

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAYS FERNANDA NUNES DOURADO

**EFEITO NEUROPROTETOR DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ARANHA ARMADEIRA
(*Phoneutria nigriventer*) EM DOENÇAS DA RETINA**

Belo Horizonte

2021

LAYS FERNANDA NUNES DOURADO

**EFEITO NEUROPROTETOR DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ARANHA ARMADEIRA
(*Phoneutria nigriventer*) EM DOENÇAS DA RETINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior

Coorientadora:

Dra. Carolina Nunes da Silva

Belo Horizonte

2021

D739e Dourado, Lays Fernanda Nunes.
Efeito neuroprotetor de peptídeos derivados da aranha armadeira
(*Phoneutria nigriventer*) em doenças da retina / Lays Fernanda Nunes
Dourado. – 2021.
199 f. : il.

Orientador: Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientadora: Carolina Nunes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Retina – Teses. 2. *Phoneutria nigriventer* – Teses. 3. Peptídeo –
Teses. 4. Retina – Doenças – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II.
Silva, Carolina Nunes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"EFEITO NEUROPROTETOR DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA ARANHA ARMADEIRA (*Phoneutria nigriventer*) EM DOENÇAS DA RETINA"

LAYS FERNANDA NUNES DOURADO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Jayter Silva de Paula

Universidade de São Paulo - USP

Dra. Mariane Izabella Abreu de Melo

Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN

Profa. Dra. Hilda Petrs Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Carolina Nunes da Silva - Coorientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 26 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Jayter Silva de Paula, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Renata Mortari, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Izabella Abreu de Melo, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando da Silva Cunha Junior, Membro**, em 26/03/2021, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Nunes da Silva, Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 06:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hilda Petrs Silva, Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0638399** e o código CRC **79F25BA7**.

Aos meus pais, meus irmãos e ao Túlio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me tornar resiliente e guiar toda a minha trajetória, por meio de pessoas que foram essenciais para a conclusão desta etapa.

Ao meu orientador, professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua sábia orientação. Agradeço pelas contribuições em minha formação, ensinando-me que a ciência, quando acompanhada da sabedoria, da humildade e da colaboração, frutifica.

À minha coorientadora, Dra. Carolina Nunes da Silva, pelo cuidado, carinho e amizade ao longo desses anos. O seu profissionalismo e a sua paixão pela ciência certamente fizeram total diferença para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Vinícius Viana, pela amizade, pelos cafés e pelos conselhos, que me motivaram a buscar sempre a melhor maneira de realizar um trabalho.

Aos colegas que passaram pelo nosso laboratório durante esses anos, pela oportunidade de dividir o dia a dia com vocês. Foram inúmeros aprendizados, que vão desde metodologia científica a astrologia. Em especial, gostaria de agradecer a Cibele, Raquel, Brenda, Nayara, Grazi, Cleildo, Pedro, Mayara, Marcela, Lucas e Thomas, por tanto momentos felizes em nossas comemorações.

Aos colaboradores, Dra. Maria Elena de Lima, Dra. Sílvia Fialho, Dr. Rodrigo Jorge, Dr. Rubens Siqueira, Dra. Flávia Rodrigues, Dra. Gracielle Andrade e Dra. Kláudia Silva, pelo auxílio. Todos contribuíram de maneira muito especial para o meu crescimento profissional. Agradeço também aos colegas que me permitiram participar de seus trabalhos.

A Dr. Ado Jorio, Dr. Ubirajara Ajero, Dra. Ana Paula Alves, Emerson Fonseca, Plínio Borges e Rafael Gonçalves, do departamento de física da UFMG, que contribuíram de diversas maneiras para a execução deste trabalho. Obrigada pelo auxílio, compreensão e oportunidade de trabalhar ao lado de vocês.

Aos mestres do LTF, pelo incentivo, pelo apoio e por transmitirem o conhecimento. Em especial, agradeço à Dra. Elaine, pelo carinho, preocupação e torcida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

Ao LCPNano, CAPI, Centro de Microscopia, Célula Vet, e todos os profissionais desses laboratórios, pela prontidão e eficiência com as quais me ajudaram na realização das análises.

À Dra. Lorena Rigo Gaspar, e a todo seu laboratório, pela recepção carinhosa e aprendizagem.

À Adelaide e ao Batista, pelo auxílio no trabalho com os animais e pelos momentos de descontração. Obrigada pelo carinho e incentivo nos momentos de cansaço.

Ao Marton, pela paciência com as demandas administrativas, amizade e conversas inspiradoras entre um experimento e outro.

A toda a minha família, meus sogros e meus amigos, que entenderam os meus períodos de ausência e contribuíram imensamente para a conclusão desta etapa, torcendo, me motivando e, principalmente, com suas companhias amorosas e acolhedoras.

Aos meus pais, primeiramente pelo exemplo. É de vocês que vem tanta inspiração para o trabalho. Agradeço também pelo amor incondicional, pela paciência, pelo incentivo. Sou extremamente feliz e orgulhosa da família que vocês dois construíram.

Ao Igor, pela motivação e por me fazer acreditar no quão incrível era o que eu estava realizando. À Lara, que me inspira pessoal e profissionalmente, pela força e zelo. À Maria Fernanda, pela companhia e paciência nos dias de cansaço extremo. Obrigada por comemorar comigo cada pequena vitória.

Ao Túlio, minha escolha de vida. Eu tenho certeza de que sem o seu apoio eu não teria conseguido. Você insistiu muito para eu continuar e acreditou mais em mim do que eu mesma. Muito obrigada por todo amor e cuidado.

RESUMO

A retina é um tecido com alta demanda energética e o seu funcionamento envolve a ativação de inúmeras cascatas de sinalização. Dessa forma, eventos capazes de comprometer essas vias levam a um aumento no estresse oxidativo e desencadeiam processos inflamatórios que resultam em patologias, como a degeneração macular relacionada à idade e o glaucoma. Nesse cenário, os peptídeos derivados de toxinas da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* têm se destacado por apresentar atividade farmacológica por meio de mecanismos associados a efeitos neuroprotetores. Logo, o objetivo deste trabalho foi investigar a segurança e a atividade neuroprotetora de peptídeos derivados da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* em doenças oculares neurodegenerativas e avaliar a eficácia de uma formulação nanoestruturada na melhora da biodisponibilidade destes peptídeos. Inicialmente, investigou-se a segurança do uso intravítreo dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 e constatou-se que a dose mais segura seria a de 1,25 µg/mL, assim, esta foi utilizada nos testes posteriores. O estudo de degeneração da retina promovida pela luz do LED azul revelou que um pré-tratamento com PnPa11 ou PnPa13 foi responsável por uma preservação da amplitude das ondas a e b (resposta das células de Müller, células bipolares e fotorreceptores), efeito que também foi observado nas análises morfológicas. O estudo de western blot reiterou a hipótese de que estes peptídeos protegeram a retina minimizando a apoptose induzida pela luz do LED azul. Posteriormente, foram analisadas a segurança do uso tópico e a atividade neuroprotetora do PnPP-19, um peptídeo doador do óxido nítrico (NO). Os resultados obtidos mostraram que o peptídeo não desencadeou sinais de toxicidade nas doses testadas. Ademais, observou-se que o PnPP-19 foi capaz de permear as camadas da córnea, promover a liberação de NO e, conseqüentemente, reduziu a PIO. Na avaliação da atividade neuroprotetora, observou-se que um pré-tratamento com o PnPP-19 foi capaz prevenir os danos na retina induzidos pela isquemia. Assim, supõe-se que o efeito neuroprotetor desse peptídeo seja estabelecido devido a uma associação entre o efeito hipotensivo e efeitos antioxidantes estabelecidos pelo aumento na produção do NO. Assim, avaliou-se a eficácia de um sistema nanorreservatório de fármacos na melhora da entrega ocular desse peptídeo. Nossos resultados revelaram que o nanowafer foi capaz de prolongar a entrega do PnPP-19 na superfície ocular em comparação ao colírio. Esse efeito foi observado devido a um aumento na fluorescência da superfície ocular quando se utilizou o nanowafer preenchido com fluoresceína e pela melhora do efeito hipotensivo do PnPP-19, veiculado por meio do dispositivo. Quando se investigou a capacidade do nanowafer em otimizar a entrega do peptídeo para o segmento posterior, notou-se que ele promoveu um aumento na biodisponibilidade do PnPP-19 nesses tecidos. Os resultados obtidos possibilitam uma nova perspectiva no tratamento de doenças degenerativas da retina e abrem caminhos para o

estudo e a aplicação de peptídeos na terapêutica oftalmológica. Além disso, o dispositivo estudado se mostrou promissor e foi capaz de fornecer um tratamento não invasivo que permitiu uma melhora na biodisponibilidade de peptídeos para os tecidos oculares.

Palavras-chave: Retina. Neuroproteção. *Phoneutria nigriventer*. Peptídeo. Nanowafer.

ABSTRACT

The retina is highly demanding energetically, and its functioning comprises the activation of several signaling cascades. Therefore, events that undermine such cascade processes lead to the increase of the oxidation stress and give rise to inflammatory processes resulting in pathologies such as the age-related macular degeneration and glaucoma. In view of this, peptides derived from the venom of the *Phoneutria nigriventer* spider have stood out for presenting pharmacological action through mechanisms associated to neuroprotective effects. Hence, the goal of the present work was to investigate the safety and the neuroprotectant action of peptides derived from the venom of the *Phoneutria nigriventer* spider in ocular neurodegenerative diseases and evaluate the efficacy of a nanostructured formulation in the improvement of the bioavailability of peptides. A wide range of doses of the PnPa11 and PnPa13 was tested, and the 1.25 µg/mL concentration was determined to be the safest and was therefore utilized in the subsequent tests. The studies on the retina degeneration promoted by the blue LED light revealed that both selected peptides were able to protect the retina from the induced damage. The analysis of the electroretinogram showed larger preservation of the amplitude of the a and b waves (response of Müller cells, bipolar cells and photoreceptors) and this effect was also observed in the morphological analysis. The western blot analyses reinforce the hypothesis that such peptides are able to protect the retina against apoptosis. In a second approach, the neuroprotectant activity of PnPP-19, a nitric oxide (NO) donor peptide, and the safety of its use were analyzed. The obtained results showed that PnPP-19 did not induce toxicity signs in tested doses. Besides, the assay of PnPP-19 tagged with FITC showed that this peptide can permeate the cornea layers. Moreover, it was observed that the peptide was capable of promoting NO release, leading to the reduction of the intraocular pressure (IOP). During the evaluation of the neuroprotective activity of such peptide, it was observed that a pre-treatment with the PnPP-19 was able to avoid induced damages in the retina through ischemia. Thus, it is supposed that the neuroprotective effect of the PnPP-19 by an association of the hypotensive effect and the antioxidation effects by the increase of NO production. Thus, the efficacy of a system of drug nano-reservoir in the ocular delivery of the peptide was tested. The device was able to extend the peptide delivery in the ocular surface. This effect was noted through a rise in the fluorescence of the ocular surface and an improvement of the hypotensive capacity of the peptide. We also observed the capability of the device to increase the bioavailability of this peptide for a posterior segment. Our results enable a new perspective in the treatment of degenerative diseases in the retina and point to uncountable pathways for the use of peptides in ocular diseases. The studied device is promising, as it is capable to offer an improved non-invasive treatment that can increase the bioavailability of the peptides for the ocular tissues.

Key words: Retina. Neuroprotection. *Phoneutria nigriventer*. Peptide. Nanowafer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Descrição anatômica do olho humano	25
Figura 2 – Estrutura anatômica da córnea	26
Figura 3 – Anatomia da circulação orbital	30
Figura 4 – Número anual de publicações contendo os termos de pesquisa “oxidative stress AND retina” ou “inflammation AND retina” entre 2000 – 2020.....	32
Figura 5 – Patogênese da DMRI.....	33
Figura 6 – Drenagem do humor aquoso e o glaucoma	35
Figura 7 – Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos	41
Figura 8 – <i>Phoneutria nigriventer</i> , a aranha armadeira	43
Figura 9 – Representação da estrutura da toxina PnTx2-6 e do peptídeo PnPP-19	46
Figura 10 – Sequências das toxinas identificadas na fração PnTx4 da peçonha da <i>Phoneutria nigriventer</i>	47
Figura 11 – Rotas de absorção e eliminação de fármacos no olho	52
Figura 12 – Avaliação funcional da retina por ERG.....	65
Figura 13 – Padrões de avaliação eletrofisiológica da retina.....	66
Figura 14 – Procedimentos para avaliação da toxicidade do uso intravítreo do PnPa11 e PnPa13.....	67
Figura 15 – Citotoxicidade dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 sobre células ARPE-19.....	72
Figura 16 – Estrutura e quantificação da rede vascular da CAM após tratamento com PnPa11 e PnPa13 em diferentes doses (0,50 - 5,00 µg/mL).....	75
Figura 17 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnPa11 ou PnPa13, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	77
Figura 18 – Média ± DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnPa11 ou PnPa13, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	78
Figura 19 – Avaliação da PIO e fundo de olho de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnPa11 ou PnPa13.....	80
Figura 20 – Análise histológica das camadas da retina de olhos que receberam injeção intravítrea de PnPa11 ou PnPa13 na dose de 5,00 µg/mL.....	81

Figura 21 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	83
Figura 22 – Média ± DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	85
Figura 23 – Análise da ultraestrutura de células da retina em olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul.....	87
Figura 24 – Análise histológica da retina em olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul.....	88
Figura 25 – Avaliação da morte celular na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul por ensaio TUNEL.....	89
Figura 26 – Avaliação da expressão Erk1/2 e Akt1 na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul.....	91
Figura 27 – Avaliação da expressão de NR2A e NR2B na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul.....	92
Figura 28 – Avaliação da irritação ocular por HET-CAM.....	102
Figura 29 – Fotografias representativas obtidas durante o ensaio de HET-CAM dos grupos que receberam PnPP-19 (40, 80, 160 e 320 µg) e os controles positivo (NaOH 0,1 M) e negativo (solução salina 0,9%), registradas após 300 s.....	107
Figura 30 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos que receberam aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 µg) após os estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻² antes e após 1, 7 e 15 dias.....	110
Figura 31 – Média ± DP da amplitude e tempo implícito referente às curvas a e b na condição escotópica antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 µg).....	111
Figura 32 – Imagens do fundo de olho antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 µg).....	113
Figura 33 – Avaliação histológica da córnea e da retina 15 dias após aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 ou 160 µg).....	114
Figura 34 – Permeação de PnPP-19 (80 µg/olho) através da córnea.....	115
Figura 35 – Efeito da instilação de PnPP-19 (80 µg/olho) na concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) em tecidos do segmento anterior do olho.....	116
Figura 36 – Avaliação da PIO em ratos normotensos após aplicação tópica do PnPP-19 (80 µg/olho).....	118
Figura 37 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos pré-tratados com o PnPP-19 e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	122

Figura 38 – Médias \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos pré-tratados com o PnPP-19 e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻² ...	123
Figura 39 – Análise histológica em olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia	126
Figura 40 – Etapas de preparo do nanowafer	134
Figura 41 – Análise morfológica dos moldes de silício, PDMS e do nanowafer de PVA.....	139
Figura 42 – Avaliação do grau de intumescimento dos nanowafers de PVA.....	141
Figura 43 – Estimativa do tempo de residência da fluoresceína a partir do nanowafer de PVA em comparação ao colírio.....	143
Figura 44 – Análise da eficácia do nanowafer contendo PnPP-19 na redução da PIO.....	145
Figura 45 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos pré-tratados com veículo ou PnPP-19 (80 μ g/olho) por meio de colírio ou nanowafer e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela isquemia, após estímulos luminosos 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻² ..	147
Figura 46 – Médias \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos pré-tratados com veículo ou PnPP-19 (80 μ g/olho) por meio de colírio ou nanowafer e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m ⁻² e 3,0 cd.s.m ⁻²	148
Figura 47 – Análise histológica 7 dias após indução da isquemia para os grupos pré-tratados com veículo e PnPP-19 (80 μ g/olho) por meio de colírio ou nanowafer, comparados a animais saudáveis	150
Figura 48 – Imagens representativas da córnea e retina destacando a fluorescência promovida por PnPP-19 marcado com FITC a partir do colírio ou do nanowafer	152
Figura 49 – Quantificação da fluorescência referente ao PnPP-19 marcado com FITC na córnea e retina a partir do colírio ou do nanowafer	153
Figura 50 – Imagens representativas da malha trabecular em olho tratados com PnPP-19 marcado com FITC a partir do colírio ou do nanowafer.....	154
Figura 51 – Fluorescência residual do PnPP-19 marcado com FITC presente no nanowafer após estudo de permeação in vivo.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore total obtido no ensaio de HET-CAM e classificação do grau de irritação para os grupos que receberam PnPP-19 (40, 80, 160 e 320 µg) e os controles positivo (NaOH 0,1 M) e negativo (solução salina 0,9%) 108

Tabela 2 – A espessura das camadas da retina e contagem de células ganglionares em olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia 127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação clínica de gravidade dos acidentes causados por aranhas <i>Phoneutria nigriventer</i>	43
Quadro 2 – Lista de biofármacos aprovados pela FDA.....	50
Quadro 3 – Sistemas de liberação controlada destinados a proteínas e peptídeos terapêuticos para o tratamento de doenças oculares.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AKT	Proteína quinase B
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
ARPE-19	Linhagem imortalizada do epitélio pigmentado da retina humana
ARVO	do inglês <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BDNF	do inglês <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
CAM	do inglês <i>Chick Chorioallantoic Membrane</i>
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CCG	Camada de células ganglionares
cd.s.m ⁻²	Candelas por segundo por metro quadrado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulose
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
COX	Ciclooxigenase
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
CREB	do inglês <i>cAMP response element-binding protein</i>
Da	Daltons
DAPI	do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMRI	Degeneração macular relacionada à Idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EPR	Epitélio pigmentar da retina
ERG	Eletrorretinograma

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS - CONTINUAÇÃO

ERK1/2	do inglês <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceína-5-Isotiocianato
g	Gramas
GI	Grau de intumescimento
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HET-CAM	do inglês <i>Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane</i>
HPMC	Hidroxipropil-metil-celulose
hs	Horas
i.c.	Intracerebroventricular
ICCVAM	do inglês <i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
IIO	Índice de irritação ocular
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
ISCEV	do inglês <i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
LED	do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MALDI-TOF/TOF	do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Massa molar

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS - CONTINUAÇÃO

Ms	Massa do filme seco
ms	Milissegundo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Mu	Massa do filme úmido
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Enzima oxido nítrico sintase neuronal
NO	do inglês nitric oxide
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintases
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PIO	Pressão Intraocular
PnPa11	<i>Phoneutria nigriventer</i> Peptídeo antinociceptivo, contendo 11 resíduos de aminoácidos
PnPa13	<i>Phoneutria nigriventer</i> Peptídeo antinociceptivo, contendo 13 resíduos de aminoácidos
PnPP-19	<i>Phoneutria nigriventer</i> Peptídeo Potencializador, contendo 19 resíduos de aminoácidos
PSA	Penicilina - estreptomicina -anfotericina B
PVA	Poli(Álcool Vinílico)
PVP	Polivinilpirrolidona
RIPA	do inglês <i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
S	Segundos
SDS-PAGE	do inglês <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SRB	do inglês <i>Sulforhodamine B</i>
SUS	Sistema único de saúde

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS - CONTINUAÇÃO

TUNEL	do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
μL	Microlitros
μM	Micromolar
~	Aproximadamente

Sumário

1 JUSTIFICATIVA.....	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Anatomia e fisiologia do olho	25
2.1.1 Segmento anterior.....	25
2.1.2 Segmento posterior.....	27
2.2 Barreiras oculares.....	28
2.2.1 Barreiras anatômicas.....	28
2.2.2 Barreiras fisiológicas	29
2.3 Suprimento sanguíneo ocular	29
2.4 Isquemia retiniana.....	31
2.4.1 Degeneração macular relacionada a idade	32
2.4.2 Glaucoma.....	34
2.5 Alvos terapêuticos para o tratamento de doenças degenerativas da retina.....	36
2.5.1 O papel do glutamato	36
2.5.2 O papel do óxido nítrico.....	38
2.6 Potenciais estratégias terapêuticas nas doenças isquêmicas da retina	39
2.7 Peptídeos	39
2.7.1 Peptídeos antimicrobianos	40
2.7.2 Peptídeos encontrados em peçonhas animais	41
2.7.3 <i>Phoneutria nigriventer</i> , sua peçonha e peptídeos.....	42
2.8 Peptídeos e o desenvolvimento de novos fármacos	49
2.9 Fatores que afetam a biodisponibilidade intraocular de fármacos	50
2.10 Administração tópica de fármacos para o segmento posterior do olho.....	53
2.11 Nanowafers.....	55
OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo geral.....	57
3.2 Objetivos Específicos.....	57
PARTE I: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE NEUROPROTETORA NO USO INTRAVÍTREO DOS PEPTÍDEOS PnPa11 E PnPa13 DERIVADOS DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DA ARANHA <i>PHONEUTRIA NIGRIVENTER</i>	58
1 INTRODUÇÃO.....	59

2 MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1 Materiais	60
2.1.1 Peptídeos	60
2.1.2 Teste de viabilidade celular	60
2.1.3 Avaliação da atividade antiangiogênica em membrana corioalantóica de galinha ...	60
2.1.4 Avaliação da toxicidade in vivo	61
2.1.5 Avaliação da atividade neuroprotetora in vivo.....	61
2.2 Equipamentos.....	61
2.3 Animais.....	62
2.4 Métodos.....	62
2.4.1 Ensaio de proliferação celular utilizando a sulforrodamina B (SRB)	62
2.4.2 Ensaio CAM	63
2.4.3 Estudo da toxicidade in vivo.....	64
2.4.5 Estudo de degeneração retiniana	68
2.5 Análise estatística	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1 Ensaio de viabilidade celular em células ARPE-19	71
3.2 Avaliação da atividade angiogênica dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 em membrana corioalantóica de embrião de galinha.....	73
3.3 Avaliação da segurança do uso intravítreo de PnPa11 e PnPa13.....	76
3.3.1 Estudo funcional da retina por ERG	76
3.3.2 Avaliação da PIO e do fundo de olho	79
3.3.3 Análise histológica.....	81
3.4 Avaliação da atividade neuroprotetora dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 em modelo de degeneração retiniana induzida por LED azul.....	82
3.4.1 Estudo eletrofisiológico da retina.....	83
3.4.2 Estudo morfológico das camadas da retina	86
3.4.3 Análises de western blot.....	90
4 CONCLUSÃO	94
PARTE II: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO PEPTÍDEO PnPP-19 DERIVADO DE UMA TOXINA PRESENTE NA PEÇONHA DA ARANHA <i>PHONEUTRIA NIGRIVENTER</i>	96
1 INTRODUÇÃO.....	97
2 MATERIAIS E MÉTODOS	99
2.1 Materiais	99

2.1.1 Peptídeo.....	99
2.1.2 HET-CAM.....	99
2.1.3 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	99
2.2 Equipamentos.....	100
2.3 Animais.....	100
2.4.1 Preparação da solução para o peptídeo PnPP-19.....	100
2.4.2 Avaliação do potencial de irritação ocular.....	101
2.4.3 Estudo da toxicidade <i>in vivo</i>	102
2.4.4 Estudo de permeação do PnPP-19	103
2.4.5 Avaliação da liberação de nitrito por PnPP-19.....	104
2.4.6 Avaliação da atividade do PnPP-19 na PIO.....	104
2.4.7 Estudo da atividade neuroprotetora do PnPP-19.....	105
2.5 Análise estatística	106
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
3.1 Avaliação da irritação ocular de PnPP-19 pelo ensaio HET-CAM	107
3.2 Avaliação da segurança do uso ocular tópico do PnPP-19	109
3.2.1 Estudo funcional da retina por ERG	109
3.2.2 Avaliação da superfície ocular e do fundo de olho.....	112
3.2.3 Análise histológica.....	114
3.3 Investigação da permeação do PnPP-19 pela aplicação tópica	115
3.4 Estudo da liberação de NO promovida pelo uso tópico do PnPP-19.....	116
3.5 Avaliação da atividade do PnPP-19 na PIO	117
3.6 Estudo da atividade neuroprotetora do PnPP-19	119
3.6.1 Estudo eletrorretinográfico de animais pré-tratados com PnPP-19 e submetidos a isquemia.....	120
3.6.2 Análise histológica de animais pré-tratados com PnPP-19 e submetidos a isquemia	126
4 CONCLUSÃO	129
PARTE III: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA RESERVATÓRIO PARA ENTREGA OCULAR DE PEPTÍDEOS	130
1 INTRODUÇÃO.....	131
2 MATERIAIS E MÉTODOS	132
2.1 Materiais	132
2.1.2 Peptídeo.....	132
2.1.3 Preparo e caracterização do nanowafer	132

2.2 Equipamentos.....	133
2.3 Métodos.....	133
2.3.1 Preparação do nanowafer de PVA	133
2.3.2 Análise morfológica	135
2.3.3 Avaliação do pH da superfície.....	135
2.3.4 Análise de intumescência do nanowafer.....	135
2.3.5 Estudos de liberação <i>in vivo</i>	136
2.3.6 Avaliação da redução da PIO.....	137
2.3.7 Estudo da atividade neuroprotetora.....	137
2.3.8 Estudo de permeação <i>in vivo</i>	138
2.4 Análise estatística.....	138
3 RESULTADOS	139
3.1 Análise da morfologia	139
3.2 Avaliação do pH de superfície.....	140
3.3 Perfil de intumescimento do nanowafer de PVA.....	140
3.4 Avaliação do tempo de residência do nanowafer na superfície ocular	142
3.5 Eficácia <i>in vivo</i> do nanowafer de PVA contendo PnPP-19	144
3.5.1 Avaliação da PIO.....	144
3.5.2 Avaliação do efeito neuroprotetor.....	146
4 CONCLUSÃO	156
PERSPECTIVAS	158
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO.....	159
Artigos científicos publicados relacionados a tese	159
Artigos científicos publicados não relacionados a tese	159
Trabalhos apresentados em eventos científicos relacionados a tese.....	160
Trabalhos apresentados em eventos científicos não relacionados a tese	161
Pedidos de patente depositados relacionados a tese	162
Pedidos de patente depositados não relacionados a tese	162
Premiação	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

ANEXO 1: COMPROVANTE DE CADASTRO DO PROJETO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (N° AF2229D)	188
ANEXO 3: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO IN VIVO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG (N° 325/2017).....	190
ANEXO 4: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO IN VIVO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG (N° 107/2018).....	191
ANEXO 5:COMPROVANTE DE CADASTRO DO PROJETO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (N° A9C5260)	192
.....	192
ANEXO 6:CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO IN VIVO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG (N° 203/2018).....	193
ANEXO 7:CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO IN VIVO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG (N° 171/2019).....	194
ANEXO 8: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DO ESTUDO IN VIVO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG (N° 198/2020).....	195
ANEXO 9: PUBLICAÇÃO RELACIONADA AO TRABALHO	196

1 JUSTIFICATIVA

A neuroproteção é um processo que contribui para o resgate, recuperação ou regeneração da estrutura e função de células do sistema nervoso (VAJDA, 2002). Para sistema ocular, o termo neuroproteção refere-se a eventos ocorridos após o insulto original ao nervo óptico e células nervosas na retina, o que significa que uma substância neuroprotetora atua em eventos degenerativos secundários (BARKANA; BELKIN, 2004). Isso se justifica, pois independentemente da natureza do insulto primário (mecânico, isquêmico, degenerativo, etc.), os danos neuronais se espalham para as células nervosas adjacentes, caracterizando a lesão secundária (LYNCH; DAWSON, 1994; OSBORNE; NEVILLE, 2012).

