados e amplamente utilizados no estudo desta patologia, tanto por apresentar uma dinâmica de produção e drenagem do humor aquoso similar à do olho humano (Pang e Clark, 2007), quanto pelo fácil acesso. Isso tem impulsionado, inclusive, o desenvolvimento de técnicas e instrumentos adequados para estudo do glaucoma nestes animais (Pang e Clark, 2007).

A ativação da ECA2 não apenas evitou o aumento da PIO, como também foi capaz de diminuir a PIO de animais com hipertensão ocular de forma que a PIO retornou aos valores basais após tratamento em ambas as vias de administração (sistêmica e tópica). Isto é um achado terapeuticamente relevante para a prática clínica. É importante ressaltar que este efeito óculo-hipotensor promovido pelo DIZE não afetou a PAM, o que é uma característica desejada para qualquer droga antiglaucomatosa à medida que aumenta a sua especificidade e reduz os potenciais efeitos colaterais.

Além do mais, conseguimos mostrar que o mecanismo pelo qual a ativação da ECA2 endógena promove óculo-hipotensão ocorre através ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, pois o antagonista do receptor Mas (A-779) bloqueou completamente os efeitos do DIZE na PIO. Em conformidade, tem sido relatado que o Mas é expresso em tecidos oculares de ratos (Vaajanen et al., 2009). Assim, uma vez que a ECA2 é a principal enzima que forma a Ang-(1-7), os nossos dados sugerem que a ativação de ECA2 endógena aumenta a produção de Ang-(1-7), que por sua vez, exercerá suas ações benéficas ao se ligar ao Mas. Soma-se ainda o fato da ECA2 utilizar a Ang II como principal substrato para a formação da Ang-(1-7). Nesse sentido, como tem sido relatado que a Ang II aumenta a PIO em ratos normais (Funk et al., 1985; Costagliola et al., 1995; Palm et al., 1995), diminui a drenagem do humor aquoso em primatas (Kaufman et al., 1981) e em coelhos (Inoue et al., 2001), assim como já foi relatado a presença de polimorfismos do gene do receptor da Ang II em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (Hashizume et al., 2005), a ativação da ECA2 poderia reduzir a PIO por degradar a Ang II, além de sintetizar Ang-(1-7). Embora não tenhamos observado qualquer efeito significativo nos olhos de ratos normotensos, foi relatado que a Ang-(1-7) reduz a PIO, possivelmente por um mecanismo envolvendo o receptor Mas, em coelhos normotensos (Vaajanen et al, 2008). Esta discrepância observada em olhos de ratos e coelho normotensos pode estar relacionada com a espécie avaliada.

Nossos achados também indicam que os efeitos do DIZE no glaucoma envolvem neuroproteção. Alterações histopatológicas em olhos glaucomatosos são caracterizadas por redução do número de CGs (Okisaka et al., 1997) como

resultado da apoptose (Nickells, 1999) e aumento da escavação do nervo óptico. No nosso estudo, a morte das CGs e aumento da escavação do nervo óptico foram observados nos animais com glaucoma não tratados, enquanto a ativação de ECA2 foi capaz de diminuir a morte celular por apoptose das CGs e impedir o aumento da escavação do nervo óptico. Há relatos na literatura de que a Ang II seja capaz de desencadear apoptose (Hashizume et al., 2005). Em um estudo *in vitro*, os autores encontraram diminuição da apoptose ao administrarem losartan, um antagonista do receptor AT₁ (Tanaka et al., 1995). Um estudo recente examinou os efeitos neuroprotetores do candesartan em um modelo de glaucoma crônico em rato (Yang et al., 2009) e, embora o tratamento não tenha exercido nenhum efeito sobre a PIO ou pressão arterial sistêmica ao longo de um período de 10 semanas de tratamento, os autores observaram uma preservação aumentada das CGs na retina central e periférica. Portanto, esses dados indicam que os efeitos da ativação da ECA2 no glaucoma podem ser decorrentes destes mecanismos neuroprotetores e envolvem, pelo menos em parte, diminuição da morte celular por apoptose.

Na tentativa de aprofundar nos mecanismos pelos quais o DIZE diminui a PIO de ratos glaucomatosos, avaliamos os efeitos deste composto sobre a drenagem do humor aquoso. Os nossos resultados mostraram que a ativação da ECA2 endógena foi capaz de facilitar a drenagem do humor aquoso. Os resultados obtidos na análise cintilográfica mostraram maior radioatividade na tireóide e estômago nos animais com glaucoma que foram tratados com DIZE quando comparados com os animais não tratados. Isto é consistente com a maior drenagem do humor aquoso para a circulação sistêmica. Quando calculamos o

tempo médio (T/2) da drenagem do humor aquoso, verificamos que o DIZE foi capaz de reduzir esse tempo em 4 vezes, uma vez que o T/2 dos animais com glaucoma que não receberam o tratamento foi de aproximadamente 8 horas e o T/2 dos animais com glaucoma que foram tratados com o DIZE foi de aproximadamente 1 hora e 40 minutos. Assim, o DIZE diminuiu consideravelmente o tempo de drenagem do humor aquoso, com retorno aos parâmetros fisiológicos.

Apesar de não termos investigado as vias moleculares relacionadas à ação do DIZE, os possíveis mecanismos envolvem a liberação de óxido nítrico (NO) e de prostaglandinas pela Ang-(1-7) (Nathanson e Mckee, 1995; Kostenis et al., 2005). A ação vasodilatadora da Ang-(1-7) através da liberação de NO no endotélio tem sido relatada em vários leitos vasculares, incluindo a artéria cerebral média em cães (Feterik et al., 2000), leito vascular mesentérico de gato (Osei et al., 1993), arteríolas aferentes de corpúsculos renais de coelho (Ren et al., 2002) e aorta de ratos (Le Tran e Forster, 1997) e camundongos (Savergnini et al., 2010). Além disso, Pinheiro e colaboradores (2004) observaram relação entre liberação de NO e receptor Mas em células de ovário de Hamster transfectadas com o Mas cujo efeito foi bloqueado pelo A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂ da Ang II. O NO na retina é um mediador fisiológico presente nos bastonetes, células bipolares, células amácrinas e CGs (Neufeld, 1999). Além disso, promove o relaxamento das células da rede trabecular e do músculo ciliar e sua produção parece estar reduzida no glaucoma primário de ângulo aberto (Nathanson e McKee, 1995). Adicionalmente, Vorwerk e colaboradores (1997) observaram degeneração das CGs em olhos de

camundongo *knockout* para NO sintase. Em relação às prostaglandinas, o tratamento com indometacina aboliu o efeito na redução da PIO promovida por enalaprilato, o que indica que as prostaglandinas também podem mediar efeitos óculo-hipotensores (Shah et al., 2000).

Para explorar um pouco mais o potencial terapêutico do DIZE como uma droga antiglaucomatosa, comparamos os efeitos do DIZE com um colírio comercialmente disponível, o dorzolamida. Observamos que ambos os compostos promoveram efeitos hipotensivos semelhantes. Além disso, quando os tratamentos foram interrompidos, similar elevação da PIO foi visualizada. O dorzolamida, um inibidor da anidrase carbônica que atua sobre o corpo ciliar diminuindo a produção de humor aquoso, foi aprovado em 1995 para o tratamento da PIO elevada (Pfeiffer, 1997) e tornou-se um dos medicamentos mais amplamente utilizados para o tratamento do glaucoma primário de ângulo aberto (Rusk et al., 1998). Atualmente, o dorzolamida deixou de ser a primeira opção dos oftalmologistas e passou a ser substituído ou administrado juntamente com outras drogas, como um tratamento coadjuvante. Isso se deve à descoberta de várias outras classes de medicamentos, assim como algumas contra-indicações do dorzolamida, tais como: pacientes com alergia a sulfonamidas; tratamento do glaucoma agudo de ângulo fechado; gravidez e amamentação; e pacientes com distúrbios eletrolíticos preexistentes, pois a função renal pode ser severamente prejudicada (Pfeiffer, 1997; Zammataro et al., 2010). No entanto, embora o dorzolamida não seja mais a primeira opção na terapia medicamentosa para o tratamento do glaucoma, os efeitos similares do ativador da ECA2 em relação a

um medicamento já disponível no mercado, vislumbra-o como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do glaucoma.

Em relação à caracterização dos *inserts*, o DIZE aumentou a absorção de água de tais filmes provavelmente devido à interações intermoleculares entre a matriz de quitosana e o DIZE. De acordo com Boeuf e colaboradores (2012) a desorganização da matriz polimérica pode facilitar a penetração da água e, sendo assim, a interação entre o DIZE e quitosana poderia provocar tal desorganização. Contudo, os filmes não sofreram nenhuma fragmentação, mesmo após a hidratação. As análises dos espectros ATR-FTIR sugerem que o DIZE não perde a sua atividade nos *inserts* e as curvas DSC indicam que a droga interage com a matriz de quitosana diminuindo a temperatura de degradação da matriz, mas não reagem quimicamente com a mesma. Em conjunto, estes dados indicam que os *inserts* contendo DIZE são eficientes para uma liberação prolongada.