Diversos compostos foram apontados como mediadores neurotóxicos da degeneração secundária. Estes incluem aminoácidos excitatórios (por exemplo, glutamato), radicais livres, NO, produtos de peroxidação lipídica e opioides. Assim, substâncias que impedem a formação ou antagonizam a ação desses compostos têm sido investigadas como potenciais neuroprotetores (BARKANA; BELKIN, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2017).

Nesse cenário, a pesquisa de peptídeos de origem animal tem emergido como uma alternativa promissora para busca de novos medicamentos. Geralmente, essas biomoléculas são capazes de exercer ações antioxidantes e antiinflamatórias, ou ainda podem limitar o glutamato extracelular, promovendo, assim, a sobrevivência neuronal da retina. A exemplo disso, peptídeos derivados da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* têm se destacado por atuarem em vias de sobrevivência celular (AGOSTINI *et al.*, 2011; EMERICH *et al.*, 2016; FONSECA *et al.*, 2016; OLIVEIRA, *et al.*, 2019), o que indica um possível efeito benéfico desses peptídeos no processo de degeneração da retina.

No entanto, a investigação de possíveis abordagens terapêuticas baseadas em peptídeos conta com algumas limitações. Um desses problemas é representado pela baixa biodisponibilidade em razão da sua rápida degradação no ambiente extracelular (CERVIA; CATALANI; CASINI, 2019). Assim, um avanço significativo nesse campo pode vir da junção de peptídeos a novas formulações capazes de facilitar a entrega de peptídeos, o que proporcionaria uma melhora na farmacocinética do peptídeo e na eficácia terapêutica (MANDAL *et al.*, 2018).

Dado o exposto, o trabalho desenvolvido apresenta, inicialmente, uma investigação sobre a segurança e o efeito neuroprotetor de peptídeos derivados da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* em olhos de ratos, após insultos degenerativos. Em um segundo momento, foi avaliada a eficácia de um dispositivo reservatório para melhorar a entrega de peptídeos para os tecidos oculares.

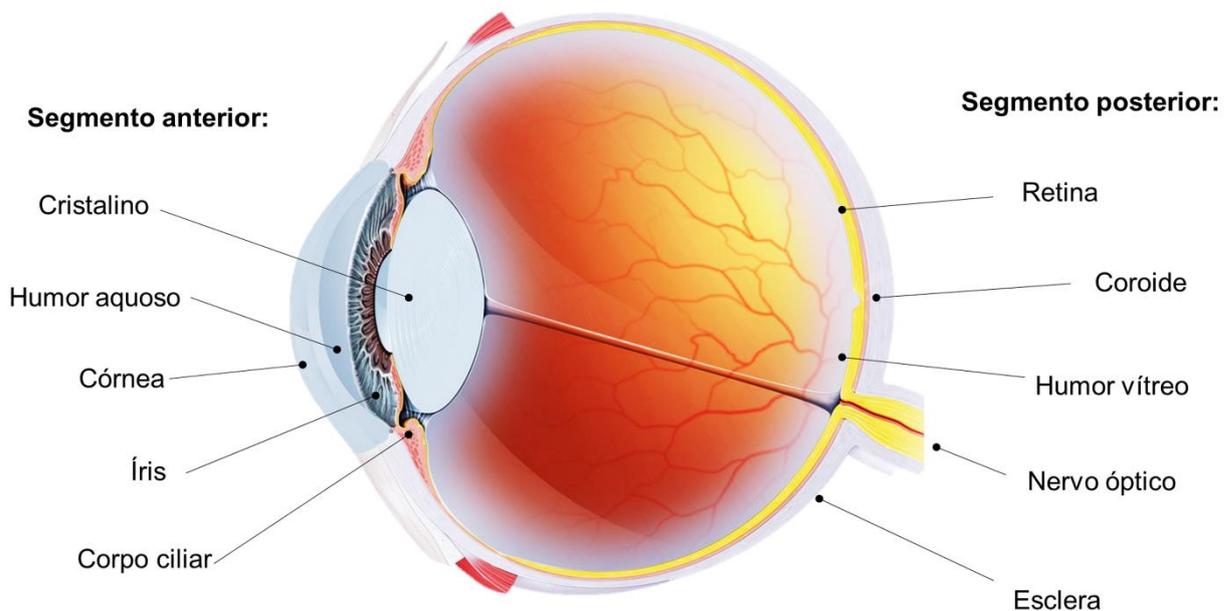
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e fisiologia do olho

O olho humano é um órgão par composto por uma estrutura capaz de detectar e interpretar os estímulos luminosos do ambiente (COSTANZO, 2014; ROGERS, 2014). O globo ocular é uma esfera com 2,5 cm de diâmetro e 7,5 g e está localizado na cavidade óssea, denominada órbita. Esse órgão do corpo humano pode ser dividido anatomicamente em dois segmentos principais, como se vê na **Figura 1**:

- Segmento anterior: córnea, íris, corpo ciliar, canal de Schlemm, cristalino e humor aquoso.
- Segmento posterior: esclera, coroide, retina, humor vítreo e nervo óptico.

Figura 1 – Descrição anatômica do olho humano

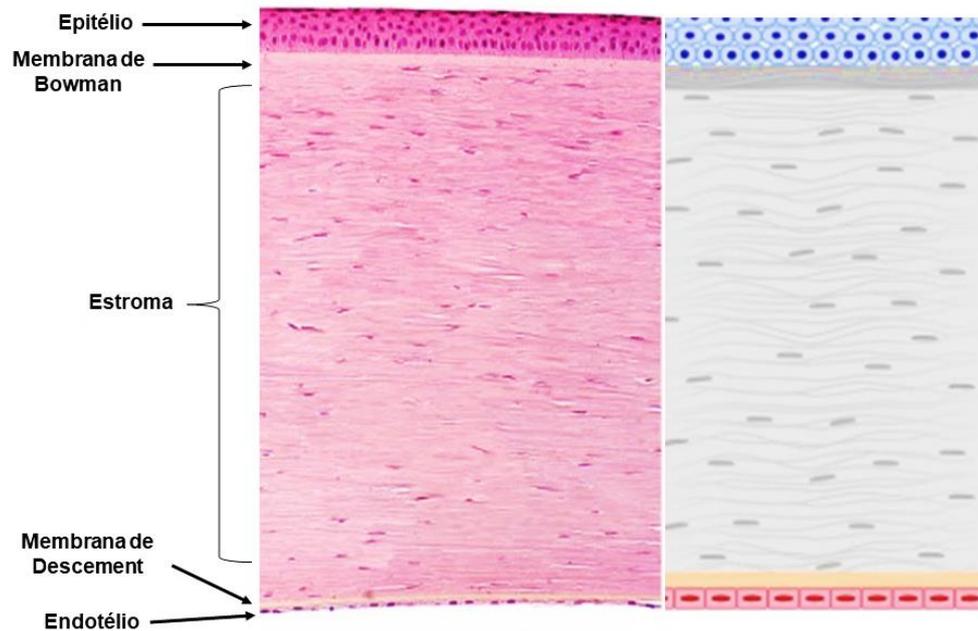


Fonte: Do autor.

2.1.1 Segmento anterior

A córnea é um tecido fino e transparente que permite a passagem de luz para o interior do olho, além de proteger contra a entrada de organismos externos (GANDHI; JAIN, 2015). A camada mais externa é denominada epitélio e apresenta uma natureza lipofílica. Abaixo, tem-se a membrana de Bowman, o estroma (caráter hidrofílico), a membrana de Descemet e o endotélio, camada mais interna, que está em contato com o humor aquoso (**Figura 2**). A córnea é um tecido avascular nutrido pelo humor aquoso, pelo filme lacrimal e por difusão de nutrientes presentes nos vasos sanguíneos do limbo (GANDHI; JAIN, 2015).

Figura 2 – Estrutura anatômica da córnea



Fonte: Do autor.

A conjuntiva é uma membrana que reveste internamente as pálpebras e cobre a superfície anterior do olho até a córnea. Essa membrana é formada por duas camadas: epitelial e estroma. Na camada epitelial estão localizadas as células caliciformes, que são responsáveis pela produção de mucina, um componente do filme lacrimal (COSTANZO, 2014). No estroma estão localizadas glândulas que contribuem para a formação das camadas aquosa e lipídica do filme lacrimal. Assim, por meio do filme lacrimal, a conjuntiva é capaz de proteger a superfície ocular de danos externos, microrganismos e dificulta a permeação de fármacos (LOFTSSON *et al.*, 2008).

A íris é uma estrutura interna, circular e possui uma região central, denominada pupila, que se contrai com o objetivo de controlar a quantidade de luz que entra no olho. As diferenças de cor na íris refletem as variações individuais da quantidade de melanócitos localizados em sua parte mais interna (COSTANZO, 2014).

O corpo ciliar está localizado entre a raiz da íris e a retina, e tem como função a acomodação visual por meio do músculo ciliar e da secreção do humor aquoso. Essa estrutura é formada por duas partes: a parte anterior, ou pregueada, e a parte posterior, também conhecida como plana. O humor aquoso é um líquido incolor constituído por água e sais que tem a função de nutrir a córnea e o cristalino, além de regular a pressão interna do olho. Após secretado, o humor aquoso flui do segmento posterior, atravessa a pupila e chega à câmara anterior, de

onde sai do olho, principalmente, pela rede trabecular e pelo canal de Schlemm (ROGERS, 2014).

O cristalino é uma lente natural do olho que possui uma estrutura biconvexa transparente, com aproximadamente 10 mm de diâmetro (TORTORA, 2003). Localizado atrás da íris, ele é formado por uma rede de fibras elásticas, o que o torna flexível e lhe permite modificar o seu formato para focalizar objetos em diferentes distâncias. Com o avanço da idade, o cristalino passa a ser menos elástico e a acomodação realizada pelos músculos ciliares torna-se menos eficaz, dificultando a visão para perto (TORTORA, 2003; PIERSCIONEK *et al.*, 2015).

2.1.2 Segmento posterior

No segmento posterior, a esclera é a parte branca do globo ocular. Ela é formada por fibras de colágeno altamente resistentes e por isso é responsável por manter a estrutura esférica do globo ocular, suportando a pressão interna do olho (COSTANZO, 2014).

A coróide é uma camada rica em vasos sanguíneos e exerce funções importantes, como suprir as células da retina de oxigênio e de nutrientes, ambos necessários para a sua manutenção. Essa camada está localizada entre a retina e a esclera e estende-se do corpo ciliar até o nervo óptico (ANAND-APTE; HOLLYFIELD, 2010).

O humor vítreo é uma substância gelatinosa, composta basicamente por água (~ 98%), colágeno tipo II e ácido hialurônico. O vítreo está presente no segmento posterior do olho, entre o cristalino e a retina, e é responsável por manter o formato do olho, absorver impactos sofridos no globo ocular e evitar o deslocamento de retina (XU *et al.*, 2000).

A retina está localizada no segmento posterior do olho e possui uma espessura variável (entre 0,1 e 0,5 mm). Constitui um tecido formado por células neuronais sensíveis à luz, que transformam a luminosidade em um sinal elétrico enviado ao cérebro por meio do nervo óptico. Na retina, há ainda uma região denominada mácula, responsável pela visão nítida. Em seu centro, tem-se uma área altamente especializada denominada "fóvea", responsável pela visão de alta qualidade. O restante da retina é responsável pela visão periférica (ROGERS, 2014).

Existem dois tipos de células sensíveis à luz na retina: os cones e os bastonetes. Os cones têm pigmentos, chamados iodopsinas, que absorvem diferentes comprimentos de onda, o que possibilita a percepção de cores. No olho humano, há a presença de cones "azuis", "verdes" e "vermelhos", com picos de absorbância em 425 nm, 530 nm e 560 nm, respectivamente. Os bastonetes possuem um pigmento conhecido como rodopsina, capaz de absorver a luz com absorbância em torno de 496 nm. Além disso, essas estruturas têm função de visão sob luz fraca. Quando os cones e os bastonetes são atingidos pela luz, o pigmento fotossensível neles

presente é transformado quimicamente pelo processo de fotoisomerização, dando início a fototransdução (NATHANS; THOMAS; HOGNESS 1986; PRESLAND; PRICE, 2017).

2.2 Barreiras oculares

O olho humano é um órgão isolado, no qual a entrada de agentes externos é bastante dificultada. Os fármacos são impedidos de atingir os tecidos oculares por meio de barreiras oculares estáticas e dinâmicas. Assim, uma tarefa desafiadora no tratamento de doenças que afetam os tecidos oculares (anteriores e posteriores) é superar esses obstáculos e fornecer o tratamento de forma eficiente para o tecido ocular-alvo (CHOLKAR *et al.*, 2013). Em geral, essas barreiras podem ser classificadas como anatômicas e fisiológicas.

2.2.1 Barreiras anatômicas

As barreiras anatômicas são capazes de limitar a entrada de fármacos e/ou agentes invasores no interior do olho por meio dos tecidos que compõe esse órgão (URTTI, 2006). No segmento anterior, o epitélio da córnea é formado por células epiteliais justapostas, formadas da região periférica até o centro, onde estão presentes junções que limitam com maior eficácia a permeação de substâncias externas. Dessa forma, fármacos lipofílicos que apresentam uma maior afinidade com as células epiteliais possuem maior permeabilidade se comparados a fármacos hidrofílicos (GAUDANA *et al.*, 2010). Por outro lado, a conjuntiva apresenta uma área muito vascularizada, capaz de absorver grande quantidade de fármacos hidrofílicos, além de captar moléculas com um tamanho maior, como proteínas e peptídeos (MANDAL *et al.*, 2018)

No segmento posterior do olho a permeabilidade da esclera diminui com o aumento do tamanho da molécula (OLSEN *et al.*, 1995). A lipofilicidade afeta a permeabilidade de forma significativa, porém moléculas hidrofílicas apresentam uma maior permeação, uma vez que se difundem melhor nos proteoglicanos e na matriz das fibras de colágeno (CRUYBERG *et al.*, 2002). Além disso, a espessura da esclera varia de acordo com a localização anatômica. O segmento posterior apresenta uma esclera mais espessa, e por isso a permeabilidade para moléculas terapêuticas é muito baixa (CHOLKAR *et al.*, 2013).

O epitélio pigmentar da retina (EPR) apresenta células justapostas, o que limita a entrada de fármacos e moléculas para a retina. Ademais, os fármacos podem atravessar o EPR por permeação passiva e/ou transporte ativo, dependendo da dose, da expressão e localização dos transportadores e da afinidade para com a proteína transportadora (RAMSAY *et al.*, 2019). O EPR é uma barreira mais rígida do que a esclera para moléculas hidrofílicas e grandes (PITKÄNEN *et al.*, 2005).

A vasculatura da coroide é responsável pela eliminação de substâncias que chegam até essa membrana e, assim, constituem uma barreira importante para a permeação de moléculas da superfície do olho para a retina e o humor vítreo. Esse mecanismo contribui para a uma baixa disponibilidade de fármacos para o interior do olho, e por isso doenças crônicas da retina e da coroide requerem tratamentos com doses elevadas (RANTA *et al.*, 2010).

Outra barreira existente é a mucina, um gel viscoso que exerce papel de proteção ao olho. A mucina forma uma camada na superfície da córnea e conjuntiva, o que pode interferir na absorção de fármacos destinado ao uso tópico (FALAVIGNA *et al.*, 2020; GAUDANA *et al.*, 2010).

2.2.2 Barreiras fisiológicas

Os medicamentos oftálmicos são administrados principalmente por via tópica. Uma grande fração (~ 90%) dos fármacos administrados por essa via é eliminada pela drenagem lacrimal, através dos ductos nasolacrimais, o que também contribui para a baixa permeação da droga para o interior do olho (LOFTSSON *et al.*, 2008).

As lágrimas são produzidas de forma contínua pelas glândulas lacrimais e esse líquido é renovado com o piscar dos olhos, promovendo a formação da nova película. Esse movimento natural provoca a diluição dos fármacos administrados, o que reduz sua concentração (CHOLKAR *et al.*, 2013).

O olho humano apresenta uma taxa de rotatividade lacrimal média de 0,16 $\mu\text{L}/\text{min}$. A instilação de um colírio promove aumento nessa taxa, causando uma redução significativa no tempo de contato do medicamento com a superfície ocular e, conseqüentemente, a redução da biodisponibilidade. Outros fatores, como ligação a proteínas constituintes das lágrimas, também podem favorecer a taxa de eliminação do fármaco (URTTI; SALMINEN, 1993).

A absorção dos fármacos encontra outro fator limitante: a absorção sistêmica no lugar da ocular (URTTI *et al.*, 1985). Como o saco conjuntival é extremamente vascularizado, pode ocorrer um fluxo de fármaco para a corrente sanguínea, o que diminui a concentração do fármaco no líquido lacrimal. Estima-se que a quantidade de fármaco disponível para o segmento posterior seja cerca de 10% da dose instilada (FARKOUH *et al.*, 2016).

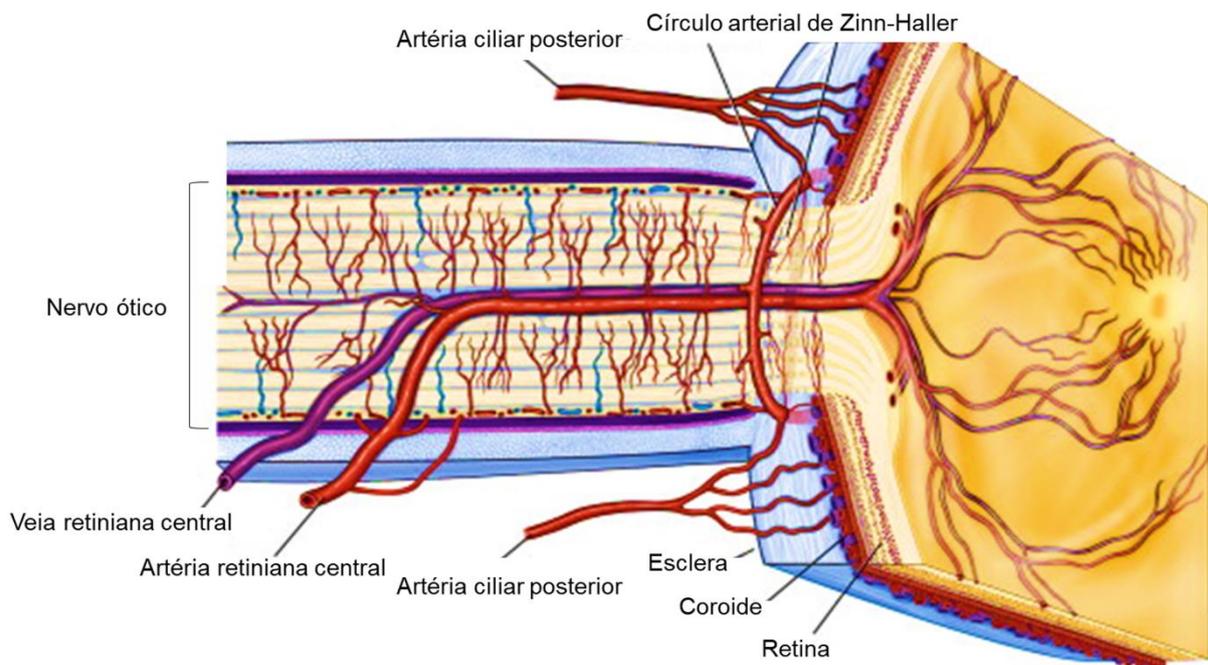
2.3 Suprimento sanguíneo ocular

Embora os vasos retinianos e coroidais sejam todos derivados da artéria oftálmica, um ramo da carótida interna, eles diferem morfológica e funcionalmente. A circulação retiniana é caracterizada por um fluxo baixo e uma capacidade elevada de extração de oxigênio (FUNK, 1997). Em contrapartida, a circulação coroidal possui um fluxo alto, devido à baixa

resistência nos capilares coroidais, que são mais largos (20 – 40 μm). Quando comparados aos capilares da retina, estes apresentam uma extração de oxigênio baixa, de aproximadamente 4% (BILL; SPERBER; UJIIE, 1983; NICKLA; WALLMAN, 2010).

A retina apresenta uma alta taxa de consumo de oxigênio, sendo necessário um grande volume de hemoglobina oxigenada para nutri-la. Assim, a retina recebe nutrientes por duas vias principais: a rede de vasos da retina e da coroide. A circulação retiniana é um sistema arterial final sem anastomoses. A artéria retiniana central emerge do disco óptico e se divide em quatro ramos principais que, por sua vez, se dividem em arteríolas (**Figura 3**). Estas se bifurcam e dão origem a uma rede capilares com um diâmetro médio de 5 μm (FUNK, 1997; KUR; NEWMAN; CHAN-LING, 2012; POURNARAS *et al.*, 2008).