Para testar a eficácia terapêutica dos *inserts* contendo DIZE, os mesmos foram colocados no fórnice conjuntival de ratos. Estes filmes foram bem tolerados por todos os animais. Além disso, não foi observado alterações na córnea e inflamação da câmara anterior. Os *inserts* contendo DIZE foram capazes de reduzir a PIO e restaurar completamente os valores basais, bem como reduzir a morte das CGs. É importante ressaltar que os animais controles que receberam *inserts* placebos não mostraram qualquer alteração significativa na PIO. Nossos resultados demonstraram que os *inserts* contendo DIZE foram capazes de reduzir a PIO por 30 dias com um volume muito pequeno de DIZE (200 µg), o que é uma vantagem de qualquer dispositivo de liberação controlada, uma vez que evita a perda do medicamento (como acontece na instilação), reduzindo assim, o

desperdício do fármaco e efeitos colaterais (Peng et al., 2012). Além disso, os colírios são susceptíveis ao rápido *turnover* da lágrima, resultando em baixa biodisponibilidade corneal. Desta forma, colírios requerem instilação frequente com grande volume e/ou concentração de fármaco para mantê-lo dentro da janela terapêutica (Bourlais et al., 1998; Mcnamara et al., 1999).

7 CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram a relevância patofisiológica do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas do SRA ocular de ratos Wistar e indicam que a ativação da ECA2 endógena pode ser uma estratégia terapêutica viável para o tratamento do glaucoma, inclusive via dispositivos de liberação prolongada, pois o tratamento com o ativador desta enzima (DIZE), foi capaz de:

- Prevenir a elevação da PIO;
 - Reduzir a PIO sem interferir na pressão arterial;
 - Promover neuroproteção ao prevenir morte celular por apoptose das CGs; assim como prevenir o aumento da escavação e degeneração das fibras do nervo óptico;
 - Facilitar a drenagem do humor aquoso.
-

8 REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALMASIEH, M; WILSON, AM; MORQUETTE, B; VARGAS, JLC; DI POLO, A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog in Retin Eye Res.* 31:152-181, 2012.

ANDERSON, MG; SMITH, RS; HAWES, NL et al. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet.* 30, 1:81-5, 2002.

AVTAR, R; SRIVASTAVA, R. Modelling aqueous humor outflow through trabecular meshwork. *Appli Mathem Comput.* 189, 1:734-45, 2007.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50:439-65, 2010.

BADER, M; PETERS, J; BALTATU, O et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl).* 79, 2-3:76-102, Apr 2001.

BAILEY, NM. Oral Berenil in the treatment and prophylaxis of human trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Trop Med Hygiene.* 62, 1:122, 1968.

BERKELAAR, M; CLARKE, DB; WANG, YC et al. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* 14, 7:4368-74, 1994.

BOEUF, S; GRAF, F; FISCHER, J et al. Regulation of aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neoepitope formation during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 23:320-32, 2012.

BONOMI, L; MARCHINI, G; MARRAFFA, M et al. Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology.* 107, 7:1287-93, 2000.

BOURLAIS, CL; ACAR, L; ZIA, H et al. Ophthalmic drug delivery systems-recent advances. *Prog Retin Eye Res.* 17, 1:33-58, 1998.

BRUBAKER, RF. Targeting outflow facility in glaucoma management. *Surv Ophthalmol.* 48 Suppl 1:S17-20, 2003.

BUCHI, ER. Cell death in rat retina after pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: electron microscopic study. II. Outer nuclear layer. *Jpn J Ophthalmol.* 36, 1:62-8, 1992.

CALIXTO, NS; CRONEMBERGER, S; REIS, JRC. Bases da Oftalmologia (Fisiologia do Humor aquoso), em Série Oftalmológica Brasileira. Vol2, Cultura Médica-Guanabara Koogan, 2008.

CHEN, J; GAMOU, S; TAKAYANAGI, A et al. A novel gene delivery system using EGF receptor-mediated endocytosis. *FEBS.* 338, 2:167-9, 1994.

COLEMAN, AL. Glaucoma. *Lancet.* 354, 9192:1803-10, 1999.

CORDEIRO, MF; GUO, L; LUONG, V et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 36:13352-6, 2004.

COSTA, VP; HARRIS, A; STEFÁNSSON, E et al. The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res.* 22, 6:769-805, 2003.