Figura 3 – Anatomia da circulação orbital



Fonte: Adaptado de KUR; NEWMAN; CHAN-LING, 2012.

Os vasos maiores estão localizados na parte mais interna da retina, próximo à membrana limitante interna, enquanto os vasos menores atravessam a retina até a camada plexiforme externa (CPE), quando essa rede de capilares desaparece. A circulação venosa dessas camadas da retina e do disco óptico é drenada por meio da veia central da retina. As camadas mais externas da retina (da camada nuclear externa até o EPR) são avasculares, sendo nutridas por difusão pela circulação da coroide (BILL; SPERBER; UJIIE, 1983; DELAEY; VAN DE VOORDE, 2000).

O suprimento vascular da coroide advém das artérias ciliares posteriores longas e curtas, uma segmentação da artéria oftálmica. As artérias ciliares penetram a esclera na região do disco óptico, levando suprimento sanguíneo não só ao disco óptico como também ao nervo óptico e à coroide (NICKLA; WALLMAN, 2010). A drenagem venosa dessa circulação ocorre por meio de veias vorticosas localizadas na esclera (INÊS, 2019).

O comprometimento da circulação retiniana resulta em alterações do fluxo sanguíneo que, por sua vez, afetam o suprimento de oxigênio e nutrientes essenciais para a manutenção das funções retinianas. A regulação do fluxo sanguíneo retinal e coroidal é alterada em uma série de distúrbios que afetam os olhos. Entre as condições patológicas mais prevalentes, destacam-se a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), a retinopatia diabética e o glaucoma (RIVERA *et al.*, 2017).

2.4 Isquemia retiniana

A isquemia é uma condição que ocorre devido à interrupção do suprimento sanguíneo para um determinado tecido ou órgão, o que limita o suprimento de oxigênio e glicose e desencadeia eventos que culminam na morte celular. A retina é um tecido com alta taxa metabólica que, como dito anteriormente, tem um consumo elevado de oxigênio. Logo, é extremamente sensível à deficiência de oxigênio, o que a torna mais suscetível a lesões isquêmicas (AMES, 1992; MINHAS; SHARMA; KHAN, 2016).

As doenças isquêmicas da retina são caracterizadas por dois estágios principais. O primeiro, envolve a perda do leito vascular pelo evento hipóxico-isquêmico que gera o segundo estágio, caracterizado pela proliferação excessiva dos vasos sanguíneos. Vale ressaltar que o processo isquêmico também é capaz de desencadear estresse oxidativo e processos inflamatórios que vão estar diretamente relacionados a patogênese das doenças isquêmicas da retina (FULTON *et al.*, 2009; RIVERA *et al.*, 2017).

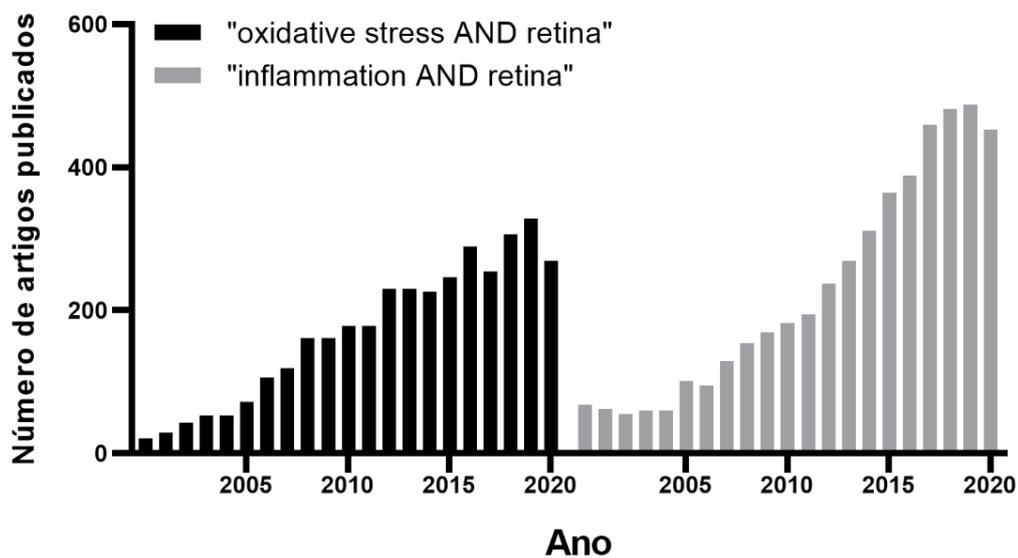
O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais livre, NO e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O excesso dessas moléculas no organismo pode danificar ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, além de modular a expressão de vários genes de resposta ao estresse, estimulando ainda mais a geração de EROs a partir de fontes endógenas (MADSEN-BOUTERSE; KOWLURU, 2008).

A inflamação está intimamente ligada ao stress oxidativo. Ela representa uma resposta celular a fatores que alteram a homeostase dos tecidos, o que inclui o stress oxidativo. Durante o processo inflamatório, são produzidas algumas citocinas e quimiocinas, que são proteínas sinalizadoras, que permeiam os tecidos para exercer funções específicas. Entretanto, quando

tais proteínas permanecem nos locais por períodos prolongados, podem prejudicar a integridade dos tecidos.(FULTON *et al.*, 2009).

Entre os anos de 2000 e 2020, foram publicados no Pubmed 3.552 artigos que incluíam os termos “oxidative stress AND retina” e 4.777 artigos que incluíam as palavras “inflammation AND retina” (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em ambos os casos foi observada uma tendência crescente no número de estudos publicados (**Figura 4**).

Figura 4 – Número anual de publicações contendo os termos de pesquisa “oxidative stress AND retina” ou “inflammation AND retina” entre 2000 – 2020



Fonte: Do autor.

Outra observação relevante associada a uma variedade de doenças oculares é o aumento de EROs e de citocinas inflamatórias. Em virtude disso, muitos grupos de pesquisa têm se voltado ao estudo do estresse oxidativo e da inflamação e suas implicações para diversas patologias, dentre as quais se destacam a DMRI e o glaucoma (RUAN *et al.*, 2020).

2.4.1 Degeneração macular relacionada a idade

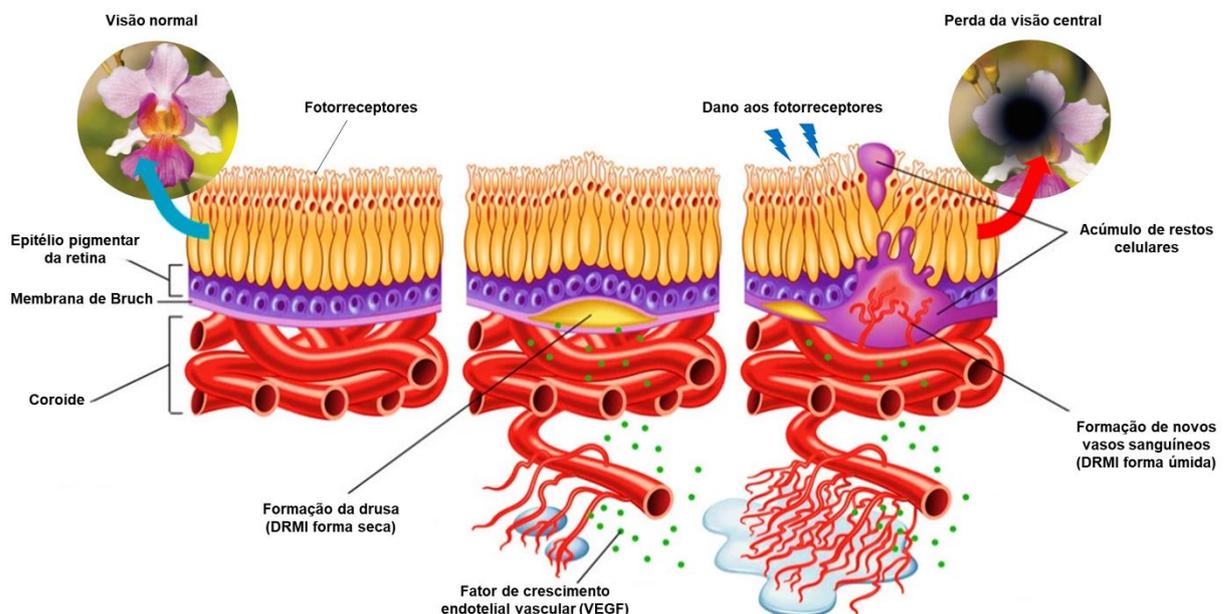
A DMRI é a principal causa de cegueira na população idosa dos países desenvolvidos. Estima-se que em todo mundo aproximadamente 196 milhões de indivíduos sejam afetados pela DMRI, e esse número tende a aumentar para 288 milhões em 2040 (PENNINGTON; DEANGELIS, 2016; WONG *et al.*, 2014). Em estudo realizado em um serviço terciário na cidade de Ribeirão Preto - São Paulo, constatou-se que a DMRI é responsável por 25,3% dos casos de baixa visão na população com 50 anos ou mais (FERREIRA *et al.*, 2020).

Alguns estudos revelam que o custo global da deficiência visual ocasionada pela DMRI é de 343 bilhões de dólares anuais, incluindo 255 bilhões em custos diretos de saúde. Estima-se que esse valor aumente significativamente no futuro (AMD ALLIANCE INTERNATIONAL, 2010; JONAS; CHEUNG; PANDA-JONAS, 2017).

A etiologia da DMRI está relacionada a alterações degenerativas que ocorrem na mácula e por isso, levam a uma diminuição da visão central. Trata-se de uma doença multifatorial que ocorre devido a alterações decorrentes do processo natural de envelhecimento e alterações patológicas (ZARBIN, 2004). Dessa forma, com o envelhecimento global da população, esta tem se tornado uma das doenças oculares mais importantes da terceira idade (WONG *et al.*, 2014). Além disso, alguns fatores genéticos e ambientais, como fumo, má alimentação e o consumo de bebida alcoólica estão associados ao desenvolvimento e à progressão da DMRI (LIM *et al.*, 2012; MITCHELL *et al.*, 2018).

O achado clínico mais característico da DMRI é o aparecimento de drusas, formadas pelo encapsulamento de restos celulares, como proteínas e lipídeos, entre a membrana de Bruch e o EPR (Figura 5). As drusas dificultam a difusão de oxigênio e nutrientes para a retina, dando origem a áreas isquêmicas no EPR – conhecida como DMRI forma seca – (MITCHELL *et al.*, 2018).

Figura 5 – Patogênese da DMRI



Fonte: Adaptado de Agepharma (2020).

A progressão da DMRI leva a um estágio neovascular que envolve fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), que é induzido pela hipóxia (KUR; NEWMAN; CHAN-LING, 2012). Novos vasos

sanguíneos crescem sob a mácula e, devido à sua fragilidade, frequentemente se rompem (DMRI forma úmida), causando um comprometimento na região macular, o que justifica a perda da visão central (FINGER *et al.*, 2020; RUAN *et al.*, 2020; SHEN, *et al.*, 2007).

Além das alterações dos fotorreceptores, recentemente as células da glia têm recebido destaque na patogênese da DMRI. As células gliais geralmente são subdivididas em macroglia (células de Müller e astrócitos) e micróglia, e têm como função manter a integridade e homeostase dos neurônios da retina. No entanto, alguns estudos relataram uma redução na proporção de astrócitos para neurônios na retina de ratos idosos, o que sugere uma maior dificuldade dos astrócitos em manter a homeostase durante o envelhecimento. Como a DMRI é uma doença relacionada ao envelhecimento do indivíduo, essa mudança na proporção astrócito/neurônio pode estar envolvida na patogênese da DMRI (KUR; NEWMAN; CHAN-LING, 2012; TELEGINA; KOZHEVNIKOVA; KOLOSOVA, 2018).

A investigação das alterações que ocorrem nas células da glia da retina com o avanço da idade é necessária para revelar possíveis causas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, incluindo DMRI. Além disso, publicações recentes sugerem que a glia pode ser um alvo interessante para o tratamento de doenças degenerativas (TELEGINA; KOZHEVNIKOVA; KOLOSOVA, 2018).

2.4.2 Glaucoma

O glaucoma é uma das causas mais comuns de cegueira no mundo (FLAXMAN *et al.*, 2017). estima-se que cerca de 76 milhões de pessoas em todo o mundo vivam com a doença atualmente, e esse número tende a aumentar para 111,8 milhões em 2040 (THAM *et al.*, 2014). Como consequência, o glaucoma gera um encargo financeiro significativo para o sistema de saúde. Nos Estados Unidos da América (EUA), o tratamento terapêutico do glaucoma custa cerca de 2,5 bilhões de dólares ao ano, sendo que 1,9 bilhões são destinados a custos diretos, como medicamentos e cirurgias, e 0,6 bilhões a custos indiretos, nos quais se incluem os acidentes e a ausência no trabalho (RYLANDER; VOLD, 2008).

No Brasil, há uma escassez de informações confiáveis e atualizadas sobre a ocorrência da doença. Em estudo populacional realizado no sul do país, encontrou-se uma prevalência de 3,4% para a população acima de 40 anos de idade (SAKATA *et al.*, 2007). Em contrapartida, em trabalho realizado no interior do Amazonas, a prevalência encontrada para os casos totais de glaucoma foi de 6,0%. Entre os indivíduos diagnosticados, 96,0% das pessoas encontravam-se na faixa etária acima de 40 anos (LOUREIRO; FÉLIX, 2020).

Nesse contexto, o aumento na prevalência do glaucoma tem impactado diretamente os recursos do Sistema Único de Saúde (SUS). De acordo com estudo realizado por

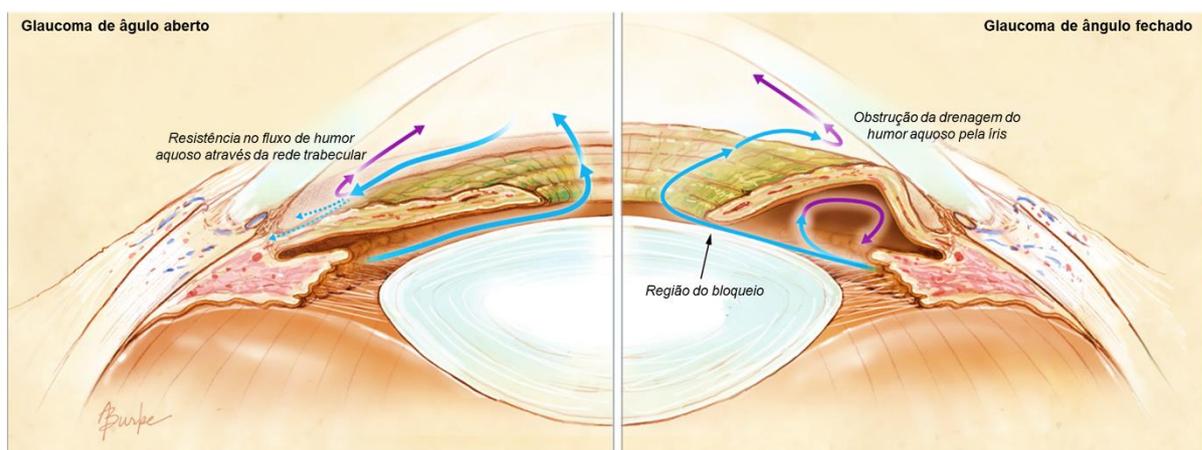
Castro *et al.* (2020), foi aprovado, para o tratamento do glaucoma, no período entre janeiro de 2015 a dezembro de 2019, um valor total de R\$ 242.349.077,55 para a região sudeste do país. O estudo ressalta ainda que houve um crescimento de 92,9% nos valores aprovados para o tratamento do glaucoma nesse período, em comparação a anos anteriores.

O termo glaucoma refere-se a um grupo de condições oculares que têm como ponto em comum a degeneração de células ganglionares que pode estar associada ao aumento da pressão intraocular (PIO). Embora a patogênese do glaucoma não seja totalmente compreendida, sabe-se que a fisiopatologia do glaucoma seja multifatorial e que vários fatores contribuem para a morte das células da camada ganglionar da retina (SUPURAN, 2019).

O equilíbrio entre a secreção de humor aquoso pelo corpo ciliar e a drenagem ocorre por duas vias independentes: malha trabecular e uveoescleral (AGARWAL *et al.*, 2009). No glaucoma de ângulo aberto (mais comum) há uma maior resistência no fluxo através da rede trabecular, o que aumenta o volume do líquido presente no olho e, conseqüentemente, eleva a PIO. Nesse tipo de glaucoma os sintomas são menos aparentes e, muitas vezes, o portador só percebe-os após uma perda significativa do campo de visão (CAPRIOLI; COLEMAN, 2010; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

No glaucoma de ângulo fechado agudo (mais grave) a drenagem do humor aquoso é obstruída pela íris, o que gera um aumento na pressão (**Figura 6**). Nesse caso, a elevação da pressão gera dor intensa, embaçamento visual, dor de cabeça, náuseas e vômito (CAPRIOLI; COLEMAN, 2010; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

Figura 6 – Drenagem do humor aquoso e o glaucoma



Fonte: Adaptado de WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014.

A elevação na PIO causa um estresse mecânico e, conseqüentemente, danos às células neuronais da retina. Além disso, durante os períodos de estresse metabólico induzido pelo aumento da PIO, há disfunção mitocondrial nas células ganglionares da retina e nos

astrócitos, em virtude da alta demanda de energia dessas células, resultando na morte de células ganglionares e redução progressiva do campo visual (JU *et al.*, 2008; WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

Embora a PIO elevada seja identificada como um fator mais prevalente para o desenvolvimento do glaucoma, em parte dos pacientes a doença progride mesmo com a intervenção farmacológica para redução dessa pressão. Isso pode ser justificado por outros fatores etiológicos, como: vascularização anormal, estresse oxidativo e inflamação. Esses fatores têm sido associados à patogênese da doença (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2012).

Os mecanismos que podem desencadear ou catalisar a apoptose de células ganglionares no glaucoma são inúmeros, o que reflete a complexidade das neuropatias ópticas glaucomatosas (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2012). Em contrapartida, a elucidação desses mecanismos também serve como possível alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas terapias neuroprotetoras potencialmente aplicáveis ao glaucoma (NUCCI *et al.*, 2018).

2.5 Alvos terapêuticos para o tratamento de doenças degenerativas da retina

Nos últimos anos, houve um progresso considerável na compreensão das múltiplas vias que levam à degeneração da retina (SUPURAN, 2019). Diante disso, algumas vias intracelulares que medeiam a apoptose vêm ganhando destaque, por exemplo, a via glutamato e do ON, uma vez que esses neurotransmissores estão implicados em degenerações isquêmicas da retina, incluindo a DMRI e o glaucoma (CHUNG *et al.*, 1999; GU *et al.*, 2000; MOREIRA-NETO *et al.*, 2018).

2.5.1 O papel do glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da retina, local onde é liberado por fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares (THORESON; WITKOVSKY, 1999; TRAYNELIS *et al.*, 2010). Como não há enzima extracelular para degradar o glutamato, sua captação pelas células da glia é de extrema importância fisiológica, pois elas removem o excesso de glutamato da fenda sináptica, prevenindo a neurotoxicidade.

O glutamato incorporado às células de Müller é convertido para glutamina por meio de uma reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, localizada nessas células. Os neurônios podem, então, sintetizar o glutamato a partir da glutamina (CONNAUGHTON, 1995; KAUR, 2008). O glutamato liberado no terminal pré-sináptico se difunde através da fenda sináptica e se liga aos receptores localizados nos dendritos das células pós-sinápticas. Há duas classes de receptores de glutamato: receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos (CONNAUGHTON, 1995).

Os receptores ionotrópicos são caracterizados por formarem um complexo com o canal iônico e influenciam diretamente a sua atividade. Eles são classificados, ainda, de acordo com a seletividade pelo agonista, e são subdivididos em: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que se ligam ao glutamato e ao seu análogo, e receptores não NMDA, que possuem afinidade por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato. Os receptores metabotrópicos ativam enzimas intracelulares por meio do acoplamento à proteína G acoplada. Além disso, são classificados em três grupos principais: grupo I (mGluR1 e 5), Grupo II (mGluR2, 3) e Grupo III (mGluR 4, 6, 7, 8), de acordo com sua sequência de aminoácidos e propriedades farmacológicas (CONNAUGHTON, 1995; KAUR, 2008).

A captação de glutamato dependente do influxo transmembrana de Na^+ . Durante a isquemia, ocorre uma diminuição na concentração de adenosina trifosfato (ATP) intracelular e, por sua vez, há uma redução da atividade da bomba Na^+/K^+ , o que prejudica a captação de glutamato pelas células nervosas. No entanto, o acúmulo de glutamato nos espaços extracelulares leva à ativação de seus receptores. Como esses receptores são altamente permeáveis ao Ca^{2+} , a sua ativação promove um influxo deste íon em concentrações elevadas, o que é extremamente prejudicial aos constituintes celulares. Além disso, a sobrecarga de cálcio intracelular leva a uma falha mitocondrial, o que resulta em esgotamento de energia e uma alta produção de radicais livres (OSBORNE *et al.*, 2004; KAUR, 2008).

Nesse contexto, um agente terapêutico capaz de limitar a captação do glutamato por meio de seus receptores na célula pós sináptica ou atenuar o dano celular causado pela sua absorção consiste em uma ferramenta neuroprotetora importante para o controle de doenças neurodegenerativas que acometem a retina (STONE; ADDAE, 2002).

Recentemente, muito se tem investido na busca por novos antagonistas NMDA não competitivos que sejam capazes de proteger a retina dos danos isquêmicos. A exemplo disso, nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um trabalho no qual se investigou o papel da cetamina, um antagonista NMDA não competitivo, na lesão de isquemia induzida em olhos de ratos. Os resultados preliminares revelaram que a cetamina foi capaz de atenuar os danos, o que reforça o poder neuroprotetor desses antagonistas (DOURADO *et al.*, 2021).

É importante destacar que o uso terapêutico de antagonistas NMDA é sempre muito questionado devidos aos possíveis efeitos negativos ao paciente. No entanto, alguns antagonistas de receptores NMDA são mais bem tolerados do que outros, por razões que muitas vezes não são claras. Assim, a pesquisa por novos antagonistas de receptores NMDA é contínua e extremamente necessária.

2.5.2 O papel do óxido nítrico

O NO é uma molécula amplamente conhecida por ser um mensageiro intercelular muito importante em diversos sistemas do corpo, inclusive no olho. Diversas células utilizam a arginina para sintetizar o NO, em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Três isoformas de NOS são conhecidas, sendo duas constitutivas: óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS). A terceira é induzida: óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007).

O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel, o que favorece a formação de monofosfato cíclico de guanosina C (GMPc) intracelular, resultando no relaxamento de células da musculatura lisa vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Além do vasorelaxamento, o NO medeia outros fenômenos, como regulação da pressão sanguínea e angiogênese (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2020).

O papel do NO na fisiopatologia da isquemia retiniana é complexo, uma vez que todas as três isoformas de NOS são produzidas na retina em condições isquêmicas. O NO produzido pela isoforma eNOS induz uma resposta protetora, pois é capaz de promover vasodilatação após episódios isquêmicos, o que leva a um aumento do fluxo sanguíneo (KAUR; SIVAKUMAR; FOULDS, 2006; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007). A eNOS também está envolvida na angiogênese induzida por VEGF e na hiperpermeabilidade vascular (FUKUMURA *et al.*, 2001). Além disso, também há evidências de que a produção de NO a partir de nNOS e iNOS contribua para a citotoxicidade, resultando em morte celular e dano axonal. Esses efeitos estão associados à geração de radicais livres por uma série de vias, como o influxo do Ca^{2+} intracelular mediado por receptores NMDA (MISHRA *et al.*, 2006).

O NO também provoca neurotoxicidade de maneira indireta ao se associar a EROs para formar peroxinitrito e dióxido de nitrogênio, moléculas que ativam a peroxidação lipídica. Essa citotoxicidade está principalmente relacionada a reações inflamatórias tardias presentes na lesão de reperfusão de áreas isquêmicas (KUR; NEWMAN; CHAN-LING, 2012; POURNARAS *et al.*, 2008).