COSTAGLIOLA, C; DI BENEDETTO, R; DE CAPRIO, L et al. Effect of oral captopril (SQ 14225) on intraocular pressure in man. *Eur J Ophthalmol.* 5, 1:19-25, 1995.

COSTAGLIOLA, C; VEROLINO, M; DE ROSA, ML et al. Effect of oral losartan potassium administration on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. *Exp Eye Res.* 71, 2:167-71, 2000.

CRONEMBERGER, S; LOURENCO, LF; SILVA, LC et al. Prognosis of glaucoma in relation to blindness at a university hospital. *Arq Bras Oftalmol.* 72, 2:199-204, 2009.

CUNHA-VAZ, J. The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol.* 23, 5:279-96, 1979.

DANSER, AHJ; DERKX, FHM; ADMIRAAL, PJJ et al. Angiotensin levels in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 3:1008-18, 1994.

DANSER, AHJ; VAN DEN DORPEL, MA; DEINUM, J et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 68, 1:160-67, 1989.

DEGTEREV, A; BOYCE, M; YUAN, J. A decade of caspases. *Oncogene.* 22, 53:8543-67, 2003.

DEL AMO, EM; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today*. 13, 3-4:135-43, 2008.

DENAULT, JB; SALVESEN, GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*. 102, 12:4489-500, 2002.

DIEZ-FREIRE, C; VAZQUEZ, J; CORREA DE ADJOUNIAN, MF et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics*. 27, 1:12-9, 2006.

DINIZ, SOF; REZENDE, CMF; SERAKIDES, R et al. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Nuc Med Comm*. 29, 9:830-36, 2008.

DONOGHUE, M; HSIEH, F; BARONAS, E et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circul res*. 87, 5:E1-9, 2000.

EROGLU, H; SARGON, MF; ONER, L. Chitosan formulations for steroid delivery: effect of formulation variables on in vitro characteristics. *Drug Dev Ind Pharm*. 33, 3:265-71, 2007.

FERRARIO, CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 47, 3:515-21, 2006.

FERREIRA, AJ; BADER, M; SANTOS, RAS. Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the reninangiotensin system: A patent review. *Expert Opin Therap Pat*. 22, 5:567-74, 2012.

FERREIRA, AJ; SHENOY, V; QI, Y et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol*. 96, 3:287-94, 2011.

FERREIRA, AJ; SHENOY, V; YAMAZATO, Y et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 179, 11:1048-54, 2009.

FERREIRA-FILHO, N; NOGUEIRA, JC. Bases Morfofuncionais do aparelho da visão. *Série Oftalmologia Brasileira*. Vol1, Cultura Médica-Guanabara Koogan, 2008.

FETERIK, K; SMITH, L; KATUSIC, ZS. Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain Res*. 873, 1:75-82, 2000.

FLETCHER, EL; PHIPPS, JA; WARD, MM et al. The renin-angiotensin system in retinal health and disease: Its influence on neurons, glia and the vasculature. *Prog Retin Eye Res.* 29, 4:284-311, 2010.

FRANCOIS, J; BENOZZI, G; VICTORIA-TRONCOSO, V et al. Ultrastructural and morphometric study of corticosteroid glaucoma in rabbits. *Ophthalm Res.* 16, 3:168-78, 1984.

FRIEND, DR. *In vitro* skin permeation techniques. *J control release.* 18, 3:235-48, 1992.

FULGENCIO, GO; DE OLIVEIRA, FC; WINDMOLLER, D et al. Evidence of the participation of electronic excited states in the mechanism of positronium formation in substitutional Tb(1-x)Eu(x)(dpm)₃ solid solutions studied by optical and positron annihilation spectroscopies. *Phys Chem Chem Phys.* 14, 28:9996-10007, 2012.

FUNK, R; ROHEN, JW; SKOLASINSKA, K. Intraocular pressure and systemic blood pressure after administration of vasoactive substance in hypertensive and normal rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 223, 3:145-49, 1985.

FYHRQUIST, F; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *J Int Med.* 264, 3:224-36, 2008.

GABELT, BT; HU, Y; VITTITOW, JL et al. Caldesmon transgene expression disrupts focal adhesions in HTM cells and increases outflow facility in organ-cultured human and monkey anterior segments. *Exp Eye Res.* 82, 6:935-44, 2006.

GAMMELGAARD, I; WAMBERG, S; BIE, P. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol.* 188, 2:129-38, 2006.

GARCIA-VALENZUELA, E; SHAREEF, S; WALSH, J et al. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 61, 1:33-44, 1995.