Dado o potencial envolvimento do NO em doenças isquêmicas, tanto a inibição seletiva da iNOS ou nNOS quanto a suplementação de NO podem contribuir para a redução do dano isquêmico. Presumivelmente, a liberação constitutiva de NO é prejudicada nas primeiras horas após o início da isquemia. Dessa forma, terapias capazes de promover um aumento da disponibilidade local de NO durante esse período crítico poderiam melhorar o fluxo sanguíneo

e atuariam como agente neuroprotetor (GARHÖFER; SCHMETTERER, 2019; POURNARAS *et al.*, 2008; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007).

2.6 Potenciais estratégias terapêuticas nas doenças isquêmicas da retina

A isquemia retiniana apresenta uma fisiopatologia extremamente complexa, que reflete a estrutura da retina e o seu suprimento vascular dinâmico. Durante um processo isquêmico, o fluxo sanguíneo é modificado e todos os mecanismos homeostáticos são alterados, o que afeta todas as células da retina por meio de uma cascata de eventos (OSBORNE *et al.*, 2004).

Inicialmente, a escassez de energia celular ocasionada pela isquemia leva a uma falha da bomba Na^+/K^+ , o que gera uma despolarização da membrana celular e, conseqüentemente, a liberação excessiva de neurotransmissores que ativam receptores específicos, levando ao acúmulo citoplasmático de íons de sódio e cálcio e à formação de espécies de radicais livres destrutivas. A resposta celular somada desses processos, se não for controlada, é a apoptose (MINHAS; SHARMA; KHAN, 2016; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007).

As possíveis causas da isquemia retiniana sugerem uma série de alvos óbvios para a terapia, sendo um deles simplesmente restaurar o suprimento de nutrientes. No entanto, a tolerância limitada dos neurônios à hipóxia impõe o tempo como principal limitante para essa abordagem terapêutica. Portanto, outras estratégias farmacológicas capazes de interromper qualquer uma das etapas envolvidas na cascata isquêmica são capazes de minimizar os efeitos causados pela isquemia (KAUR, 2008; OSBORNE *et al.*, 2004).

A neuroproteção e as inúmeras estratégias para reduzir a vulnerabilidade da retina aos processos isquêmicos permanecem como alguns entre os principais objetivos dos pesquisadores e clínicos no tratamento de doenças como a DMRI e o glaucoma. Assim, a busca por novos agentes terapêuticos com potencial efeito neuroprotetor é constante.

2.7 Peptídeos

Os peptídeos são moléculas que contêm entre 2 a 50 aminoácidos e são acoplados por uma ligação peptídica. Esse tipo de ligação ocorre sempre por meio da reação entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxila de outro. Os peptídeos são onipresentes em toda a biologia e estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares e funções fisiológicas (AGYEI *et al.*, 2017).

A pesquisa de fármacos baseada em peptídeos vem ganhando destaque nos últimos anos. Esse sucesso pode ser atribuído ao alto grau de especificidade, devido às estruturas complexas dessas moléculas e, conseqüentemente, à baixa toxicidade, uma vez que os peptídeos tendem a interagir apenas com as moléculas-alvo (DA COSTA *et al.*, 2015). Assim,

os peptídeos ganharam uma ampla gama de aplicações na medicina e biotecnologia, o que vêm trazendo um retorno financeiro significativo. Em termos de valores, o mercado global de peptídeos foi estimado em cerca de 25,4 bilhões de dólares em 2018, sendo ~ 60% (17 bilhões de dólares) desse valor atribuído ao desenvolvimento de novos medicamentos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

Em pesquisa realizada por LAU e DUNN (2018), foram encontradas 60 fármacos derivados de peptídeos nos EUA, Europa e Japão. Além disso, outras 150 encontram-se em fase clínica e mais de 260 já foram testadas em ensaios clínicos em humanos. Os autores destacam, ainda, que houve um aumento no número acumulado de peptídeos aprovados para uso terapêutico.

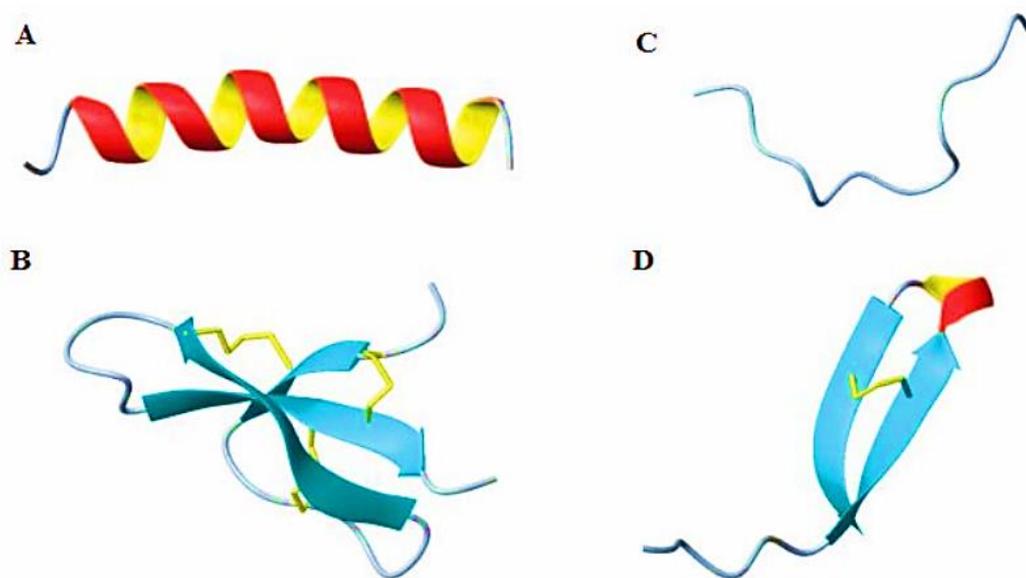
2.7.1 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são componentes constituintes das defesas naturais de diversos organismos contra patógenos invasores. Essa classe de peptídeos é encontrada em plantas, bactérias, fungos e em uma ampla variedade de animais (vertebrados e invertebrados). Estima-se que mais de 2.000 peptídeos antimicrobianos já tenham sido descritos em praticamente todos os organismos eucariotos (BAHAR; REN, 2013; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos exibe uma atividade de amplo espectro contra inúmeros microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários, leveduras, fungos e vírus (BAHAR; REN, 2013; GRUENHEID; LE MOUAL, 2012; SILVA *et al.*, 2019). Além disso, essa classe também pode funcionar como adjuvante no aumento da produção de anticorpos, e até mesmo exibir propriedades imunomoduladoras, atuando na resposta inflamatória (DADAR *et al.*, 2019; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados em quatro classes distintas de acordo com suas respectivas estruturas secundárias. As estruturas mais comuns são as α -hélice (**Figura 7A**) e folhas- β (**Figura 7B**), essas estabilizadas por ligações dissulfeto. As estruturas mais raras são as estendidas (**Figura 7C**), caracterizadas pela predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos na sequência primária, e as em *loop* (**Figura 7D**), formadas por ligações dissulfeto simples.

Figura 7 – Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos



Legenda: A) α -hélice B) folhas- β C) estrutura estendida D) estrutura em *loop*.

Fonte: Adaptado de JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006.

2.7.2 Peptídeos encontrados em peçonhas animais

Existem ainda outros inúmeros peptídeos que são comumente encontrados na peçonha, tanto de animais vertebrados quanto em animais invertebrados. Dentre os animais vertebrados, a peçonha de serpentes compreende uma fonte de moléculas bioativas com estruturas e funções variadas, e fornece uma gama de efeitos terapêuticos com aplicações farmacológicas e biotecnológicas (DE BARROS *et al.*, 2019). Assim, os venenos de serpentes são explorados na busca por moléculas naturais, como os peptídeos relacionados à catelicidina (WANG, YIPENG *et al.*, 2008). Esses peptídeos apresentam estrutura em hélice e possuem atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de organismos, principalmente contra fungos e bactérias (BRAFF *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2017; LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2005; SINGANAYAGAM *et al.*, 2019).

Em invertebrados, é descrita na literatura a presença de peptídeos na peçonha de inúmeros insetos. O peptídeo sintético Neurovespina é um derivado da neurotoxina isolada da peçonha da vespa social neotropical *Polybia occidentalis*. Em trabalhos anteriores, esse peptídeo apresentou uma atividade neuroprotetora importante em doenças neurodegenerativas (DO COUTO *et al.*, 2012; MORTARI, 2007). Além disso, em estudos realizados pelo nosso grupo (DOURADO; SILVA; *et al.*, 2021), foi observado que a Neurovespina apresentou uma atividade antiangiogênica semelhante ao bevacizumabe (AVASTIN®), um anticorpo

monoclonal inibidor da angiogênese utilizado para alguns tipos de câncer (SHOJAEI, 2012) e que tem sido utilizado de forma *off label* na oftalmologia (SUGIMOTO *et al.*, 2017).

Ainda no filo Arthropoda, os aracnídeos se destacam por apresentar na composição de suas peçonhas vasta gama de peptídeos antimicrobianos (MATAVEL; ESTRADA; DE MARCO ALMEIDA, 2016). Os primeiros peptídeos descobertos da peçonha de uma aranha foram a lycotoxina I e II em 1989. Esses peptídeos são provenientes da peçonha da aranha *Lycosa carolinensis* e apresentavam atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas (XU; JI, 1989; YAN; ADAMS, 1998). A partir daí, despertou-se um grande interesse no estudo de peptídeos provenientes da peçonha de representantes do gênero *Lycosa sp.*

Estudos realizados com a peçonha da aranha *Lycosa erythognatha* revelaram a presença de peptídeos que apresentam potente atividade antimicrobiana, dentre os quais se destaca o peptídeo denominado LyeTxI-b (FUSCALDI *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2018). Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, esse peptídeo se mostrou eficaz no tratamento da ceratite bacteriana ulcerativa induzida por *Staphylococcus aureus* (SILVA *et al.*, 2019).

As toxinas peptídicas presentes na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* vêm se destacando como agentes potentes e seletivos com grande potencial farmacêutico. Estes serão detalhados a seguir.

2.7.3 *Phoneutria nigriventer*, sua peçonha e peptídeos

A aranha *Phoneutria nigriventer* pertence à classe Arachnida, ordem Aranae, família Ctenidae e gênero *Phoneutria* (DE LIMA *et al.*, 2015). As aranhas desse gênero possuem hábitos noturnos, são solitárias, agressivas e conhecidas por assumir posições características de defesa ao se sentirem ameaçadas, por isso recebem o nome popular de aranha armadeira (**Figura 8**).

Essas aranhas são encontradas em florestas da região neotropical do sul da América Central (Costa Rica) e na América do Sul, dos Andes até o norte da Argentina. No Brasil, esse espécime é frequentemente encontrado nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Sul, e está frequentemente associado com o ambiente peridomiciliar, devido ao acúmulo de resíduos orgânicos que atraem insetos, como baratas, grilos e outras espécies de aranhas, presas naturais desse animal. Isso explica o grande número de acidentes envolvendo essa aranha (GOMEZ *et al.*, 2002; PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018).

Figura 8 – *Phoneutria nigriventer*, a aranha armadeira



Fonte: Adaptado de DE LIMA et al., 2015.

A maioria dos acidentes envolvendo seres humanos são leves e apenas 0,5 - 1,0% dos casos são considerados graves. Embora a peçonha seja altamente neurotóxica, a quantidade inoculada por meio da picada é muito pequena para induzir efeitos letais, e o envenenamento raramente leva à morte. No **Quadro 1** estão resumidas as manifestações clínicas encontradas nesse tipo de acidente, de acordo com a gravidade (Ministério da Saúde; <http://portalarquivos.saude.gov.br/>).

Quadro 1 – Classificação clínica de gravidade dos acidentes causados por aranhas *Phoneutria nigriventer*

Classificação	Manifestações clínicas
Leve	Essencialmente, manifestações locais: dor, edema, eritema, irradiação, sudorese, parestesia. Eventualmente, taquicardia e agitação secundárias à dor.
Moderado	Quadro local podendo se associar à sudorese, taquicardia, vômitos ocasionais, agitação, hipertensão arterial.
Grave	Além das manifestações acima: prostração, sudorese profusa, hipotensão, priapismo, diarreia, bradicardia, arritmias cardíacas, arritmias respiratórias, contraturas, convulsões, cianose, edema pulmonar, choque.

Fonte: Ministério da Saúde (<http://portalarquivos.saude.gov.br/>).

A peçonha da *Phoneutria nigriventer* é composto por uma mistura de proteínas e peptídeos, incluindo neurotoxinas, que atuam sobre canais iônicos e receptores químicos do sistema neuromuscular de insetos e mamíferos. Com base nisso, essa peçonha vem sendo estudado amplamente nas últimas décadas e inúmeras moléculas bioativas foram isoladas da peçonha bruta e caracterizadas (DE LIMA *et al.*, 2015; PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018).

Em estudo realizado por Resende Jr e colaboradores (1991), foram isolados, por meio de cromatografia líquida de fase reversa e gel filtração, peptídeos neurotóxicos presentes em quatro frações ativas: PhTx1, PhTx2, PhTx3, PhTx4. As frações PhTx1, PhTx2 e PhTx3 se mostraram ativas em mamíferos, entretanto se diferem quanto à letalidade. A fração PhTx4 se mostrou mais tóxica para insetos do que para mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; REZENDE *et al.*, 1991).

Fração PhTx1

A fração PhTx1 contém apenas a neurotoxina PnTx1, a primeira a ser purificada e sequenciada da peçonha da *Phoneutria nigriventer* (DINIZ *et al.*, 1990). Essa toxina age bloqueando canais para sódio dependentes de voltagem (DINIZ *et al.*, 2006; MARTIN-MOUTOT *et al.*, 2006). Em estudo realizado por Rezende e colaboradores (1991) essa neurotoxina foi injetada via intracerebroventricular (i.c.) em camundongos e causou excitação, elevação da cauda e paralisia espástica dos membros posteriores.

Fração PhTx2

Alguns estudos revelaram que a fração PhTx2 é a responsável pela maioria dos efeitos da peçonha bruta (DE LIMA *et al.*, 2015). Experimentos empregando a técnica de *Patch Clamp* (utilizada para estudar correntes iônicas em células e seções de tecidos) mostraram que essa fração atua em canais para sódio facilitando a entrada desse íon e, conseqüentemente, por meio da despolarização da célula, favorece o influxo de cálcio e a liberação do neurotransmissor glutamato (ARAÚJO *et al.*, 1993). Além disso, essa fração inibe o processo de inativação de canais iônicos para sódio (em membranas celulares de nervos e músculos), o que resulta na liberação de neurotransmissores como a acetilcolina (MOURA *et al.*, 1998).

A fração PhTx2 é uma mistura de 9 toxinas. Inicialmente, foram sequenciadas quatro: PnTx2-1, PnTx2-5, PnTx2-6 e PnTx2-9. As toxinas PnTx2-1, PnTx2-5 e PnTx2-6 exibiram uma alta identidade (77%) e foram capazes de reproduzir os efeitos neurotóxicos (prurido, lacrimejamento, hipersalivação, sudorese, agitação e paralisia espástica) induzidos por PhTx2 após injeção via i.c. em camundongos. PnTx2-9, causou apenas ereção da cauda, prurido e uma ligeira redução na motilidade. Sequencialmente, as outras toxinas também foram

identificadas (PnTx2-2, PnTx2-3, PnTx2-4, PnTx2-7 e PnTx2-8), no entanto apresentaram baixa toxicidade para camundongos (CORDEIRO *et al.*, 1992).

Dentre as toxinas que reproduziram os efeitos neurotóxicos da peçonha, PnTx2-5 e PnTx2-6 se destacam por apresentar efeitos complexos na cinética dos canais para sódio dependentes de voltagem. Entretanto, PnTx2-6 possui uma afinidade seis vezes maior por esses canais do que PnTx2-5 e, por isso, tem recebido atenção especial nos últimos anos (MATAVEL *et al.*, 2002, 2009).

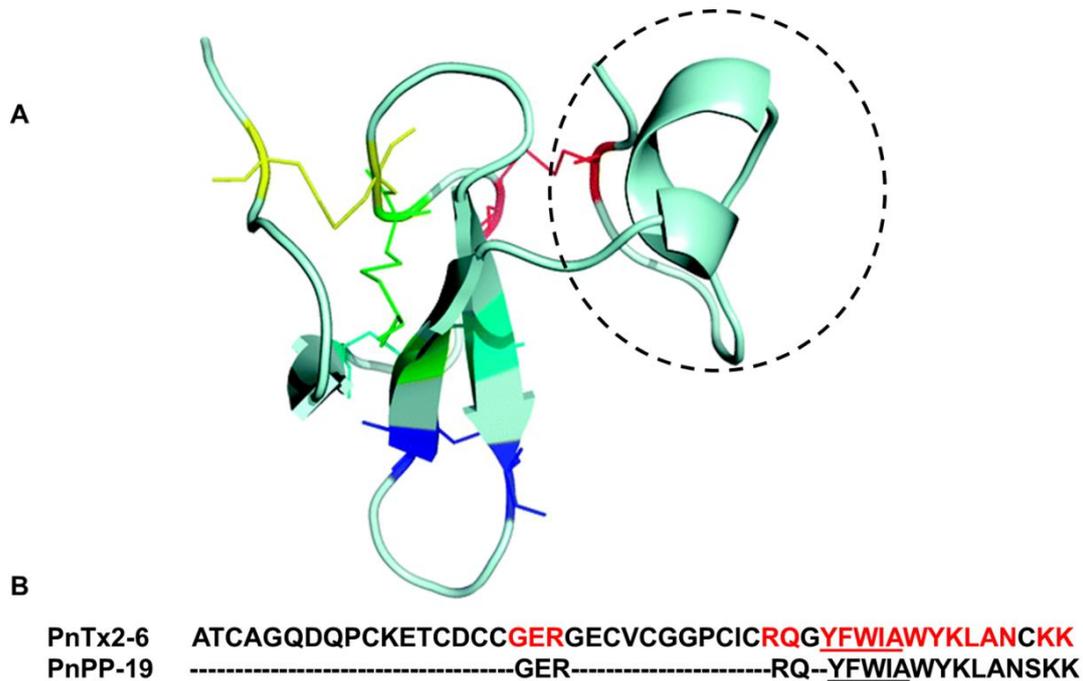
Em trabalho desenvolvido por NUNES *et al.* (2008), verificou-se que a toxina PnTx2-6 potencializa a ereção em ratos por meio da liberação de NO em células do corpo cavernoso. Um ano mais tarde, VILLANOVA *et al.* (2009) observaram a superexpressão de genes envolvidos na via do NO no tecido erétil de camundongos após tratamento com a toxina PnTx2-6. Um desses genes ativa diretamente a via NO/GMPc. Assim, estudos sugerem que a toxina PnTx2-6, ao retardar a inativação dos canais para sódio, despolariza a membrana, o que leva à abertura dos canais para cálcio, aumentando o influxo desse íon. O aumento de cálcio estimula NOS, o que leva ao aumento na produção de NO (NUNES *et al.*, 2008, 2012)

A toxina PnTx2-6 apresenta efeitos promissores para o tratamento de inúmeras doenças que se beneficiariam do aumento na produção do óxido nítrico. Entretanto, a toxina exibe elevada toxicidade, o que pode comprometer a sua ampla utilização. Em vista disso, foi sintetizado um peptídeo menor, desenhado *in silico* por um programa de bioinformática, após o estudo da estrutura da PnTx2-6 (FLEURY, 2009; MATAVEL *et al.*, 2009; MOREAU *et al.*, 2008; NUNES, *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2015). O peptídeo sintetizado foi denominado PnPP-19 (*Phoneutria nigriventer* Peptídeo Potencializador, contendo 19 resíduos de aminoácidos) e representa uma parte descontínua da sequência primária da toxina PnTx2-6.

PnPP-19

A **Figura 9A** destaca a estrutura tridimensional da toxina PnTx2-6 e, dentro da área pontilhada, apresenta a porção referente ao peptídeo PnPP-19, proposto *in silico* por modelagem molecular. Na **Figura 9B** estão descritas as estruturas primárias de ambos. Na sequência da toxina, estão destacadas em vermelho as regiões que deram origem ao peptídeo PnPP-19. A porção sublinhada corresponde à pequena alfa-hélice, encontrada tanto na toxina quanto no peptídeo, obtida por modelagem molecular (FLEURY, 2009; MATAVEL *et al.*, 2009).

Figura 9 – Representação da estrutura da toxina PnTx2-6 e do peptídeo PnPP-19



Legenda: A) estrutura tridimensional da toxina PnTx2-6, e em destaque a porção referente ao peptídeo PnPP-19 B) estrutura primária da toxina PnTx2-6 e do peptídeo PnPP-19.

Fonte: Adaptado de MATAVEL *et al.*, 2009.

A síntese química do peptídeo foi realizada utilizando a técnica Fmoc/t-butila em suporte sólido. PnPP-19 foi acetilado no N-terminal e amidado no C-terminal, visando ao aumento da solubilidade da molécula — visto que a sequência apresenta muitos resíduos hidrofóbicos — e a torná-la menos suscetível à ação de enzimas. A massa molecular do peptídeo foi igual a 2.485,6 Da (SILVA, 2012).

Em estudo realizado por SILVA (2017), o peptídeo PnPP-19 potencializou a ereção em ratos por meio de um aumento da produção de NO por ativação das enzimas nNOS e iNOS. Além disso, os autores comprovaram que o peptídeo não afeta os canais para sódio dependentes de voltagem, nem os canais para cálcio tipo N, além de não exercer efeito aparente sobre o coração. Esses resultados colocam o PnPP-19 em posição de destaque para o tratamento da disfunção erétil e demais doenças que se beneficiariam desse efeito.

Fração PhTx3

A PhTx3 é a fração mais estudada e mais bem caracterizada, em razão do seu potencial farmacológico. Alguns estudos sugerem que essa fração atua nos canais para sódio e cálcio e, conseqüentemente, apresentaram diversas propriedades farmacológicas. Inicialmente, seis toxinas que apresentaram diferentes efeitos neurotóxicos foram isolados dessa fração e

nomeados como: PnTx3-1, PnTx3-2, PnTx3-3, PnTx3-4, PnTx3-5 e PnTx3-6 (CORDEIRO *et al.*, 1993; GOMEZ *et al.*, 1995).

As toxinas da fração PhTx3 compartilham pouca identidade de sequência e, portanto, exibem uma grande variedade de atividades farmacológicas. Estudos mais detalhados mostraram que a toxina PnTx3-1 tem efeito antiarrítmico em corações isolados de ratos (KUSHMERICK *et al.*, 1999). A toxina PnTx3-2 possui um efeito inibitório em canais para cálcio do tipo L, e aparentemente em músculos cardíacos e esqueléticos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998a; KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998b). As toxinas PnTx3-3, PnTx3-4 e PnTx3-6 atuam bloqueando canais para cálcio sensíveis à voltagem, e inibindo o influxo de cálcio intracelular em sinaptossomas corticais de ratos despolarizados com KCl (PRADO *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2005).

PnTx3-5 é a toxina menos estudada da fração da fração PhTx3. No entanto, é conhecida por bloquear potentemente os canais Cav do tipo L (LEÃO *et al.*, 2000). Essa toxina demonstrou atividade antinociceptiva promissora em modelos de dor clinicamente relevantes, como dor pós-operatória, neuropática e relacionada ao câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Fração PhTx4

PhTx4 é conhecida como fração inseticida, devido à sua alta toxicidade e letalidade contra insetos, embora apresente uma toxicidade menor quando injetada em camundongos (PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018). Alguns estudos sugerem que essa fração atue no sistema glutamatérgico de insetos e mamíferos, o que explicaria seu efeito paralisador em insetos (DE LIMA *et al.*, 2015).

Três toxinas foram caracterizadas a partir da fração da peçonha PhTx4: PnTx4 (6-1), PnTx4 (5-5) e PnTx4 (4-3). Essas toxinas compartilham uma alta semelhança em suas sequências (**Figura 10**), portanto, acredita-se que exibam propriedades farmacológicas semelhantes (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 1995; OLIVEIRA, *et al.*, 2003).

Figura 10 – Sequências das toxinas identificadas na fração PnTx4 da peçonha da *Phoneutria nigriventer*

PnTx4 (4 – 3) CGDINA**ACKEDCDCCGYTTACDCYWSSSCKCREAAIVIYTAPKKKLT**C****
 PnTx4 (5 – 5) CADINGA**CKSDCDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKF-**C****
 PnTx4 (6 – 1) CGDINA**ACKEDCDCCGYTTACDCYWSK**SKCKCREAAIVIYTAPKKKLT**C******

Legenda: As cisteínas são indicadas em vermelho.

Fonte: Adaptado de PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018.

PnTx4(4-3) é a toxina menos estudada em comparação com as demais dessa fração da peçonha. Todavia, em trabalho desenvolvido por OLIVEIRA, *et al.* (2003), constatou-se que essa toxina induziu efeitos excitatórios em moscas e baratas. Além disso, foi confirmado que essa toxina causa uma inibição da captação de glutamato em sinaptossomas cerebrais de rato.

As toxinas PnTx4(6-1) e PnTx4(5-5) inicialmente não apresentaram efeitos tóxicos em camundongos, embora tenham se mostrado altamente tóxicas para insetos (PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018). Estudos relacionaram a toxicidade dessas frações a uma ação em canais de sódio sensíveis à voltagem que estavam presentes em insetos, o que prolongava a ativação desses canais e, conseqüentemente, a liberação de glutamato (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA, *et al.*, 2003).

Com base nas informações apresentadas no parágrafo anterior, os estudos subsequentes mostraram que PnTx4 (5-5) é um antagonista reversível do receptor NMDA de glutamato em neurônios cerebrais de ratos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Uma vez que a inibição dos receptores NMDA é um mecanismo capaz de promover um aumento na sobrevivência neuronal, essa toxina vem sendo investigada como um agente neuroprotetor (SILVA, *et al.*, 2016).

A toxina PnTx4 (6-1) estimula a liberação de L-glutamato em junções neuromusculares de baratas (*Periplaneta americana*) (FIGUEIREDO *et al.*, 1995). De Lima e colaboradores (2002) mostraram que essa toxina também é capaz de prolongar o potencial de ação em axônio isolado de barata. Esse efeito foi justificado por uma inativação da corrente dos canais para sódio, considerando que a toxina PnTx4 (6-1) competiu com uma neurotoxina da peçonha do escorpião *Buthus martensii*, a qual atua nessa via (DE LIMA *et al.*, 2002).

Estudos anteriores revelam que no estágio avançado da degeneração da retina ocorre uma modificação nos canais para sódio da membrana de células da camada ganglionar (CCG) da retina, o que leva à perda do disparo do potencial de ação. Em consequência disso, a informação visual não pode ser projetada para o centro visual (CHEN, *et al.*, 2013). Dessa forma, os ativadores de canais para sódio podem contribuir para aumentar a sobrevivência das células ganglionares da retina, atuando como agentes neuroprotetores (PEREIRA; ARAUJO, 1997).

Um dos maiores problemas enfrentados no estudo de toxinas derivadas de artrópodes é a pequena quantidade de toxina obtida após a purificação da peçonha bruta. A toxina PnTx4 (6-1), por exemplo, corresponde a apenas 0,65% da peçonha total utilizada no início do processo de purificação. Dessa forma, a síntese de peptídeos tem se mostrado uma ferramenta valiosa na continuidade dos estudos das toxinas animais (EMERICH *et al.*, 2020; FIGUEIREDO *et al.*, 1995).

Baseado nas informações disponíveis, dois peptídeos sintéticos foram obtidos pelo programa Immune Epitope Database and Analysis Resource: PnPa11 (Peptídeo antinociceptivo de *Phoneutria nigriventer*, contendo 11 resíduos de aminoácidos, SEQ ID N° 1 – DCYWSDSCKSR) e PnPa13 (Peptídeo antinociceptivo de *Phoneutria nigriventer*, contendo 13 resíduos de aminoácidos, SEQ ID N° 1 – H-CDSYWSKSSKCRE-NH₂). Suas sequências foram baseadas em estudos das toxinas PnTx4 (5-5) e PnTx4 (6-1), respectivamente.

O peptídeo PnPa11 apresentou um efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor em ratos. Os autores do trabalho sugeriram que esse efeito está relacionado a uma atividade inibitória do sistema glutamatérgico, semelhante ao observado na sua toxina precursora (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O peptídeo PnPa13 revelou um efeito analgésico em ratos, no modelo *in vivo* nociceptivo de dor, em trabalho desenvolvido por EMERICH *et al.*, 2020. Os autores sugerem que esse efeito possa estar relacionado ao envolvimento dos sistemas canabinoides e opioides, embora estudos ainda sejam necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos desse peptídeo.

2.8 Peptídeos e o desenvolvimento de novos fármacos

Os resultados obtidos em pesquisas envolvendo peptídeos transformaram esse compostos em líderes para o desenvolvimento de novos fármacos (PEIGNEUR; DE LIMA; TYTGAT, 2018). Na oftalmologia, a complexidade de inúmeras doenças tem atraído a atenção de pesquisadores e de empresas da área de terapia genética em todo o mundo. Nas últimas décadas, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América aprovou algumas terapias baseadas em proteínas e peptídeos para várias indicações em oftalmologia (**Quadro 2**) (MANDAL *et al.*, 2018).

Os biofármacos aparentam ser extremamente promissores, entretanto, essa classe apresenta alguns desafios que dificultam o seu uso no tratamento de doenças que acometem o sistema ocular. A maioria das proteínas e peptídeos terapêuticos apresentam uma elevada massa molecular e são hidrofílicos, o que restringe a entrada espontânea dessas moléculas através das membranas biológicas, uma vez que estas apresentam natureza lipofílica (MANDAL *et al.*, 2018).

Outro grande desafio é que essas moléculas sofrem de uma série de problemas relacionados a instabilidade física, química e biológica, em razão das suas estruturas complexas. Várias vias de degradação físico-químicas estão envolvidas na instabilidade de proteínas e peptídeos, incluindo desnaturação, adsorção, agregação e precipitação (ZELIKIN; EHRHARDT; HEALY, 2016).

Quadro 2 – Lista de biofármacos aprovados pela FDA

Medicamento	Via de administração	Meia vida	Data de aprovação	Indicação	Referência
Adalimumab (Humira®)	Subcutânea	~ 2 semanas (humano)	Julho de 2016	Uveíte	(BALEVIC; RABINOVICH, 2016)
Aflibercept (Eylea®)	Intravítrea	3,63 dias (coelho); 7,1 dias (humano)	Novembro de 2011	DMRI úmida	(SEMERARO <i>et al.</i> , 2013)
Ranibizumab (Lucentis®)	Intravítrea	2,88 dias (coelho); ~ 9 dias (humano)	Junho de 2006, agosto de 2012	DMRI, edema macular diabético	(XU <i>et al.</i> , 2013)
Pegatanib sódico (Macugen®)	Intravítrea	~ 10 dias (humano)	Dezembro de 2004	DMRI úmida	(VINOES, 2006)
Bevacizumab (Avastin®)	Intravítrea	4,32 dias (coelho); 4,9 dias (humano)	<i>Off-label</i>	DMRI úmida	(NOMOTO <i>et al.</i> , 2009)

Fonte: Adaptado de MANDAL *et al.*, 2018.

A utilização de biofármacos por si já apresenta desafios únicos que independem da sua ação e órgão-alvo. Soma-se a essas dificuldades fatores relacionados à farmacocinética decorrentes da anatomia e fisiologia do olho humano, que, como dito anteriormente, apresenta diversas barreiras que limitam a entrada de fármacos para o seu interior (DELPLACE; PAYNE; SHOICHET, 2015).

2.9 Fatores que afetam a biodisponibilidade intraocular de fármacos

A baixa biodisponibilidade intraocular é uma das principais preocupações quando se pretende tratar alguma doença que acomete o segmento posterior do olho. Inúmeros processos fisiológicos e restrições anatômicas vão permitir que apenas uma pequena porção de dose instilada possa ser absorvida (LEE; ROBINSON, 1986; ZHANG; PRAUSNITZ; EDWARDS, 2004).

Drenagem pré-corneal

Após a instilação de um fármaco, grande parte do volume (entre 80% - 90%) é drenado através do ducto nasolacrimal. Os medicamentos comerciais apresentam um volume médio de 39 μL por gota. Após a instilação de um colírio, o volume lacrimal aumenta momentaneamente de 7 μL para 30 μL , porém rapidamente retorna ao seu volume normal, por meio da drenagem nasolacrimal. A taxa de drenagem normalmente está em torno de 0,16 $\mu\text{L}/\text{min}$ em humanos e 0,07 $\mu\text{L}/\text{min}$ em coelhos. No entanto, quando é administrado um colírio, essa taxa sobe para 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ em humanos e 0,7 $\mu\text{L}/\text{min}$ em coelhos (BACHU *et al.*, 2018; DENG *et al.*, 2016; GAUDANA *et al.*, 2010; GRUMETTO *et al.*, 2002; YAMAMURA *et al.*, 1999).

A drenagem ajuda a manter um volume lacrimal entre 7 e 10 μl , e quanto maior o volume instilado, maior será a drenagem da solução para o saco conjuntival. Um fator que pode influenciar no tempo de permanência do fármaco nessa região é a viscosidade. Uma viscosidade elevada dificulta a eliminação e prolonga o contato do fármaco com a superfície ocular (MANNERMAA *et al.*, 2006).

O pH

O pH também é um fator limitante para permeação de fármacos para o segmento anterior do olho. A instilação de uma substância com valores extremos de pH (ácida ou básica) provoca uma secreção excessiva de lágrimas e conseqüente eliminação do fármaco. Normalmente, medicamentos de uso oftálmico possuem um pH entre 7,0 e 7,7 (GOODMAN;GILMAN, 2005; LEE;ROBINSON, 1986).

Osmolaridade

Uma formulação de uso tópico deve ser isotônica com a lágrima, do contrário a formulação vai ser imediatamente diluída pela produção aumentada do fluido lacrimal. A tonicidade pode ser ajustada nas preparações farmacêuticas utilizando, por exemplo, cloreto de sódio ou manitol (WORAKUL;ROBINSON, 1997).

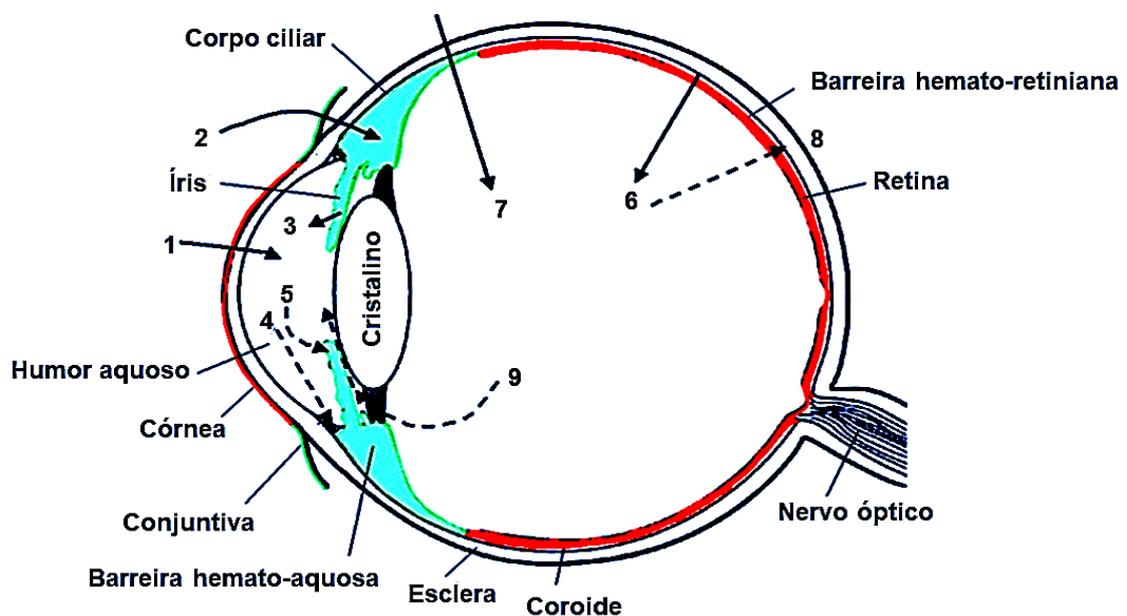
Ligação de fármacos a proteínas

Alguns fármacos têm a capacidade de se ligar a proteínas do fluido lacrimal, o que inativa o seu sítio de ação e reduz o seu efeito terapêutico. Curiosamente, essa ligação também ocorre com algumas estruturas pigmentares do olho, o que resulta em uma farmacocinética dependente da cor do olho (BYE; MODI; STANFORD, 2014; RIMPELÄ *et al.*, 2017; VELLONEN *et al.*, 2018).

Absorção sistêmica de fármacos

Parte da dose de fármaco administrada de maneira tópica pode ser absorvida pela via sistêmica. Esse mecanismo ocorre diretamente na absorção pelos vasos do saco conjuntival ou após a passagem do fármaco pela cavidade nasal, o que reduz a sua biodisponibilidade e pode ocasionar efeitos colaterais (SAUDE, 1994). No segmento posterior do olho, o EPR e os capilares presentes na coroide limitam o acesso de fármacos ao espaço intravítreo. Entretanto, essa barreira é contornada quando se utiliza um fármaco pelas vias oral ou intravenosa (**Figura 11**) (URTTI, 2006).

Figura 11 – Rotas de absorção e eliminação de fármacos no olho



Legenda: (1) permeação transcorneal do líquido lacrimal para o segmento anterior, (2) permeação não corneana do fármaco através da conjuntiva e esclera para a região da úvea (3) distribuição de fármaco a partir da corrente sanguínea via barreira hemato-aquosa na câmara anterior, (4) eliminação do fármaco do segmento anterior pela renovação do humor aquoso para a malha trabecular e canal de Schlemm, (5) eliminação do fármaco do humor aquoso para a circulação sistêmica através da barreira hemato-aquosa, (6) distribuição de fármacos do sangue para o segmento posterior através da barreira hemato-retiniana, (7) administração intravítrea de fármacos, (8) eliminação do fármaco do vítreo pela via posterior através da barreira hemato-retiniana e (9) eliminação do fármaco do vítreo pela via anterior ao segmento posterior.

Fonte: Adaptado de Urtti, 2006; Pág. 1132.

2.10 Administração tópica de fármacos para o segmento posterior do olho

Os medicamentos de aplicação tópica são em grande parte destinados ao tratamento de doenças que acometem as camadas da córnea, conjuntiva, íris ou corpo ciliar (GAUDANA *et al.*, 2009, 2010). Essa via de administração, quando utilizada para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior é considerada uma estratégia farmacológica ineficaz, uma vez que a dose de fármacos que atingem os tecidos do segmento posterior é mínima (menos de 0,001%) e insuficiente para garantir a eficácia do tratamento, devido aos mecanismos de proteção ocular citados anteriormente (URTTI, 2006). Em contrapartida, esta é considerada a via de aplicação oftálmica menos invasiva e de maior adesão do paciente. (GAUDANA *et al.*, 2010; VARELA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Atualmente, existem poucas formulações tópicas destinadas ao tratamento de doenças do segmento ocular posterior. Todavia, nos últimos anos, novos sistemas de liberação de fármacos para esse segmento vêm sendo desenvolvidos, com o objetivo de superar as limitações óbvias da administração ocular tópica (KOMPELLA; KADAM; LEE, 2010; VARELA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020). O emprego de novas tecnologias, como as nanopartículas (BALGURI; ADELLI; MAJUMDAR, 2016; WANG, YANYAN *et al.*, 2018), as emulsões (FATIMA; VIVEK, 2020; NAYAK; MISRA, 2020), lipossomas (LI *et al.*, 2019) e os inserts (BALGURI *et al.*, 2017) têm revelado resultados promissores.

Em estudo realizado por Fedorchak *et al.* (2017), a aplicação tópica de um colírio contendo micropartículas carregadas com brimonidina (fármaco com ação hipotensiva) para o tratamento do glaucoma revelou resultados positivos no controle da pressão intraocular. No tratamento da DMRI, avanços promissores foram obtidos com a utilização tópica de dexametasona complexada com ciclodextrina (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; STEFÁNSSON, 2007; SIGURDSSON *et al.*, 2007).

Os sistemas de liberação controlada, como micropartículas e lipossomas, também vêm sendo investigados para liberação de biofármacos, na tentativa de otimizar o tratamento de doenças oculares que acometem o segmento posterior. No entanto, os desafios para a entrega ocular de biofármacos são inúmeros, e as formulações existentes ainda precisam ser otimizadas (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2017).

Na tentativa de ilustrar o cenário atual da pesquisa de formulações para biofármacos, o **Quadro 3** destaca os principais estudos que vêm sendo realizados, envolvendo sistemas de liberação controlada para a veiculação de proteínas e peptídeos com aplicação em doenças oculares. Curiosamente, os estudos têm se dedicado quase que exclusivamente ao bevacizumabe, hoje utilizado por meio de injeções intravítreas “off label”.

Quadro 3 – Sistemas de liberação controlada destinados a proteínas e peptídeos terapêuticos para o tratamento de doenças oculares

Tipo de sistema	Fármaco	Fase do estudo	Referência
micropartículas de PLGA	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(LI <i>et al.</i> , 2012)
nanopartículas de PLA em micropartículas de PLGA	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i>	(YANDRAPU <i>et al.</i> , 2013)
micropartículas de PLGA	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(YE <i>et al.</i> , 2015)
micropartículas de dióxido de silício	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(FREEMAN <i>et al.</i> , 2012)
nanopartículas de PLGA	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(VARSHOCHIAN <i>et al.</i> , 2013, 2015)
lipossoma	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(ABRISHAMI <i>et al.</i> , 2009)
lipossoma	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(DAVIS <i>et al.</i> , 2014)
filme de PCL	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro e in vivo</i>	(LANCE <i>et al.</i> , 2016)
hidrogel à base de ácido hialurônico e dextrana	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(YU <i>et al.</i> , 2015)
microesferas de hidrogel à base de quitosana e PLGA	bevacizumabe/ranibizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(OSSWALD; KANG-MIELER, 2016)
hidrogel à base de seda	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(LOVETT <i>et al.</i> , 2015)
hidrogel à base de PEG	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2015)
hidrogel à base de PCL	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vitro</i>	(WANG, <i>et al.</i> , 2012)
hidrogel à base de PEG	bevacizumabe/ranibizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , rato	(ALEXANDER <i>et al.</i> , 2014)
hidrogel à base de PEG	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(RAUCK <i>et al.</i> , 2014)
Implante de poliuretano	bevacizumabe	pré-clínico, <i>in vivo</i> , coelho	(PAULA <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Adaptado de MANDAL *et al.*, 2018.

O potencial atribuído a essas formulações está atrelado a capacidade destes sistemas em liberar o fármaco de maneira controlada, o tamanho reduzido e a biocompatibilidade com tecidos e células (LI *et al.*, 2012). Entretanto, ainda que os dados apresentados sejam promissores, grande parte desses estudos envolve formulações destinadas ao uso intravítreo (MELO *et al.*, 2021; NUNES, RENATA PORTELLA *et al.*, 2020). Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos capazes de superar essas barreiras oculares com efeitos adversos mínimos é de grande interesse. Dentre as alternativas mais recentes, tem-se os nanowafers.

2.11 Nanowafers

Os nanowafers são pequenos discos circulares que possuem em sua superfície reservatórios com tamanho nanométrico capazes de abrigar diferentes fármacos e/ou formulações. Esses discos podem ser formados a partir de vários polímeros, como: poli (álcool vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose (CMC), desde que sejam atóxicos e capazes de aderir de maneira satisfatória à superfície ocular (YUAN *et al.*, 2015).

Esse dispositivo é aplicado no olho, com a ponta do dedo, de maneira semelhante às lentes de contato. Assim que aplicado, a matriz polimérica adere à superfície ocular e o nanowafer permanece estático, mesmo com o piscar dos olhos, ao contrário dos colírios e formulação de uso tópico (COURSEY *et al.*, 2015).

Assim, a ação sinérgica entre a matriz polimérica e o fármaco leva a uma liberação controlada do fármaco, o que aumenta o tempo de residência na superfície ocular e, conseqüentemente, a absorção nos tecidos oculares. É importante ressaltar que, ao final do tempo estipulado para a liberação do fármaco, a matriz polimérica se dissolve e desaparece, tornando as superfícies oculares livres de polímeros, o que dispensa a necessidade de remoção do dispositivo (YUAN *et al.*, 2015).

Em trabalho realizado por YUAN *et al.* (2015), o nanowafer fabricado de PVA e preenchido com doxiciclina se mostrou eficaz em promover a liberação sustentada ao longo de 24 hs em olhos de ratos. Em um segundo estudo, utilizou-se o nanowafer fabricado com CMC e carregado com dexametasona para o tratamento em modelo animal que simula da doença do olho seco. Os autores observaram que o nanowafer apresentou a mesma eficiência que o colírio de dexametasona, embora tenha sido utilizada uma dose menor do fármaco (COURSEY *et al.*, 2015).

Os estudos que empregam o nanowafer como um dispositivo para entrega ocular de fármacos revelam resultados promissores. Dessa forma, a aplicação desses

dispositivos para produtos biofármacos parece ser uma alternativa esperançosa para contornar as limitações inerentes a essa classe e favorecer o estudo desses agentes em doenças oculares.

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade de peptídeos derivados da peçonha da Aranha *Phoneutria nigriventer* em doenças oculares neurodegenerativas e avaliar como uma formulação nanoestruturada poderia contribuir na melhora da biodisponibilidade destes peptídeos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a segurança *in vitro* de diferentes concentrações dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 em linhagem celular de epitélio pigmentar da retina humana (ARPE-19).
- ✓ Investigar a atividade antiangiogênica de diferentes doses dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, em modelo de membrana corioalantóica (CAM, do inglês *chorioallantoic membrane*) de ovo de galinha.
- ✓ Avaliar a segurança *in vivo* de diferentes doses dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 administrados por via intravítrea em ratos, por meio de avaliação clínica, PIO, análise eletrorretinográfica e histopatológica.
- ✓ Investigar a eficácia neuroprotetora *in vivo* dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, em modelo experimental de degeneração da retina induzida por Light-emitting diode (LED) azul.
- ✓ Avaliar a segurança *in vivo* de diferentes doses do peptídeo PnPP-19 em modelo alternativo de irritação em CAM de ovo de galinha.
- ✓ Avaliar a segurança *in vivo* de diferentes doses do peptídeo PnPP-19 administrado por via tópica em ratos, por meio de avaliação clínica, análise eletrorretinográfica e histopatológica.
- ✓ Avaliar a atividade hipotensiva do peptídeo PnPP-19 em modelo experimental de degeneração da retina por meio da monitorização da PIO.
- ✓ Investigar a eficácia neuroprotetora *in vivo* do peptídeo PnPP-19, em modelo experimental de degeneração de retina induzido por isquemia.
- ✓ Avaliar a eficácia do nanowafer na liberação controlada do peptídeo PnPP-19, por meio da distribuição da fluorescência e seus efeitos em modelo de degeneração da retina induzida por isquemia.

**PARTE I: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE NEUROPROTETORA NO
USO INTRAVÍTREO DOS PEPTÍDEOS PnPa11 E PnPa13 DERIVADOS DE TOXINAS
PRESENTES NA PEÇONHA DA ARANHA *Phoneutria nigriventer***

1 INTRODUÇÃO

A inflamação e a apoptose são processos patológicos importantes que estão envolvidos no processo de degeneração da retina, ocasionado por doenças como a DMRI (DUNAIEF *et al.*, 2002; KELTNER, 1983; SCHUMAN *et al.*, 2009). Essas alterações podem levar a um comprometimento visual ou até mesmo à cegueira, trazendo inúmeros prejuízos ao dia a dia desses indivíduos (WONG *et al.*, 2014).

Estudos anteriores mostraram que o LED azul é prejudicial aos olhos e pode desencadear danos à retina, em especial aos fotorreceptores (GORDON *et al.*, 2002; MOTHET *et al.*, 2002; SCHUR *et al.*, 2018; STARK *et al.*, 1985). Assim, vários estudos utilizam a exposição aguda a luz do LED azul como um modelo experimental de degeneração da retina com o objetivo de simular o que ocorre na DMRI (NAKAMURA *et al.*, 2018; WIELGUS *et al.*, 2010).