GENG, L; PERSSON, K; NILSSON, SF. Angiotensin converting anzyme (ACE) activity in porcine ocular tissue: effects of diet and ACE inhibitors. *J Ocul Pharmacol Ther.* 19, 6:589-98, 2003.

GHATE, D; EDELHAUSER, HF. Barriers to glaucoma drug delivery. *J Glaucoma.* 17, 2:147-56, 2008.

GJYMISHKA, A.; KULEMINA, L. V.; SHENOY, V et al. Diminazene Aceturate is an ACE2 activator and a novel antihypertensive drug. *FASEB J.* 24:1032-3, 2010.

GROSS, A; MCDONNELL, JM; KORSMEYER, SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 15:1899-911, 1999.

GULSEN, D; LI, CC; CHAUHAN, A. Dispersion of DMPC liposomes in contact lenses for ophthalmic drug delivery. *Curr Eye Res.* 30, 12:1071-80, 2005.

HAEFLIGER, IO; FLAMMER, J; LUSCHER, TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 7:2340-3, 1992.

HARADA, T; HARADA, C; NAKAMURA, K et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 117, 7:1763-70, 2007.

HASHIZUME, K; MASHIMA, Y; FUMAYAMA, T et al. Genetic polymorphisms in the angiotensin II receptor gene and their association with open-angle glaucoma in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 6:1993-2001, 2005.

HENGARTNER, MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407, 6805:770-6, 2000.

HÖHNE, G; HEMMINGER, W; FLAMMERSHEIM, HJ. Differential scanning calorimetry. Springer Verlag, 2003.

HOLZER, MP; TETZ, MR; AUFFARTH, GU et al. Effect of Healon5 and 4 other viscoelastic substances on intraocular pressure and endothelium after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 27, 2:213-8, 2001.

HORNOF, M; WEYENBERG, W; LUDWIG, A et al. Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): development and in vivo evaluation in humans. *J Control Release.* 89, 3:419-28, 2003.

IMMONEM, I; FRIBERG, K; SORSILA, R; FYHRQUIST, F. Concentration of angiotensin-converting enzyme in tears of patients with sarcoidosis. *Acta Ophthalmol.* 65:27-9, 1987.

INOUE, T; YOKOYOMA, T; KOIKE, H. The effect of angiotensin II on uveoscleral outflow in rabbits. *Cur Eye Res.* 23, 2:139-43, 2001.

JEAN-MORENO, V; ROJAS, R; GOYENECHÉ, D et al. Leishmania donovani: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol.* 112, 1:21-30, 2006.

JOHNSON, TV; TOMAREV, SI. Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull.* 81, 2-3:349-58, 2010.

KARNOVSKY, MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27A, 2:137-8, 1965.

KAUFMAN, PL; CALKINS, BT; ERICKSON, KA. Ocular biometry of the cynomolgus monkey. *Curr Eye Res.* 1, 5:307-9, 1981.

KERRIGAN, LA; ZACK, DJ; QUIGLEY, HA et al. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 115, 8:1031-5, 1997.

KNEPPER, PA; GOOSSENS, W; PALMBERG, PF. Glycosaminoglycan stratification of the juxtacanalicular tissue in normal and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 12:2414-25, 1996.

KOEV, ST; DYKSTRA, PH; LUO, X et al. Chitosan: an integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. *Lab on a Chip.* 10, 22:3026-42, 2010.

KOHLER, K; WHEELER-SCHILLING, T; JURKLIES, B et al. Angiotensin II in the rabbit retina. *Vis Neurosc.* 14, 1:63-71, 1997.

KOSTENIS, E; MILLIGAN, G; CHRISTOPOULOS, A et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 111, 14:1806-13, 2005.

KRAMKOWSKI, K; MOGIELNICKI, A; BUCZKO, W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol.* 57, 4:529-39, 2006.

KROUBI, M; DAULOUEDE, S; KAREMBE, H et al. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology.* 21, 50:505102, 2010.

KULEMINA, LV; OSTROV, DA. Prediction of Off-Target Effects on Angiotensin-Converting Enzyme 2. *J of Biomol Screen.* 16, 8:878-85, 2011.

LALIBERTE, MF; LALIBERTE, F; ALHENC-GELAS, F et al. Immunohistochemistry of angiotensin I-converting enzyme in rat eye structures involved in aqueous humor regulation. *Lab Invest.* 59, 2:263-70, 1988.