Por outro lado, uma via valiosa para impedir o processo de neurodegeneração é a alteração dos receptores NMDA, uma vez que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da retina. Algumas toxinas da peçonha da *Phoneutria nigriventer*, como PnTx4 (5-5) e PnTx4 (6-1) são capazes de inibir a captação de glutamato e atuar como agentes neuroprotetores (PEIGNEUR *et al.*, 2018).

Além disso, em estado avançado da degeneração retiniana, ocorre uma modificação nos canais para sódio da membrana de células ganglionares da retina o que leva a uma redução na densidade celular da CCG e comprometimento da função visual. Assim, agentes terapêuticos que atuam nesses canais podem aumentar a sobrevivência das células ganglionares e proteger a retina (CHEN *et al.*, 2013; PEREIRA e ARAUJO, 1997). A toxina PnTx4 (6-1) possui atividade em canais para sódio e, dessa forma, essa ação também pode contribuir para a proteger a retina (DE LIMA *et al.*, 2002).

Logo, neste primeiro capítulo os efeitos neuroprotetores dos peptídeos PnPa11 — baseando-nos no estudo da toxina PnTx4 (5-5) — e PnPa13 — baseando-nos no estudo da toxina PnTx4 (6-1) — foram investigados.

Inicialmente, considerando a carência de estudos que avaliem a toxicidade e segurança da aplicação ocular desses peptídeos sintéticos, o capítulo abordou a viabilidade do uso intravítreo do PnPa11 e PnPa13 em olhos de ratos, por meio da execução de testes *in vitro* e *in vivo*.

Em um segundo momento, o modelo de degeneração da retina induzido pela luz do LED azul foi empregado para avaliar as possíveis ações neuroprotetoras dos peptídeos, por meio de testes eletrofisiológicos e morfológicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Peptídeos

Os peptídeos sintéticos derivados de toxinas da *Phoneutria nigriventer* foram projetados com base em estudos *in silico*. Para o peptídeo PnPa11, o docking molecular foi realizado por meio do programa ClusPro proteína-proteína. Os resíduos da toxina PnTx4 (5-5) que supostamente interagem com o canal para sódio do inseto (também previsto por modelagem) foram identificados e posteriormente submetidos a um novo docking e o peptídeo com maior interação foi selecionado e sintetizado. Este peptídeo tinha 11 resíduos de aminoácidos, exibia conformação cíclica e foi denominado PnPa11.

Para o peptídeo PnPa13, a ferramenta de predição de epítomos foi usada para detectar os resíduos mais expostos na sequência de aminoácidos da toxina PnTx4 (6-5). Este peptídeo possuía 13 resíduos de aminoácidos, conformação linear, e o mesmo foi denominado PnPa13.

Ambos os peptídeos foram sintetizados usando a estratégia Fmoc de fase sólida (CHAN; WHITE, 2000). Os peptídeos foram gentilmente cedidos pela professora Maria Elena de Lima Perez Garcia (Santa Casa de Belo Horizonte) e o trabalho foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os números de registro AF2229D (**Anexo 1**) AB43F20 e (**Anexo 2**).

2.1.2 Teste de viabilidade celular

Água ultrapura, Mili Q[®] plus, Merck Millipore, EUA. Meio de cultura DMEM-F12 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*). Soro fetal bovino (SFB) e PSA (penicilina - estreptomicina - anfotericina B) 100 x, Gibco[®], EUA. Linhagem celular ARPE-19, Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. Sulforrodamina B (SRB), Tris base e ácido tricloroacético, Sigma-Aldrich, EUA. Cloreto de sódio e ácido acético, Synth, Brasil.

2.1.3 Avaliação da atividade antiangiogênica em membrana corioalantóica de galinha

Água ultrapura, Mili Q[®] plus, Merck Millipore, EUA. Ovos embrionados da ave *Gallus gallus domesticus* - linhagem Ross, Rivelli, Brasil. Solução salina estéril, Equiplex, Brasil. Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato monobásico de potássio, Synth, Brasil. Bevacizumabe, Avastin[®], Roche, Brasil.

2.1.4 Avaliação da toxicidade in vivo

Cloreto de sódio, Synth, Brasil. Água ultrapura, Mili Q[®] plus, Merck Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Tropicamida 1% (m/v), Mydracyl[®], Alcon, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®], e cloridrato de xilazina, Anasedan[®] Ceva, Brasil. Nitrogênio líquido, Nitrovet, Brasil. Entellan[®], Merck, Alemanha.

2.1.5 Avaliação da atividade neuroprotetora in vivo

Solução salina estéril, Equiplax, Brasil. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®] Ceva, Brasil. Glutaraldeído, Epon 812, paraformaldeído, TritonX-100, citrato de sódio, peróxido de hidrogênio, SIGMAFAST, TrisHCl, desoxicolato de sódio, Sigma-Aldrich, EUA. Lâminas silanizadas, Knittel, Brasil. Kit TUNEL, Roche, EUA. DAPI (4', 6-Diamidin-2-fenilindol), Serva Electrophoresis, Germany. Tissue Tek[®], OCT, Japan. Entellan[®], Merck, Alemanha. Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato monobásico de potássio e sacarose, Tween 20, EDTA, Synth, Brasil. Anti-fosfo-Akt1 de coelho e Total-Akt1, Biotek, Eslováquia. Fosfo-Erk1/2, total-Erk1/2, anti-NMDA e anticorpos anti-NMDA, Invitrogen EUA. Anti-β-actina de camundongo, Santa Cruz Laboratories, Brasil. Nitrogênio líquido, Nitrovet, Brasil.

2.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água Milli-Q[®], Merck Millipore, EUA. Balança analítica Sartorius, Alemanha. Microscópio óptico Axio Imager M2, Zeiss, Alemanha. Incubadora automática digital, Premium Ecológica, Brasil. Estereomicroscópio, modelo DM4000B, acoplado a uma câmera digital CCD, modelo DFC 280, Leica, Alemanha. Eletrorretinograma Espion E2 Colordome, estimulador de LED Ganzfeld ColorDome[®], software Espion E³, Diagnosys LLC, EUA. Eletrodos tipo agulha e lente, ERG Jet, Fabrinal SA, Suíça. Tonômetro veterinário, Tono-PenVet[®], Reichert, EUA. Oftalmoscópio binocular indireto, Welch Allin, Brasil. Espectrofotômetro Autoflex da Bruker, Reino Unido. Leitor de microplacas, Bio-rad, San Diego. Centrífuga modelo GS-6R, Beckman Coulter Life Sciences, EUA. Lente Volk 90D, Welch Allyn, EUA. Microscópio eletrônico de transmissão, Tecnai G2-12 - FEI Spirit Biotwin. Microscópio confocal de varredura a laser LSM 880, ZEISS, Alemanha. Criostato CM1850, Leica, Alemanha. Image Quant LAS 4000, GE Healthcare.

2.3 Animais

Foram utilizados ratos da espécie Wistar, machos, adultos (7 semanas de idade), pesando aproximadamente 200 g, adquiridos no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (27 ± 5 °C) e luminosidade (12 hs luz/12 hs escuro) sem restrição de água ou comida.

Os estudos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais Experimentais da UFMG (CEUA-UFMG) sob os protocolos nº 325/2017 – **Anexo 3** e 107/2018 – **Anexo 4**. Todos os testes foram realizados seguindo o estatuto para o uso de animais em pesquisa oftálmica e visão da ARVO (do inglês *Association for Research in Vision and Ophthalmology*).

2.4 Métodos

2.4.1 Ensaio de proliferação celular utilizando a sulforrodamina B (SRB)

Para avaliação da toxicidade *in vitro* dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, foi realizado um ensaio de viabilidade celular em epitélio pigmentado da retina humana, ARPE-19. O ensaio de SRB trata-se de um método de citotoxicidade de quantificação colorimétrica da proteína celular em culturas de células coradas com SRB, um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfônicos, solúvel em água. Sob condições ácidas o corante liga-se aos resíduos aminoácidos de proteínas celulares. Um aumento ou diminuição do número de células resulta em uma alteração proporcional da quantidade do corante incorporado nas células em cultura, o que revela o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (SKEHAN *et al.*, 1990).

Para a realização do ensaio, as células foram incubadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% PSA em estufa com atmosfera úmida (5% de CO₂ a 37 °C, seguindo a metodologia descrita por TOLEDO *et al.* (2019).

Para o preparo das soluções de peptídeo, adicionou-se a um criotubo 180 µL de meio DMEM-F12, transferiu-se uma alíquota de 20 µL da solução estoque de peptídeo (descrito no tópico 2.4.1) e homogeneizou-se. A concentração final foi 5.000 µg/mL.

Inicialmente, aplicou-se cerca de 10.000 células/poço em placas de 96 poços. As células foram incubadas nas mesmas condições do cultivo celular durante 24 hs. Após esse período, as células receberam os peptídeos PnPa11 e PnPa13 em concentrações crescentes (0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0; 8,0, 12,5 e 25,0 µg/mL), preparados a partir

de uma solução na concentração de 5.000 µg/mL (descrita anteriormente). As placas foram incubadas por mais 48 hs.

Ao final deste período, as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 10% (v/v) e incubadas por 1 h a 4 °C. As células foram lavadas com água e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, as células foram coradas com solução SRB 0,057% (v/v) em ácido acético 1% (v/v) durante 30 min a 30 °C. As células foram novamente lavadas com ácido acético 1% (v/v), secas e depois incubadas com base tris, 110 mM, pH 10,5 e agitadas durante 5 min.

A absorbância foi medida (510 nm) usando um leitor de microplacas. Três poços por dose foram utilizados em três placas independentes. A viabilidade celular foi calculada como uma porcentagem em relação ao controle (Equação 2). Além disso, foram observadas alterações morfológicas nas células em microscópio óptico.

$$\text{Viabilidade celular} = 100 \times \frac{\text{média da absorbância do poço} - \text{média da absorbância da tris base}}{\text{média da absorbância do controle} - \text{média da absorbância da tris base}} \quad (2)$$

Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de viabilidade celular ± desvio padrão (DP).

2.4.2 Ensaio CAM

A avaliação da atividade angiogênica dos peptídeos foi realizada por meio do ensaio da membrana corioalantóica de embrião de galinha, o teste CAM (do inglês *chorioallantoic membrane*), descrito por Auerbach e colaboradores (1974).

Para realização do teste, ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus domesticus*) foram incubados a 37 ± 2 °C e 60 ± 5 % da umidade relativa do ar. No 3º dia de desenvolvimento embrionário, um pequeno orifício (1 cm²) foi feito na casca do ovo e a membrana interna da casca foi removida para expor a membrana corioalantóica. O orifício foi selado com fita transparente e, em seguida, os ovos retornaram à incubadora por mais 48 hs.

No 5º e no 6º dia, foram adicionados a superfície da membrana corioalantóica 50 µL de uma solução contendo PnPa11 ou PnPP13. As doses das soluções utilizadas foram: 0,50, 1,25, 2,50, 3,75 e 5,00 µg/mL obtidas a partir da diluição da solução estoque (descrita no item 2.4.1) em salina estéril. O tampão PBS (do inglês *phosphate buffer solution*) foi definido como o controle negativo e o bevacizumabe (250 µg/mL) como o controle positivo. Para cada grupo foi utilizado um total de 10 ovos.

No 7º dia, as membranas foram fotografadas e as imagens obtidas foram processadas utilizando-se o software ImageJ® (versão 1.50i - National Institutes of Health, EUA). Posteriormente, realizou-se uma análise quantitativa da rede vascular por meio do software Angiotool® (National Câncer Institute, EUA). Com o auxílio deste programa, pode-se investigar as diferenças em relação à área vascularizada, à lacunaridade e ao número total de junções.

Para o cálculo da área vascularizada, o grupo que recebeu tempão PBS foi definido como 100% e os resultados foram expressos como a média da porcentagem \pm DP em relação a este grupo. Em relação à lacunaridade e ao número de junções a análise estatística foi realizada comparando a média \pm DP do grupo salina aos demais.

2.4.3 Estudo da toxicidade in vivo

2.4.3.1 Injeções intravítreas

Para investigar a toxicidade intravítrea dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 90 mg/kg de cetamina:10 mg/kg de cloridrato de xilazina. Previamente as injeções intravítreas, os olhos direitos foram anestesiados com uma gota do colírio anestésico.

Para as injeções intravítreas, os animais foram divididos em três grupos: PnPa11 (n = 20), PnPa13 (n = 20) e controle (solução salina, NaCl 0,9% [m/v]) (n = 4). Os grupos que receberam os peptídeos foram subdivididos de acordo com a dose intravítrea do peptídeo: 0,50; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00 μ g/mL. Logo, foram utilizados 4 animais para cada dose.

As injeções foram realizadas nos olhos direitos, com uma agulha de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre acoplada a uma seringa, inserida próximo ao limbo. Além disso, a agulha foi mantida no lugar por 30 s para evitar escape pelo local da aplicação.

O volume de injeção intravítrea foi de 10 μ L (BAE *et al.*, 2017) e levou em consideração a diluição que ocorre no humor vítreo, tendo em vista que o volume em ratos adultos é de \sim 50 μ L (SHA; KWONG, 2006). Os olhos esquerdos de todos os animais foram mantidos intactos.

Ao final de cada injeção, o fundo de olho de cada animal foi avaliado com uma lente Volk 90D e oftalmoscópio binocular indireto, a fim de se detectar possíveis alterações decorrentes do procedimento, como hemorragias e o descolamento de retina.

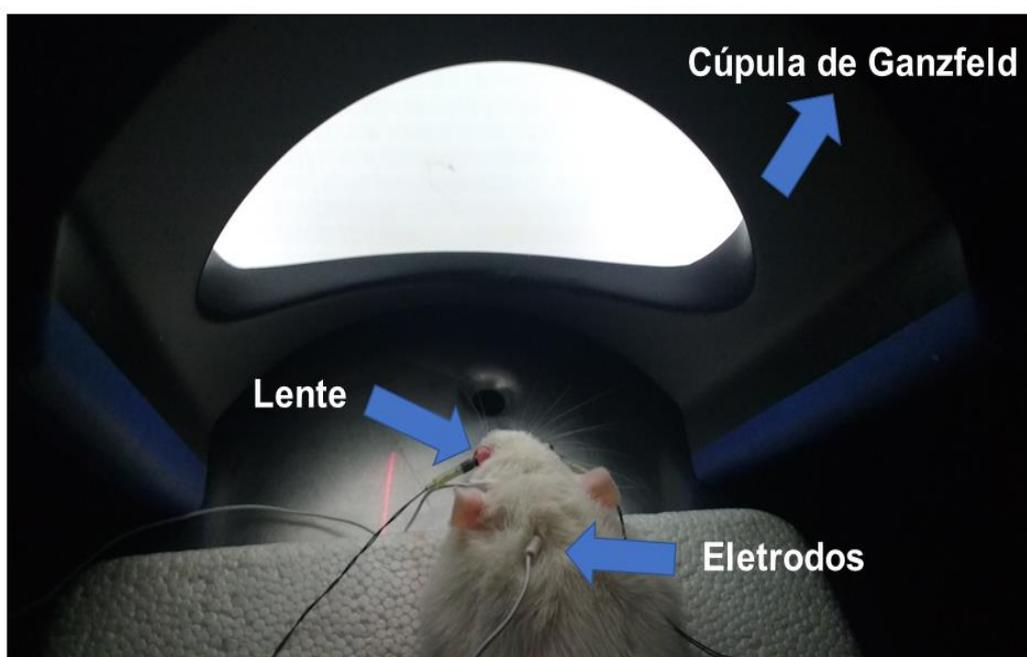
2.4.3.2 Avaliação do estado funcional da retina por eletrorretinografia

O estudo funcional da retina foi avaliado pelo eletrorretinograma (ERG) em condição escotópica previamente e após sete dias da realização das injeções intravítreas. Para realização do teste, os animais foram adaptados ao escuro por 12 hs, anestesiados via injeção intraperitoneal (como descrito anteriormente, seção 2.4.4.1) e as pupilas foram dilatadas com uma gota de tropicamida 1% (m/v). Após 10 min, os olhos foram anestesiados com colírio anestésico[®]. Os animais foram posicionados sob um suporte de isopor adaptado à cúpula de Ganzfeld e cobertos com uma manta para a manutenção da temperatura corporal (**Figura 12**).

A avaliação foi realizada simultaneamente nos dois olhos, colocando sobre a superfície de cada olho um eletrodo bipolar do tipo lente de contato adaptada para olhos de ratos e fixando de maneira subcutânea três eletrodos do tipo agulha. Dois eletrodos foram posicionados na região frontal acima dos olhos e o terceiro (eletrodo terra) foi colocado no dorso do animal. Foi definido um valor de impedância $< 5k\Omega$ em cada eletrodo.

Os olhos receberam estímulos luminosos por meio de um estimulador de LED. Durante o teste, flashes de luz branca com duração de 4 milissegundos (ms) foram produzidos em 11 etapas com luminosidade crescente ($0,003 - 3 \text{ cd.s.m}^{-2}$). Os resultados foram amplificados e analisados com o software Espion E³. Todo o procedimento foi realizado em conformidade com as diretrizes da ISCEV (do inglês *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*).

Figura 12 – Avaliação funcional da retina por ERG

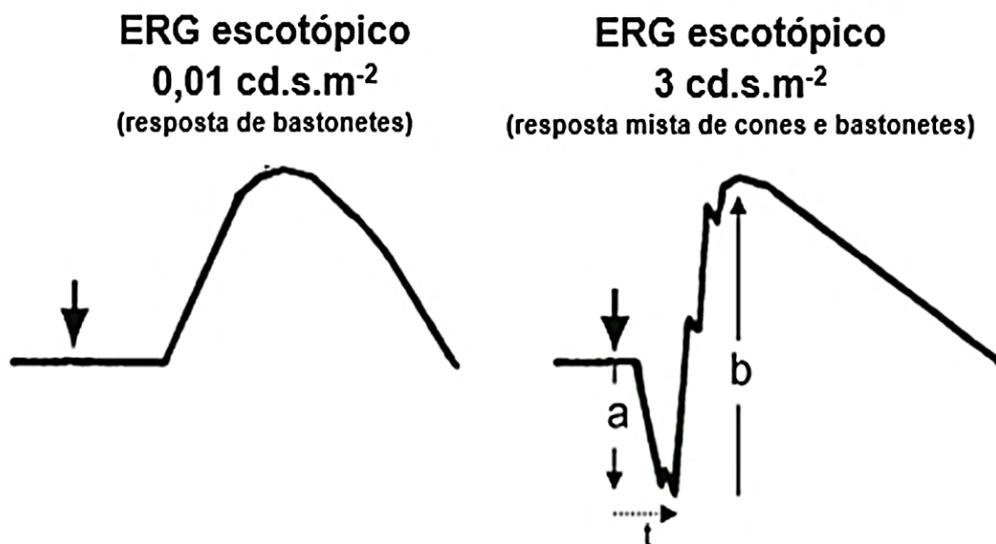


Os dados foram avaliados a partir de comparações entre as amplitudes, expressas em microvolts (μV), e tempos implícitos, expressos em ms, das ondas a e b em relação à intensidade dos diferentes estímulos luminosos. A média \pm DP dos valores obtidos em cada dose de peptídeo testada, foi comparada ao grupo controle, que recebeu o veículo (salina).

A amplitude da onda a foi calculada pela medida da linha de base pré-estímulo até o vale da onda a. A amplitude da onda b foi medida do vale da onda a até o pico da onda b. Os tempos implícitos da onda a e da onda b foram medidos desde o momento do flash até o pico da onda, representados na **Figura 13** (MCCULLOCH *et al.*, 2015).

Estudos anteriores mostraram que os estímulos mais importantes para investigar possíveis alterações na atividade da retina de rato são a $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, para avaliar a resposta dos bastonetes, e a 3 cd.s.m^{-2} , para analisar as respostas combinadas de cones e bastonetes (BALL; PETRY, 2000; BAYER *et al.*, 2001). Desta forma, esses foram os estímulos analisados nesse trabalho.

Figura 13 – Padrões de avaliação eletrofisiológica da retina



Legenda: As setas pretas indicam o momento em que ocorrem os estímulos luminosos.

Fonte: Adaptado de MCCULLOCH *et al.*, 2015.

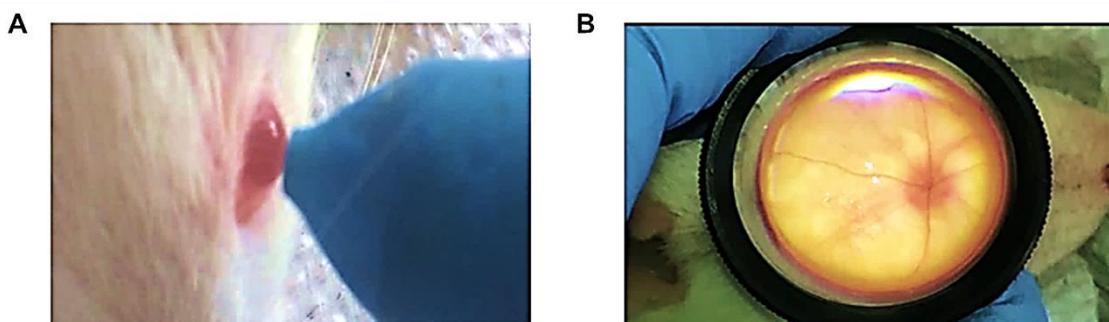
2.4.3.3 Monitoramento da pressão intraocular e avaliação do fundo de olho

A PIO foi monitorada com um tonômetro veterinário antes da injeção intravítrea, após a anestesia dos animais, e depois do ERG (no 7º dia). Para as medições, os animais foram mantidos em decúbito ventral e as aferições foram realizadas no mesmo horário, a fim de se evitar variações decorrentes do ritmo circadiano do animal.

Os valores de PIO foram analisados em relação à diferença entre as médias \pm DP dos valores obtidos no início do estudo e após 7 dias, visando verificar a ocorrência de alterações que indicassem danos aos olhos dos animais. Quatro leituras foram feitas para cada olho direito ($n = 4$).

A avaliação do fundo de olho foi realizada com o objetivo de detectar possíveis alterações, como hemorragias, coagulação, descolamento de retina e escavação do nervo óptico. A avaliação foi realizada com o auxílio de uma lente Volk 90 D e de um oftalmoscópio binocular indireto, imediatamente antes das injeções intravítreas (após anestesia dos animais) e depois da realização do ERG, enquanto os animais estavam anestesiados (**Figura 14**).

Figura 14 – Procedimentos para avaliação da toxicidade do uso intravítreo do PnPa11 e PnPa13



Legenda: A) Medição da pressão intraocular de ratos. B) Avaliação do fundo de olho com o auxílio de uma lente Volk 90 D.

2.4.3.4 Análise histológica

Ao final das análises, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésicos (270:30 cetamina/xilazina mg/kg) via intraperitoneal e os olhos coletados para análise histológica. Inicialmente, os olhos foram fixados em solução de Davidson (álcool 95% (v/v), formaldeído, ácido acético glacial e água destilada) por 24 hs. Após este período, os olhos foram transferidos para um recipiente contendo uma solução de álcool 70% (v/v), onde permaneceram por outras 24 hs. Para o processamento das amostras, os olhos foram cuidadosamente seccionados na região do nervo óptico e então desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% - 100%) por 48 hs em cada banho; na sequência, submetidos a uma clarificação em xilol por 24 hs. Posteriormente, o material foi incluído em parafina para obtenção dos blocos.

Para montagem das lâminas, realizou-se cortes com espessura de 5 μ m aos blocos de parafina, com auxílio de um micrótomo. Em seguida, os cortes foram adicionados a

lâmina e foram corados com hematoxilina e eosina. Por fim, lâmina e lamínula foram fixadas com o uso de Entellan®.

A morfologia da retina e a presença de células inflamatórias foram avaliadas em microscopia óptica utilizando um microscópio óptico e lente objetiva com aumento de 20x. A espessura da camada nuclear externa (CNE) foi medida a ~250 µm de distância do nervo óptico. Um total de três medidas foram realizadas para cada lâmina histológica (n = 3).