LANGER, K; ZIMMER A; KREUTER, J. Acrylic nanoparticles for ocular drug delivery. *S.T.P. Pharma Sci.* 7:445-51, 1997.

LE TRAN, Y; FORSTER, C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 30, 5:676-82, 1997.

LEE, SS; HUGHES, P; ROSS, AD et al. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharm Res.* 27, 10:2043-53, 2010.

LEVIN, LA. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Sur Ophthalmol.* 48, SUPPL. 1:S21-4, 2003.

LEVKOVITCH-VERBIN, H; HARRIS-CERRUTI, C; GRONER, Y et al. RGC death in mice after optic nerve crush injury: oxidative stress and neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 13:4169-74, 2000.

LEWIS, TL. Care of the Patient with open-angle glaucoma. 2nd ed. St. Louis: American Optometric association, 2002.

LOFTSSON, T; THORISDOTTIR, S; FRIDRIKSDOTTIR, H et al. Enalaprilat and enalapril maleate eyedrops lower intraocular pressure in rabbits. *Act Ophthalmol.* 88, 3:337-41, 2010.

LOTTI, VJ; PAWLOWSKI, N. Prostaglandins mediate the ocular hypotensive action of the angiotensin converting enzyme inhibitor MK-422 (enalaprilat) in African green monkeys. *J Ocul Pharmacol.* 6, 1:1-7, 1990.

LUDWIG, CJ; GILCHRIST, ID; MCSORLEY, E et al. The temporal impulse response underlying saccadic decisions. *J Neurosci.* 25, 43:9907-12, 2005.

LUHTALA, S; VAAJANEN, A; OKSALA, O et al. Activities of Angiotensin-Converting Enzymes ACE1 and ACE2 and Inhibition by Bioactive Peptides in Porcine Ocular Tissues. *J Ocul Pharmacol Therap.* 25, 1:23-28, 2009.

MARUICHI, M; OKU, H; TAKAI, S et al. Measurement of activities in two different angiotensin II generating systems, chymase and angiotensin-converting enzyme, in the vitreous fluid of vitreoretinal diseases: a possible involvement of chymase in the pathogenesis of macular hole patients. *Curr Eye Res.* 29, 4-5:321-5, 2004.

MASLAND, RH. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 4:431-6, 2001.

MCKINNON, SJ; GOLDBERG, LD; PEEPLES, P et al. Current management of glaucoma and the need for complete therapy. *Am J Manag Care.* 14, 1 Suppl:S20-7, 2008.

MCNAMARA, NA; POLSE, KA; BRAND, RJ et al. Tear mixing under a soft contact lens: effects of lens diameter. *Am J Ophthalmol.* 127, 6:659-65, 1999.

MEISNER, D; MEZEI, M. Liposome ocular delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev.* 16:75-93, 1995.

MINCIONE, F; SCOZZAFAVA, A; SUPURAN, CT. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Current Pharmaceutical Design*. 14, 7:649-54, Mar 2008.

MOORE, CG; MILNE, ST; MORRISON, JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34, 2:363-9, 1993.

MORENO, MC; ALDANA MARCOS, HJ; CROXATTO, JO et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res*. 81, 1:71-80, 2005.

MORRISON, JC; MOORE, CG; DEPPMEIER, LM et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*. 64, 1:85-96, 1997.

MURÇA, TM; MORAES, PL; CAPURUCO, CA et al. Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regul Pept*. 177, 1-3:107-15, 2012.

NADAL, JA; SCICLI, GM; CARBINI, LA et al. Angiotensin II and retinal pericytes migration. *Bioch Biophys Res Comm*. 266, 2:382-85, 1999.

NATHANSON, JA; MCKEE, M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36, 9:1765-73, 1995.

NAVAJAS, EV; MARTINS, JRM; MELO, LAS et al. Concentration of hyaluronic acid in primary open-angle glaucoma aqueous humor. *Exp Eye Res*. 80, 6:853-57, 2005.

NEUFELD, AH. Nitric oxide: A potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 43, 6 SUPPL.:S129-35, 1999.

NGUYEN, G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci*. 120, 5:169-78, 2011.

NICKELLS, RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: An update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv of Ophthalmol*. 43, 6 SUPPL.:S151-61, 1999.

OKISAKA, S; MURAKAMI, A; MIZUKAWA, A et al. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jap J Ophthalmol*. 41, 2:84-8, 1997.

OLBRICH, C; GESSNER, A; SCHRODER, W et al. Lipid-drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene-cytotoxicity testing and mouse serum adsorption. *J Control Release*. 96, 3:425-35, 2004.

OSEI, SY; AHIMA, RS; MINKES, RK et al. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol.* 234, 1:35-42, 1993.

PALM, DE. Effects of angiotensin, vasopressin and atrial natriuretic peptide on intraocular pressure in anesthetized rats. *Neuropeptides.* 29, 4:193-203, 1995.

PANG, IH; CLARK, AF. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma.* 16, 5:483-505, 2007.

PARK, SH; PARK, JW; PARK, SJ et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia.* 46, 9:1260-68, 2003.

PENG, CC; BURKE, MT; CARBIA, BE et al. Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *J Control Release.* 162, 1:152-8, 2012.

PFEIFFER, N. Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Surv Ophthalmol.* 42, 2:137-51, 1997.

PINHEIRO, SV; SIMOES E SILVA, AC; SAMPAIO, WO et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 44, 4:490-6, 2004.

PRADELLI, LA; BENETEAU, M; RICCI, JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci.* 67, 10:1589-97, 2010.

QUIGLEY, HA. New paradigms in the mechanisms and management of glaucoma. *Eye.* 19, 12:1241-8, 2005.

QUIGLEY, HA; BROMAN, AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 90, 3:262-7, 2006.

RABELO, LA; ALENINA, N; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res.* 34, 2:154-60, 2011.

RAFUSE, P. Canadian clinical practice guidelines for glaucoma management: intended to be more permissive than prescriptive. *Can J Ophthalmol.* 44, 3:247-9, 2009.

RAMIREZ, M; DAVIDSON, EA; LUTTENAUER, L et al. The renin-angiotensin system in the rabbit eye. *J Ocul Pharmacol Ther.* 12, 3:299-312, 1996.

REITSAMER, HA; KIEL, JW; HARRISON, JM et al. Tonopen measurement of intraocular pressure in mice. *Exp Eye Res.* 78, 4:799-804, 2004.

REN, Y; GARVIN, JL; CARRETERO, OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 39, 3:799-802, 2002.

RESNIKOFF, S; PASCOLINI, D; ETYA'ALE, D et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*. 82, 11:844-51, 2004.

ROJANAPONGPUN, P; DRANCE, SM; MORRISON, BJ. Ophthalmic artery flow velocity in glaucomatous and normal subjects. *Brit J Ophthalmol*. 77, 1:25-29, 1993.

RUSK, C; SHARPE, E; LAURENCE, J et al. Comparison of the efficacy and safety of 2% dorzolamide and 0.5% betaxolol in the treatment of elevated intraocular pressure. Dorzolamide Comparison Study Group. *Clin Ther*. 20, 3:454-66, 1998.

SAETTONE, MF; SALMINEN, L. M.F. Ocular inserts for topical delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 16, 1995.

SAMPAIO, WO; HENRIQUE DE CASTRO, C; SANTOS, RA et al. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 50, 6:1093-8, 2007.

SANTOS, RAS; FERREIRA, AJ; SIMOES E SILVA, AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 93, 5:519-27, 2008.

SANTOS, RAS; SIMOES E SILVA, AC; MARIC, C et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceed Nat Academy Sci USA*. 100, 14:8258-63, 2003.

SAVASKAN, E; LUFFLER, KU; MEIER, F et al. Immunohistochemical localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in human ocular tissues. *Ophthalmic Res*. 36, 6:312-20, 2004.

SAVERGNINI, SQ; BEIMAN, M; LAUTNER, RQ et al. Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor. *Hypertension*. 56, 1:112-20, 2010.

SCHINDLER, C; BRAMLAGE, P; KIRCH, W et al. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag*. 3, 1:125-37, 2007.

SENANAYAKE, PD; DRAZBA, J; SHADRACH, K et al. Angiotensin II and Its Receptor Subtypes in the Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48, 7:3301-11, 2007.

SHAH, GB; SHARMA, S; MEHTA, AA et al. Oculohypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in acute and chronic models of glaucoma. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 36, 2:169-75, 2000.

SHAREEF, SR; GARCIA-VALENZUELA, E; SALIERNO, A et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*. 61, 3:379-82, 1995.

SHEN, F; ZHANG, L; LIU, T. Effects of angiotensin II on the 3H-TdR incorporation and synthesis of collagen in cultured bovine trabecular meshwork cells. *Yan Ke Xue Bao*. 17, 4:209-12, 2001.

SHIOTA, N; SAEGUSA, Y; NISHIMURA, K et al. Angiotensin II-generating system in dog and monkey ocular tissues. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 24, 3-4:243-8, 1997.