2.4.5 Estudo de degeneração retiniana

2.4.5.1 Modelo de degeneração da retina induzido pela luz do LED azul

Para o estudo de degeneração da retina, ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: PnPa11 (1,25 µg/mL, n = 8), PnPa13 (1,25 µg/mL, n = 8), veículo (solução salina, n = 8) e saudável (sem qualquer procedimento, n = 8). A injeção intravítrea foi realizada nos olhos direitos para os grupos PnPa11, PnPa13 e veículo, conforme descrito anteriormente (seção 2.4.4.1). Nenhum procedimento foi realizado nos olhos esquerdos.

Após a injeção intravítrea, os animais foram mantidos em ambiente escuro por 12 hs. Em seguida, os animais dos grupos PnPa11, PnPa13 e veículo foram expostos a luz do LED azul com intensidade de 2.000 lux por 72 hs (6 dias com 12 hs de exposição cada, respeitando o ciclo claro/escuro, sem restrição de alimento ou água).

Para a exposição, as lâmpadas foram afixadas no topo de gaiolas de madeira com dimensões de 57 cm x 57 cm x 60 cm. Após a exposição luminosa os animais foram preparados para a realização do exame ERG, conforme descrito anteriormente (seção 2.4.4.2). No estudo da degeneração da retina, ERG foi realizado após 1, 7 e 15 dias da exposição a luz do LED azul.

Depois do último ERG, os animais foram sacrificados e os olhos enucleados (conforme descrito na seção 2.4.4.4). Para as análises subsequentes, os olhos foram cuidadosamente seccionados na região no nervo óptico e preparados de acordo com cada análise.

2.4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para realização da MET, as amostras (n = 2) foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) a 20°C por 2 hs. Em seguida, os olhos foram fixados com tetróxido de ósmio 1% (v/v) por mais 2 hs (CHEN et al., 2018). Em sequência, as amostradas foram encaminhadas ao Centro de microscopia da UFMG, onde prosseguiu-se com as demais etapas de preparação que envolvem a desidratação em

etanol e a imersão em epon 812. Os cortes de retina foram obtidos e examinados com um microscópio eletrônico de transmissão a 120 kV (localizado no Centro de Microscopia da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

2.4.5.3 Análise histológica

Para análise histológica, após obtenção das amostras, as mesmas foram preparadas conforme descrito anteriormente, seção 2.4.4.4.

2.4.5.4 Ensaio de imunohistoquímica Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Inicialmente, o material foi fixado em paraformaldeído a 8% (v/v) em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 por 12 hs. Ao final desse período, as amostras foram transferidas para uma solução de sacarose a 20% (p/v), onde se manteve por cerca de 4 a 5 hs. Em seguida, para a crioproteção, as amostras foram imersas em solução de sacarose a 40% (p/v) por mais 12 hs. Por último, os olhos foram enxaguados com PBS, pH 7,4, incorporados a um meio de inclusão para congelamento (Tissue-Tek®) e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido.

A partir dos blocos, foram obtidos cortes sagitais com 30 µm de espessura utilizando um criostato CM1850 a -25 °C, localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI/UFMG). As seções foram adicionadas a lâminas silanizadas e armazenados a -80° C. Em sequência, lavou-se as lâminas com TritonX-100 0,1% (v/v) e citrato de sódio 0,1% (v/v) em PBS e as incubou com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) por 15 min. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e submetidos ao ensaio TUNEL seguindo o protocolo do fabricante. Para facilitar a visualização os tecidos da retina foram contrastados com DAPI.

A imunofluorescência foi observada em microscópio confocal de varredura a laser LSM 880 localizado no CAPI/UFMG e as fotografias obtidas utilizando uma lente objetiva com aumento de 40x, na região em torno do nervo óptico. A intensidade de fluorescência de células TUNEL-positivas foi calculada utilizando o software ImageJ® (versão 1.50i - National Institutes of Health, EUA) utilizando um total de 3 amostras por grupo. Para análise estatística, a intensidade média da imunofluorescência do veículo foi definida como 100% e o resultados foram expressos como média da porcentagem ± DP em relação a este grupo.

2.4.5.5 Immunoblotting

A técnica de immunoblotting foi realizada segundo SILVA *et al.*, 2017. Resumidamente, as amostras obtidas foram lisadas em tampão RIPA (0,15 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,05 M EDTA, 1% nonidet P40, 1% TritonX-100, 0,05% desoxicolato de sódio 0,1%) contendo um coquetel de inibidores de protease SIGMAFAST®. As amostras de cada grupo foram preparadas contendo 100 µg de proteína celular total e corridas em um gel de poliácridamida do tipo SDS-PAGE (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), seguido por eletroblotting (transferência) em membrana de nitrocelulose.

As membranas foram submetidas ao bloqueio com tampão TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 7.4, e 0,05 Tween 20 contendo 5% de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) por 1 h, seguido de incubação overnight, a 4°C com os anticorpos primários. O anticorpos utilizados neste estudo, anti-fosfo-Akt1 de coelho, 1: 1000 (X20-A # 127DB Biotectk®, Eslováquia); total-Akt1, 1: 1000 (C-20A # 126 / DB Biotectk®, Eslováquia), fosfo-Erk1/2, 1: 1000 (MA515173, Invitrogen®, EUA); total-Erk1/2 1: 1000 (MA515134 / Invitrogen®, EUA); anti-NMDA 1: 1000 (NR2B # pS1480 / Invitrogen®, EUA); anticorpos anti-NMDA 1: 1000 (NR2A # 480031 / Invitrogen®, EUA) e anti-β-actina de camundongo 1:1000 (Santa Cruz Laboratories, Brasil) foram diluídos em tampão TBS com 3% (m/v) de BSA.

Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes, durante 5 min, em tampão TBS e, posteriormente, incubadas por 2 hs com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) IgG anti-coelho (1:3000) ou anticorpo de cabra anti-camundongo (1: 25000), diluído em 1 % de albumina em TBS-T. Em seguida, lavou-se novamente as membranas, durante 10 min com TBS (procedimento realizado três vezes) e as incubou em reagente de detecção para western blot ECL Luminata.

Para digitalização das imagens, as membranas foram analisadas na plataforma Image Quant LAS 4000. A intensidade da banda foi quantificada pelo software ImageJ® (versão 1.50i - National Institutes of Health, EUA) e o valor das bandas (número de pixels) foi dividido pelo valor da β-actina ou pelo total das bandas para normalizar os níveis de expressão ou fosforilação.

2.5 Análise estatística

Para todas as análises, foram determinados os valores de médias \pm DP para o número de experimentos independentes indicado para cada ensaio. Em todos os testes adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$.

Para avaliar a normalidade do padrão das curvas ERG, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Na avaliação da citotoxicidade, ensaio CAM, histologia e análise TUNEL, os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey.

Para calcular a diferença entre amplitudes, tempos implícitos das ondas a e b, PIO, análise de Western blot, utilizou-se ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 8.4.2.

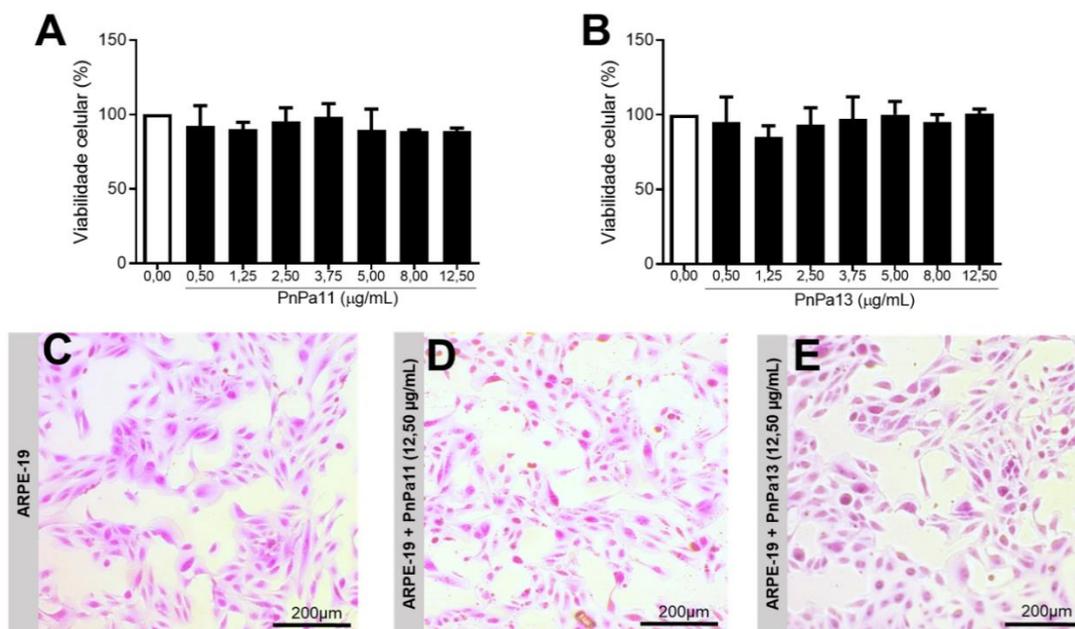
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de viabilidade celular em células ARPE-19

As células ARPE-19 estão presentes em muitos estudos *in vitro* que envolvem a pesquisa de novos agentes terapêuticos para diferentes doenças oculares (SILVA *et al.*, 2018; TOLEDO *et al.*, 2019). Entretanto, em nossa revisão, não foram encontrados estudos que investiguem a toxicidade da peçonha da *Phoneutria nigriventer*, bem como de suas toxinas ou peptídeos derivados em cultura de células ARPE-19.

Desta forma, diferentes concentrações dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 (0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 8,00 e 12,50 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas em nosso estudo *in vitro* para avaliar a toxicidade de ambos os peptídeos a estas células (**Figura 15**).

Figura 15 – Citotoxicidade dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 sobre células ARPE-19



Legenda: A) viabilidade celular na presença de concentrações crescentes de PnPa11. B) viabilidade celular na presença de concentrações crescentes de PnPa13. C) visualização por microscopia óptica de células ARPE-19. D) visualização por microscopia óptica de células ARPE-19 após o tratamento com PnPa11. E) visualização por microscopia óptica de células ARPE-19 após o tratamento com PnPa13. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey (n = 3 poços por dose, em três experimentos independentes). O grupo controle foi definido como 100%. Os dados são representados por média \pm DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (*p < 0,05).

Nossos resultados revelaram que a presença de PnPa11 ou PnPa13 na cultura de células ARPE-19, nas concentrações testadas, não induziu à morte celular. Conforme apresentado nas **Figuras 15A e 15B**, nenhuma diferença na viabilidade celular foi observada para os grupos tratados com PnPa11 ou PnPa13. Além disso, em comparação com o controle (**Figura 15C**), nenhuma alteração morfológica foi notada nos grupos de células tratadas com peptídeo (**Figuras 15D e 15E**).

Curiosamente, um estudo realizado por DE PAULA LE SUEUR *et al.* (2005) a toxicidade da peçonha da *Phoneutria nigriventer* em diferentes culturas celulares foi investigado e os autores observaram que, nas concentrações de 14,6 e 292 µg/mL, a peçonha não exibiu toxicidade significativa nas linhas celulares ECV304 e MDCK (células endoteliais

e células epiteliais, respectivamente) mas, em concentrações mais altas, reduziu ligeiramente a viabilidade das células de glioma C6.

Nossos resultados revelaram que os peptídeos PnPa11 e PnPa13, nas concentrações testadas, não promoveram efeitos citotóxicos significativos, indicando sua segurança para as células da retina. As doses inferiores (0,50 – 5,00 µg/mL) foram escolhidas para os estudos subsequentes.

3.2 Avaliação da atividade angiogênica dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 em membrana corioalantóica de embrião de galinha

A CAM é uma membrana extraembrionária formada pela mesodérmica do córion e da alantoide durante o quarto dia de desenvolvimento embrionário (RIBATTI, 2010). Nesta camada dupla, desenvolve-se uma rede vascular extremamente rica que está ligada à circulação embrionária pelas artérias e veias alantóicas. Os vasos primitivos crescem rapidamente até o oitavo dia quando dão origem a um plexo capilar que medeia as trocas gasosas com o ambiente externo. A proliferação vascular permanece intensa até o 11º dia, quando o índice mitótico passa a decrescer rapidamente. O sistema vascular atinge seu arranjo final no 18º dia, logo antes da eclosão (RIBATTI, 2008; RIBATTI *et al.*, 2001).

A CAM também é utilizada há bastante tempo para estudar moléculas que possuem atividade pró-angiogênica ou antiangiogênica. Ao adicionar um composto pró-angiogênico, é possível observar um aumento na densidade dos vasos cerca de 72 hs após a estimulação. Por outro lado, quando um composto angiostático é testado, os vasos tornam-se menos densos e eventualmente desaparecem (RIBATTI, 2010; RIBATTI *et al.*, 2001) Assim, esse método tem-se mostrado de extrema importância para investigar a atividade angiogênica de novas moléculas com potencial terapêutico (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005).

Com o objetivo de avaliar a potencial atividade angiogênica dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, diferentes doses destes foram aplicadas no 5º e 6º dia de desenvolvimento embrionário, período com intensa proliferação de vasos (RIBATTI, 2012).

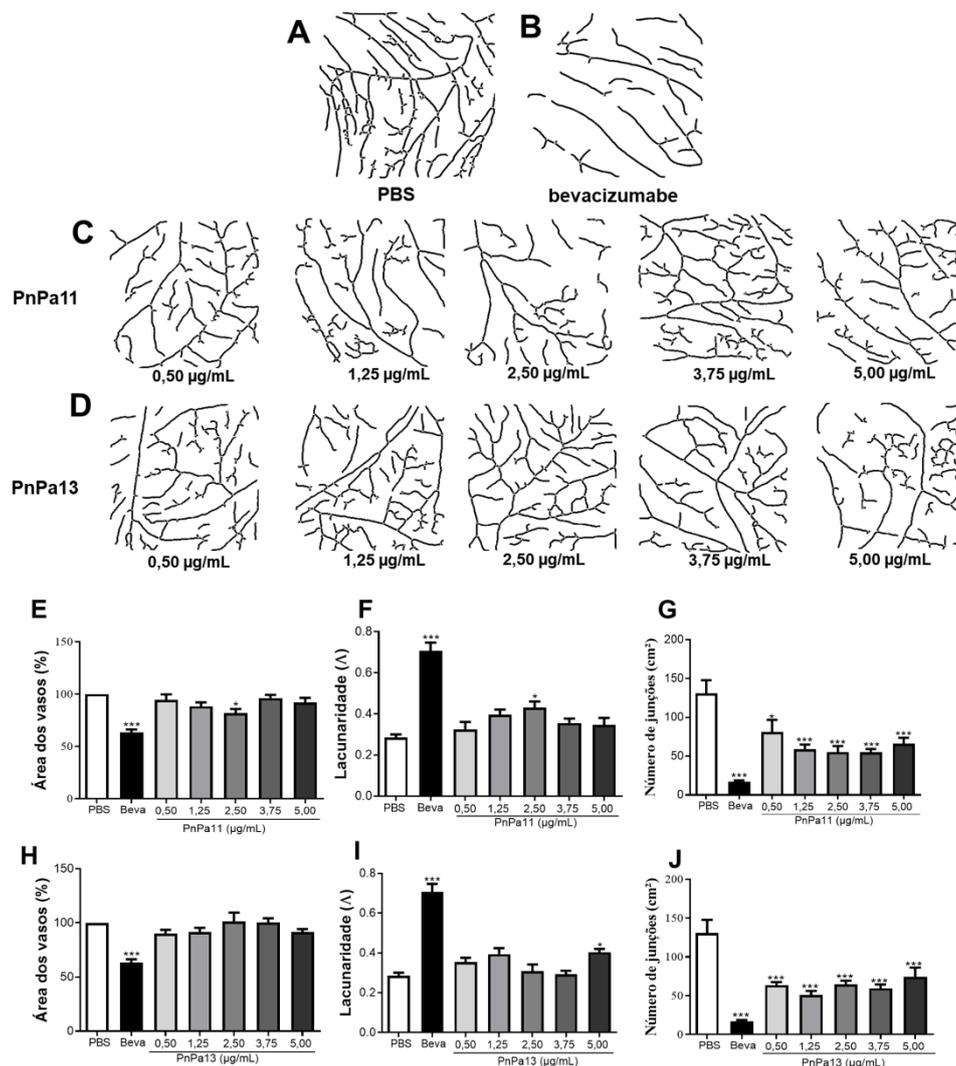
A resposta vascular, obtida no sétimo dia desenvolvimento embrionário, revelou que o grupo tratado com bevacizumabe (**Figura 16B**) promoveu uma redução de $36,61 \pm 7,03$ % na área dos vasos, um aumento da lacunaridade ($0,71 \pm 0,01$ Λ) e uma redução no número de junções ($16,70 \pm 4,84$ cm²) em comparação ao grupo controle (lacunaridade = $0,28 \pm 0,03$ Λ ; número de junções $130,77 \pm 36,59$ cm²) (**Figura 16A**).

De maneira geral, o tratamento com PnPa11 ou PnPa13 não promoveu alterações significativas na área do vaso ou na lacunaridade (**Figuras 16C e 16D**). Para o peptídeo PnPa11 na dose 2,50 µg/mL, foi possível observar uma redução significativa da área vascularizada ($18,33 \pm 8,68\%$) (**Figura 16E**) e um aumento estatístico da lacunaridade (igual a $0,43 \pm 0,05 \Lambda$), conforme apresentado na **Figura 16F**. Para o peptídeo PnPa13, o aumento da lacunaridade (**Figura 16I**) foi significativo para o grupo tratado com 5,0 µg/mL (igual a $0,40 \pm 0,08$) em relação ao grupo controle. Em todas as doses testadas dos peptídeos, observou-se uma redução expressiva do número de junções (**Figuras 16G e 16J**). No entanto, essa redução não causou uma diminuição significativa na área do vaso, quando comparado ao grupo tratado com PBS (**Figuras 16E e 16H**).

Alguns estudos estabeleceram mecanismos que conectam processos de neurodegeneração retinal com irregularidades microvasculares presentes em doenças oculares (ALTMANN; SCHMIDT, 2018). Por exemplo, a retinopatia diabética é caracterizada por disfunções microcirculatórias e angiogênese, decorrentes da hiperglicemia crônica. Esse efeito é definido pela alta perda de pericitos acompanhada do desenvolvimento de pequenos vasos (capilares) sem perfusão sanguínea (GUPTA, BHATNAGAR, 2015). Assim, a angiogênese é um alvo potencial para o tratamento de doenças oculares (CABRAL *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nos permitem questionar se a redução do número de junções promovida pelos peptídeos PnPa11 e PnPa13 poderia contribuir para a terapia de degeneração da retina. No entanto, esta redução foi menos intensa do que a redução induzida pelo grupo do bevacizumabe, um anticorpo monoclonal amplamente utilizado para inibir a proliferação de vasos em doenças oculares (GUNTHER; ALTAWHEEL, 2009). Assim, doses mais elevadas dos peptídeos devem ser avaliadas a fim de elucidar essa atividade.

Figura 16 – Estrutura e quantificação da rede vascular da CAM após tratamento com PnPa11 e PnPa13 em diferentes doses (0,50 - 5,00 µg/mL)



Legenda: As fotografias obtidas após o processamento da imagem para quantificação da rede vascular. Estão representadas as topografias de rede dos grupos: A) PBS, B) bevacizumabe, C) Diferentes doses do peptídeo PnPa11 e D) Diferentes doses do peptídeo PnPa13. Os gráficos revelam em E) a área dos vasos (%), F) lacunaridade (Λ) e G) número de junções (cm²) após tratamento com diferentes doses do peptídeo PnPa11, e em H) a área dos vasos (%), I) lacunaridade (Λ) e J) número de junções (cm²) após tratamento com diferentes doses do peptídeo PnPa13. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey (n = 10). Os dados são representados pela média \pm DP. A área dos vasos do grupo PBS foi definida como 100%. *Indica diferença estatística em relação ao grupo PBS (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Beva: bevacizumabe

3.3 Avaliação da segurança do uso intravítreo de PnPa11 e PnPa13

A fim de investigar a segurança do uso intravítreo de PnPa11 ou PnPa13, os animais receberam uma dose intravítrea de peptídeo, e após 7 dias, foram avaliados por ERG e análise histológica. Considerando a ausência de toxicidade em células ARPE-19, cinco doses dentre as utilizadas nos testes anteriores (0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00 µg/mL) foram escolhidas para avaliar a toxicidade *in vivo*.

3.3.1 Estudo funcional da retina por ERG

O estudo da atividade eletrofisiológica de retina por ERG é um registro dos sinais elétricos originados nas células neuronais da retina. Essas respostas são geradas após estímulos luminosos (flashes) que modificam o movimento de íons na retina, principalmente sódio e potássio, que estão presentes no espaço extracelular (FISHMAN, 1985).

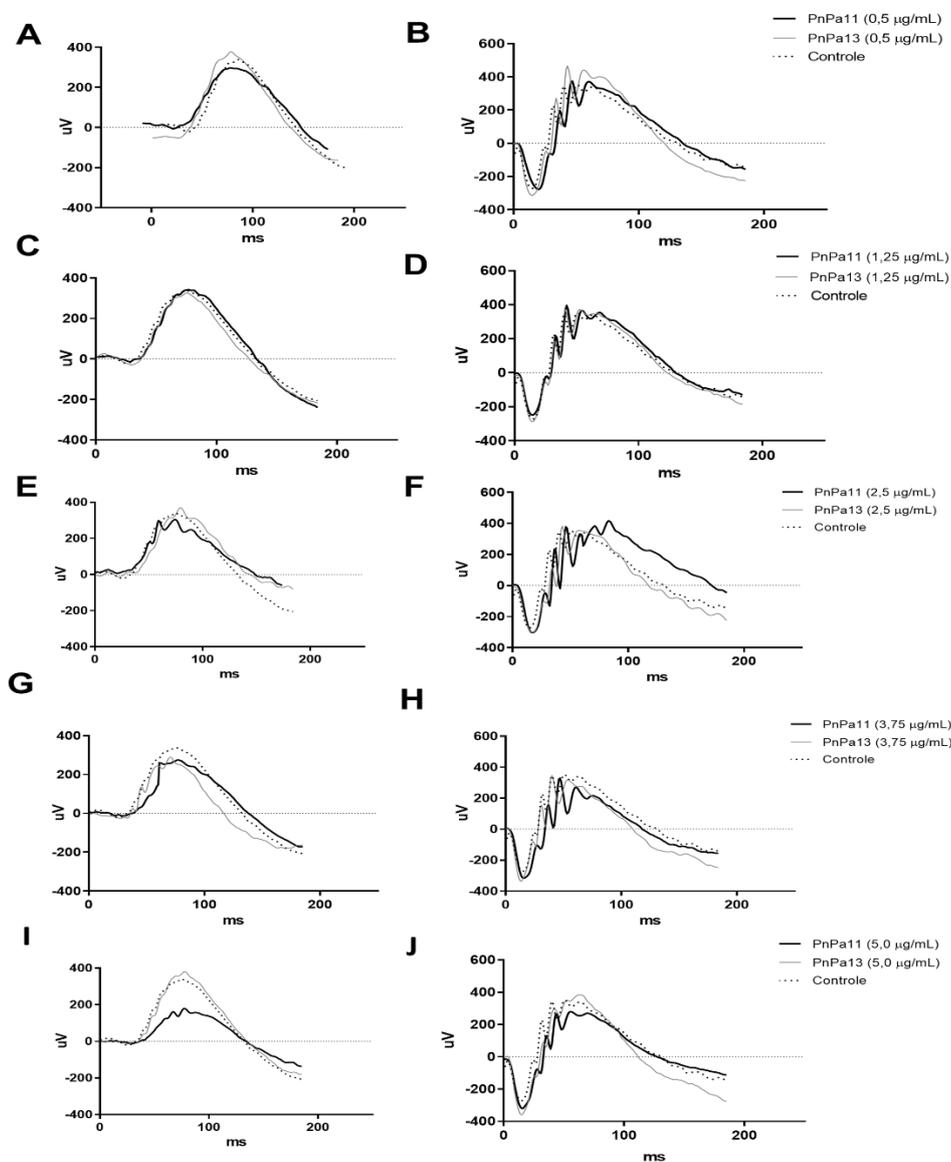
A curva obtida no exame de ERG forma, inicialmente, a onda a uma deflexão negativa, resultante da hiperpolarização dos fotorreceptores (cones e bastonetes). A onda a é composta inicialmente por uma fase rápida, resultante do fechamento de canais de sódio na membrana plasmática de células fotorreceptoras, e por uma segunda fase lenta, estimulada por uma diminuição dos níveis de potássio nos fotorreceptores pela ação das células de Müller (BROWN, 1968).