SNIGDHA, S; SMITH, ED; PRIETO, GA et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull*. 28, 1:14-24, 2012.

SRAMEK, SJ; WALLOW, IH; DAY, RP et al. Ocular renin-angiotensin: immunohistochemical evidence for the presence of prorenin in eye tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 29, 11:1749-52, 1988.

SRAMEK, SJ; WALLOW, IH; TEWKSBURY, DA et al. An ocular renin-angiotensin system. Immunohistochemistry of angiotensinogen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 33, 5:1627-32, 1992.

ROSS, MH; PAWLINA, W. *Histologia texto e atlas*. 6a ed. Guanabara Koogan, 2012.

TANAKA, M; OHNISHI, J; OZAWA, Y et al. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 207, 2:593-8, 1995.

TIGERSTEDT, R; BERGMAN, P. The kidneys and the circulation *Arch. Physiol*. 8:223-271, 1898.

TIKELLIS, C; JOHNSTON, CI; FORBES, JM et al. Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina. *Current Eye Research*. 29, 6:419-27, 2004.

TIPNIS, SR; HOOPER, NM; HYDE, R et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 275, 43:33238-43, 2000.

TORIS, C. Chapter 7 Aqueous Humor Dynamics Measurement Methods and Animal Studies. 62:193-229, 2008.

UEDA, J; SAWAGUCHI, J; HANYU, T et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink, *Jpn. J. Ophthalmol.* 42:337–344, 1998.

URCOLA, JH; HERNÁNDEZ, M; VECINO, E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 83, 2:429-37, 2006.

VAAJANEN, A; LAKKISTO, P; VIRTANEN, I et al. Angiotensin receptors in the eyes of arterial hypertensive rats. *Act Ophthalmol.* 88, 4:431-38, 2009.

VAAJANEN, A; VAPAATALO, H. Local ocular renin-angiotensin system - a target for glaucoma therapy? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 109, 4:217-24, 2011.

VAAJANEN, A; VAPAATALO, H; KAUTIAINEN, H et al. Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 6:2557-62, 2008.

VICKERS, C; HALES, P; KAUSHIK, V et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 277, 17:14838-43, 2002.

VITA, JB; ANDERSON, JA; HULEM, CD et al. Angiotensin-converting enzyme activity in ocular fluids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20, 2:255-7, 1981.

VORWERK, CK; HYMAN, BT; MILLER, JW et al. The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 10:2038-44, 1997.

WAGNER, J; DANSER, AHJ; DERKX, FHM et al. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: Evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Brit J Ophthalmol.* 80, 2:159-63, 1996.

WANG, RF; PODOS, SM; MITTAG, TW et al. Effect of CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *Exp Eye Res.* 80, 5:629-32, 2005.

WANG, RF; PODOS, SM; SERLE, JB et al. Effect of SPP 635, a renin inhibitor, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *Exp Eye Res.* 94, 1:146-49, 2012.

WEINREB, RN. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can J Ophthalmol.* 42, 3:396-8, 2007.

WEINREB, RN; KHAW, PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 363, 9422:1711-20, 2004.

WEINREB, RN; SANDMAN, R; RYDER, MI et al. Angiotensin-converting enzyme activity in human aqueous humor. *Arch Ophthalmol.* 103, 1:34-6, 1985.

WILKINSON-BERKA, JL; HEINE, R; TAN, G et al. Influences the vasculature, neurons and glia, and (pro)renin receptor expression in the retina. *Hypertension.* 55, 6:1454-60, 2010.

YANG, H; HIROOKA, K; FUKUDA, K et al. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 12:5800-04, 2009.

ZAMMATARO, A; SALETTI, R; CIVIALE, C et al. Simultaneous quantification of carteolol and dorzolamide in rabbit aqueous humor and ciliary body by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878, 9-10:807-14, 2010.

ZIMMER, A; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16:61–73, 1995.

ZINI, S; FOURNIE-ZALUSKI, MC; CHAUVEL, E et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 21:11968-73, 1996.

9 ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 11/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos da ativação da enzima conversora de angiotensina 2 endógena no glaucoma e na retinopatia diabética experimentais em ratos**", que tem como responsável(is) **Anderson José Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **27/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 11/2011**, related to the project entitled "**Effects of activation of the endogenous angiotensin converting enzyme 2 in glaucoma and diabetic retinopathy in rats**", under the supervisors of **Anderson José Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 27, 2011**.

This certificate expires in **April 27, 2016**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 –

Artigo publicado no periódico "Investigative Ophthalmology & Visual Science"