A segunda onda obtida no ERG é conhecida como b, uma deflexão positiva. A hiperpolarização induzida pela luz leva a um aumento na concentração de potássio extracelular, o que provoca a despolarização das células de Müller e forma a onda b. As células amácrinas também estão envolvidas na criação da onda b, sua resposta é conhecida como potenciais oscilatórios e estão sobrepostos na partes ascendente da onda b (FISHMAN, 1985; STOCKTON, 1989; DRAZEK *et al.*, 2014).

A ISCEV estabelece alguns padrões para avaliação da atividade eletrofisiológica da retina. Dentre os estímulos preconizados, o primeiro envolve um disparo de 0,01 cd.s.m⁻² com intervalo de 2 s entre os flashes, o que seria capaz de avaliar a atividade dos bastonetes. O estímulo de 3,0 cd.s.m⁻², com um intervalo de 10 s entre os flashes, tem como objetivo de analisar a resposta combinada entre cones e bastonetes (MCCULLOCH *et al.*, 2015).

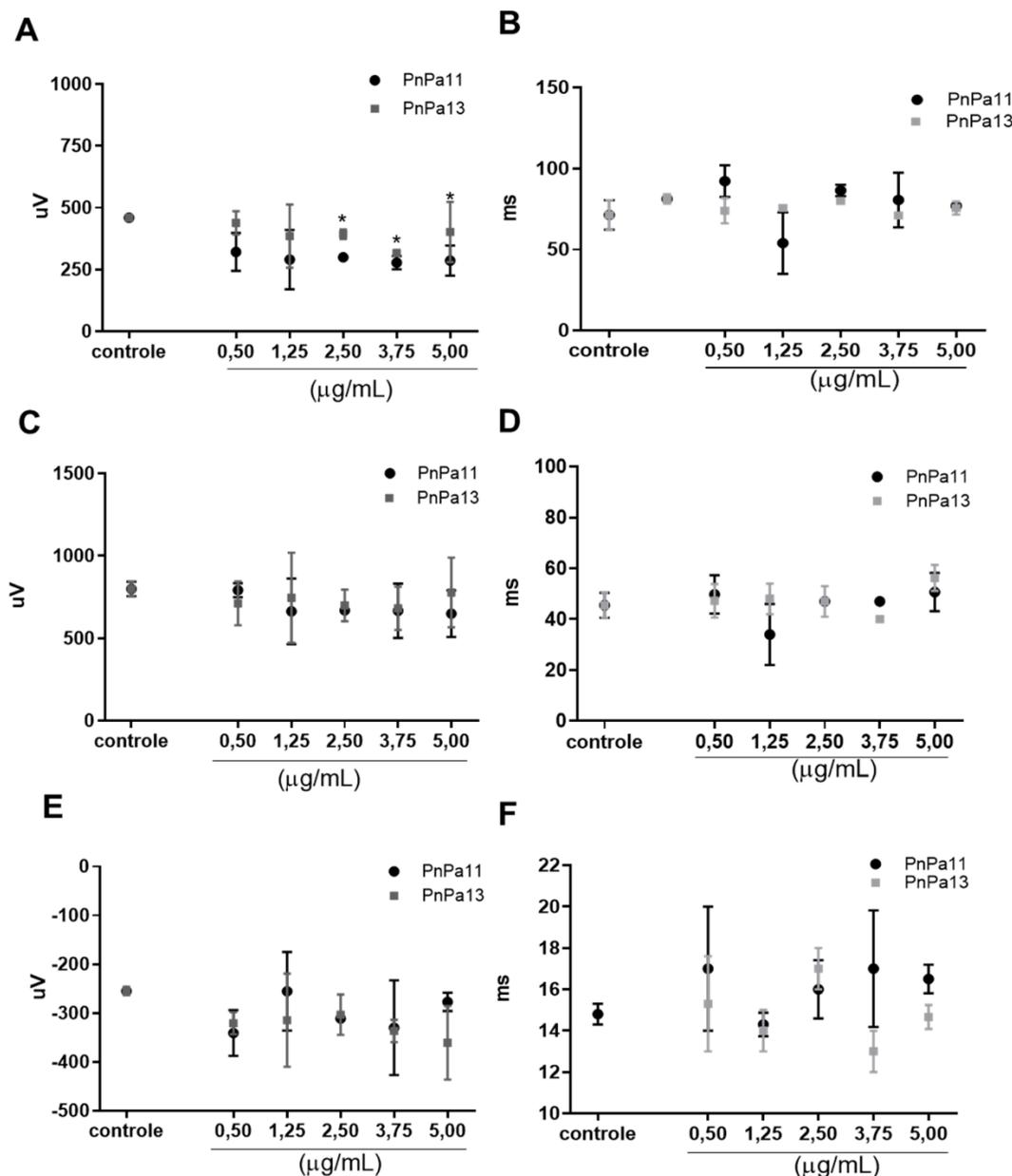
Nossos resultados revelaram diferença nos padrões das curvas do ERG para os olhos tratados com PnPa11, em doses acima de 1,25 µg/mL, após estímulo luminoso de 0,01 cd.s.m⁻² (**Figura 17**). Para PnPa13, não foi observada diferença estatística em nenhuma das doses testadas.

Figura 17 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnP11 ou PnP13, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



Legenda: Respostas após o estímulo luminoso de: A) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e B) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ em olhos que receberam injeção intravítrea do PnP11 ou PnP13 ($0,50 \text{ µg/mL}$); C) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e D) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ em olhos que receberam injeção intravítrea do PnP11 ou PnP13 ($1,25 \text{ µg/mL}$); E) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e F) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ em olhos que receberam injeção intravítrea do PnP11 ou PnP13 ($2,50 \text{ µg/mL}$); G) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e H) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ em olhos que receberam injeção intravítrea do PnP11 ou PnP13 ($3,75 \text{ µg/mL}$); I) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e J) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ em olhos que receberam injeção intravítrea do PnP11 ou PnP13 ($5,00 \text{ µg/mL}$). O padrão das curvas ERG foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, sucedido por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($n = 4$) A resultados foram comparados ao grupo tratado com solução salina (controle).

Figura 18 – Média \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnP11 ou PnP13, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



Legenda: A) amplitude da onda b com intensidade luminosa de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, B) tempo implícito da onda b na intensidade luminosa de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, C) amplitude da onda b com intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, D) tempo implícito da onda b na intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, E) amplitude da onda a com intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, F) tempo implícito da onda a na intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni ($n = 4$). Os dados são representados pela média \pm DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$).

A fim de elucidar as alterações observadas, analisou-se as amplitudes e o tempo implícito das ondas a e b em condição escotópica. Os dados obtidos confirmam as alterações observadas nas curvas do ERG. Foi detectada uma diferença estatística na amplitude da onda b, após estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, em olhos tratados com PnPa11 em doses acima de $1,25 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 18**).

A onda b é originada pelo do estímulo emitido nas sinapses elétricas entre os fotorreceptores e as células bipolares. Assim, essas alterações podem estar relacionadas a um comprometimento interno da retina, especialmente, na camada de células bipolares ou em suas conexões com os bastonetes (DE ALMEIDA *et al.*, 2015). Nesse sentido, nossos resultados indicaram que o PnPa11 é seguro para administrações intravítreas em doses de até $1,25 \mu\text{g/mL}$ e o PnPa13 em doses de até $5,0 \mu\text{g/mL}$.

3.3.2 Avaliação da PIO e do fundo de olho

A PIO trata-se de um parâmetro farmacodinâmico muito importante para acompanhar a progressão de doenças capazes de gerar eventos vasculares ao nervo óptico. A hipertensão intraocular é ocasionada por diminuição do escoamento do humor aquoso e, eventualmente, pode ocorrer devido à obstrução trabecular por células inflamatórias decorrentes de algum processo traumático sofrido pelo olho (ANTUNES *et al.*, 2008; WETZEL, 1994).

A avaliação da PIO pode auxiliar na observação de possíveis efeitos inflamatórios decorrentes do procedimento e/ou o peptídeo (DODDS *et al.*, 2008). Aliado a isso, a observação do fundo de olho possibilita a detecção de eventuais danos as estruturas internas do olho, tais como hemorragias, opacidade e descolamento de retina.

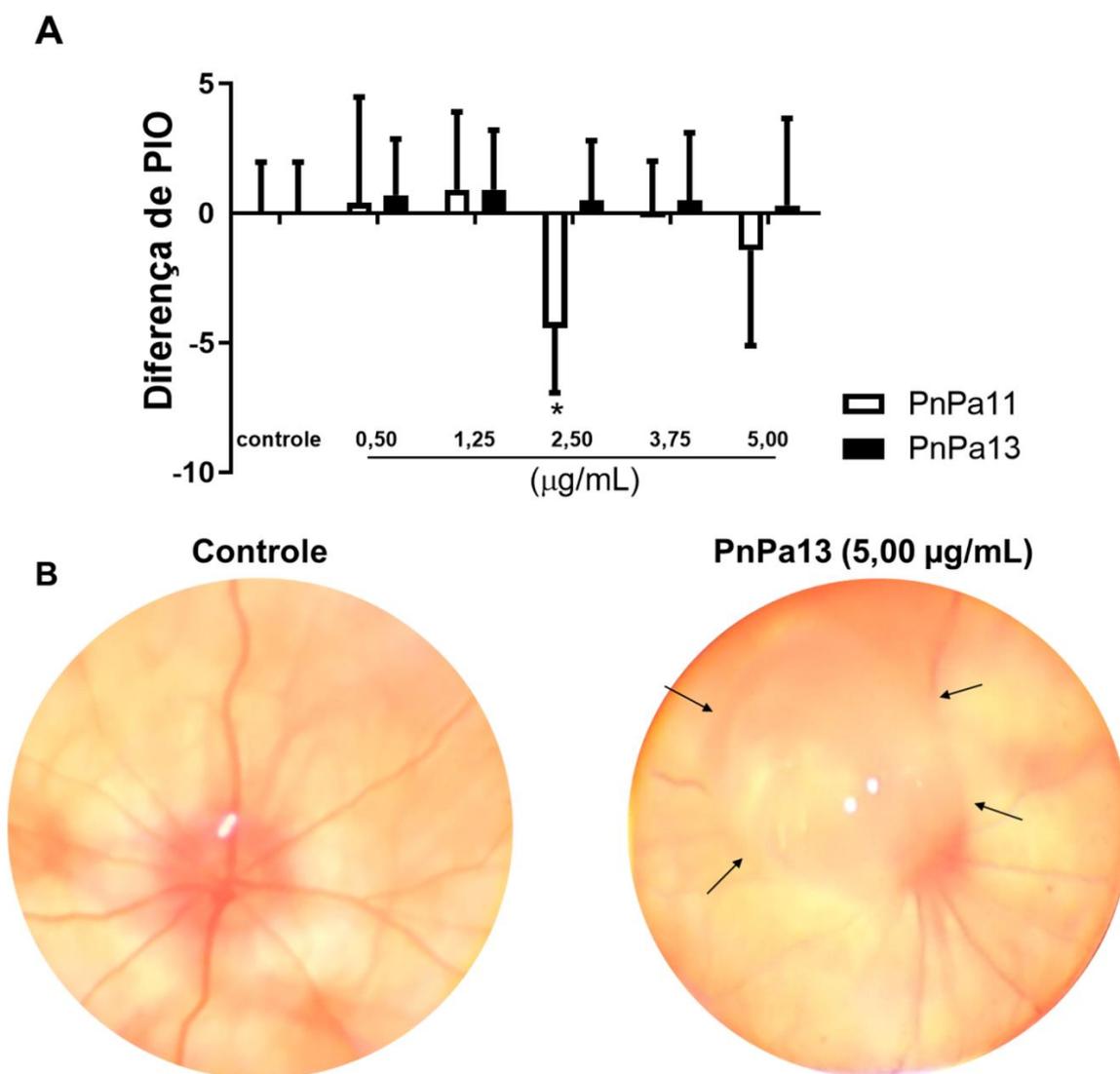
Os resultados obtidos mostraram que o uso intravítreo do PnPa11 ou PnPa13 não foi responsável por induzir alterações na PIO, exceto o grupo que recebeu PnPa11 na dose de $2,50 \mu\text{g/mL}$. Neste grupo, a PIO média foi de $18,65 \pm 2,50$, revelando uma redução estatística da PIO, após 7 dias (**Figura 19A**). Esse resultado corrobora com a análise do ERG, uma vez que ambos mostram uma discreta alteração em olhos que receberam doses mais altas do peptídeo PnPa11. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar esse efeito.

Outra observação importante desta etapa do trabalho indicou que a avaliação do fundo de olho não identificou alterações que possam ser atribuídas a toxicidade dos peptídeos. Na **Figura 19B**, uma imagem representativa do fundo de olho de animais do grupo

controle foi utilizada para comparar ao grupo PnP13, em que se destaca o peptídeo no fundo do olho, após 7 dias, sem induzir dano aparente.

Com base nisto, pode-se afirmar que o procedimento (injeção) e o uso intravítreo de PnP11 e PnP13, nas doses testadas, não foram capazes de alterar a dinâmica de perfusão do olho.

Figura 19 – Avaliação da PIO e fundo de olho de olhos que receberam injeção intravítrea com diferentes doses de PnP11 ou PnP13

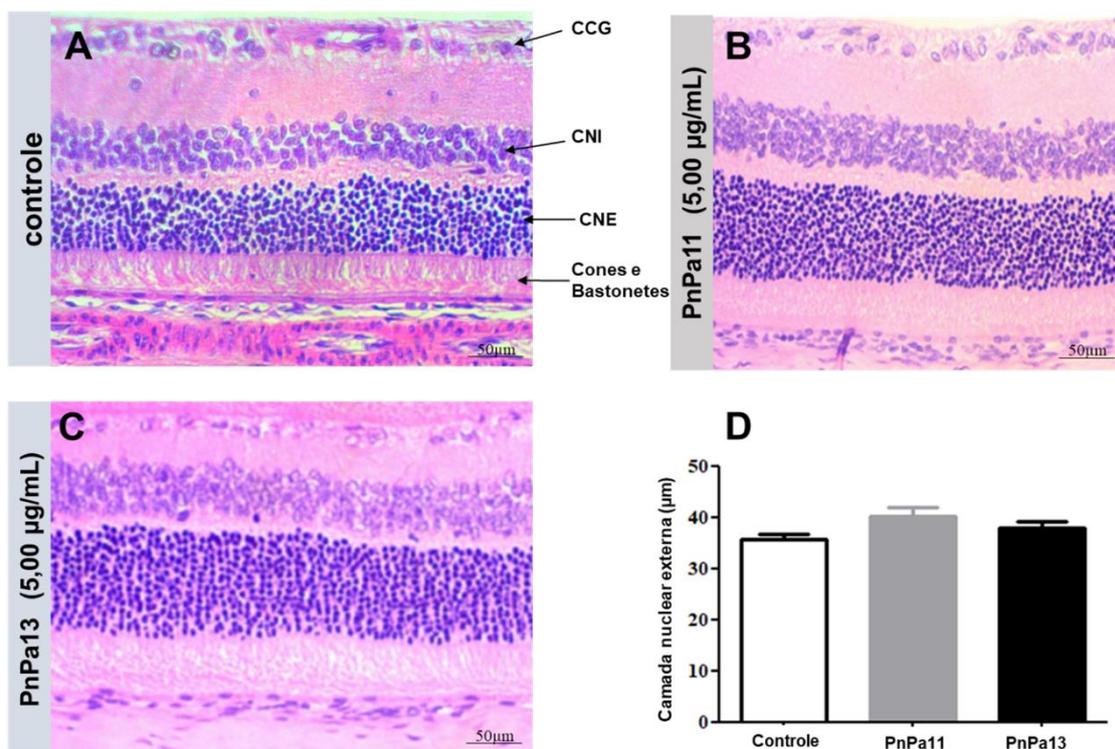


Legenda: A) variação da PIO (média \pm DP) foi calculada pela diferença dos olhos investigados e do grupo controle em cada medida. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni ($n = 4$). *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($*p < 0,05$). B) Imagens representativas fundo do olho de animais dos grupos controle e PnP13. As setas pretas indicam o PnP13 injetado no fundo do olho.

3.3.3 Análise histológica

A última etapa do estudo de toxicidade do uso intravítreo dos peptídeos envolveu a avaliação histológica das camadas da retina (**Figura 20A – 20C**). Desta forma, investigou-se a presença de células inflamatórias, descolamento ou alterações nas camadas da retina, por meio de lâminas histológicas (n = 3).

Figura 20 – Análise histológica das camadas da retina de olhos que receberam injeção intravítrea de PnPa11 ou PnPa13 na dose de 5,00 µg/mL



Legenda: Imagens ilustrativas de camadas histológicas da retina para o grupo: A) controle (salina), B) PnPa11 (5,00 µg/mL), C) PnPa13 (5,00 µg/mL) e D) espessura da CNE. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (três medidas por lâmina, n = 3). Os dados são representados pela média ± DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (p < 0,05). CCG: camada de células ganglionares, CNI: camada nuclear interna, CNE: camada nuclear externa. As imagens foram obtidas com objetiva de 20 x.

Não foi observada a presença de células inflamatórias ou alterações na estrutura da retina. Entretanto, foi identificado um aumento na espessura da CNE em lâminas histológicas referentes aos que receberam as doses mais altas do peptídeo (5,00 µg/mL), o que sugere a ocorrência de um edema nessa camada. Assim, a espessura da CNE foi avaliada a 250 µm de distância do nervo óptico (três medidas

foram feitas para cada lâmina histológica, n = 3) porém, não foi observada variação significativa em relação ao grupo controle (**Figura 20D**).

Os achados histológicos discordam dos resultados apresentados anteriormente, que apontam uma alteração discreta na atividade eletrofisiológica dos animais que receberam PnPa11 em doses acima de 1,25 µg/mL. Este não é o primeiro estudo a detectar a falta de correspondência entre os achados eletrofisiológicos e histológicos. Sabe-se que mudanças eletrofisiológicas antecedem alterações estruturais, o que pode explicar a ausência de dano aparente as camadas da retina (GASPARIN *et al.*, 2014; INAN *et al.*, 2007). Em vista disso, para os testes que se seguem, optou-se pela dose de 1,25 µg/mL para ambos os peptídeos.

3.4 Avaliação da atividade neuroprotetora dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 em modelo de degeneração retiniana induzida por LED azul

A iluminação artificial é um elemento comum da atualidade. Entre a ampla variedade de opções, os LEDs emitem níveis elevados de intensidade luminosa quando comparados às fontes convencionais e são largamente empregados em produtos eletrônicos como telas de celulares e computadores (BEHAR-COHEN *et al.*, 2011).

A retina contém cromóforos específicos nos fotorreceptores que são capazes de absorver a radiação da luz visível (400 - 1400 nm). Um dos principais locais responsáveis por essa absorção de energia luminosa são os grânulos de pigmento de melanina das células do EPR, que podem vir a ser lesadas pela exposição à luz (KUSE *et al.*, 2014; PARVER; AUKER; FINE, 1983).

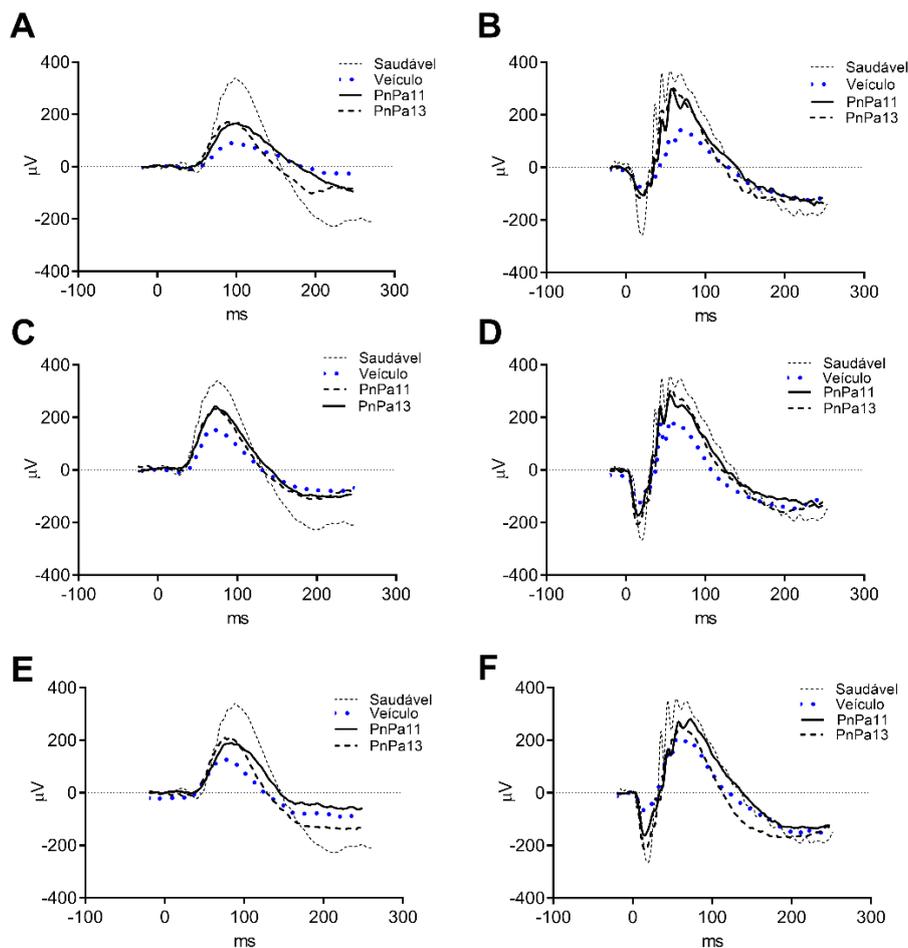
A literatura descreve (HAFEZI *et al.*, 1997; SHANG *et al.*, 2017) alguns trabalhos que comprovaram que a exposição à luz azul (450 - 495 nm) induziu danos graves aos fotorreceptores e células do EPR em olhos de ratos. Ademais, a exposição excessiva ao LED azul foi correlacionada ao estresse oxidativo, uma vez que é capaz de promover a formação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, desencadear reações inflamatórias e lesões (HOLLYFIELD *et al.*, 2008; SHANG *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos sugeriram que a exposição à luz com comprimento de onda curto, é um fator de predisposição para a DMRI (SEREGARD; ALGVERE, 2006). Com base nisso, a fim de investigar o potencial neuroprotetor dos peptídeos e uma possível aplicação na progressão da DMRI, foi realizado um pré-tratamento intravítreo com salina (grupo denominado veículo), PnPa11 (1,25 µg/mL) ou PnPa13 (1,25 µg/mL) e, após 24 hs, os animais foram submetidos ao modelo de degeneração da retina induzida pela exposição a luz do LED azul.

3.4.1 Estudo eletrofisiológico da retina

Os registros do ERG foram obtidos após 1, 7 e 15 dias da exposição à luz do LED azul e os resultados foram comparados a um quarto grupo de animais que não foi submetido ao modelo de degeneração da retina, denominado saudável (**Figura 21**).

Figura 21 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



Legenda: Resposta aos estímulos luminosos de A) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e B) $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$ após 1 dia, C) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e D) $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$ após 7 dias, E) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e F) $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$ após 15 dias da exposição à luz do LED azul. As curvas ERG de olhos tratados com solução salina, PnPa11 ($1,25 \mu\text{g/mL}$) e PnPa13 ($1,25 \mu\text{g/mL}$) foram comparadas com o grupo saudável. O padrão das curvas do ERG foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, sucedido por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($n = 8$). Os resultados foram comparados ao grupo saudável.

Os resultados obtidos revelaram que, após 24 hs, a luz do LED azul alterou o padrão das ondas a e b em todos os grupos expostos ao modelo de degeneração da retina. Entretanto, essa mudança foi mais intensa no grupo pré-tratado apenas com o veículo, sugerindo que os peptídeos protegeram a retina contra o dano promovido pela luz.

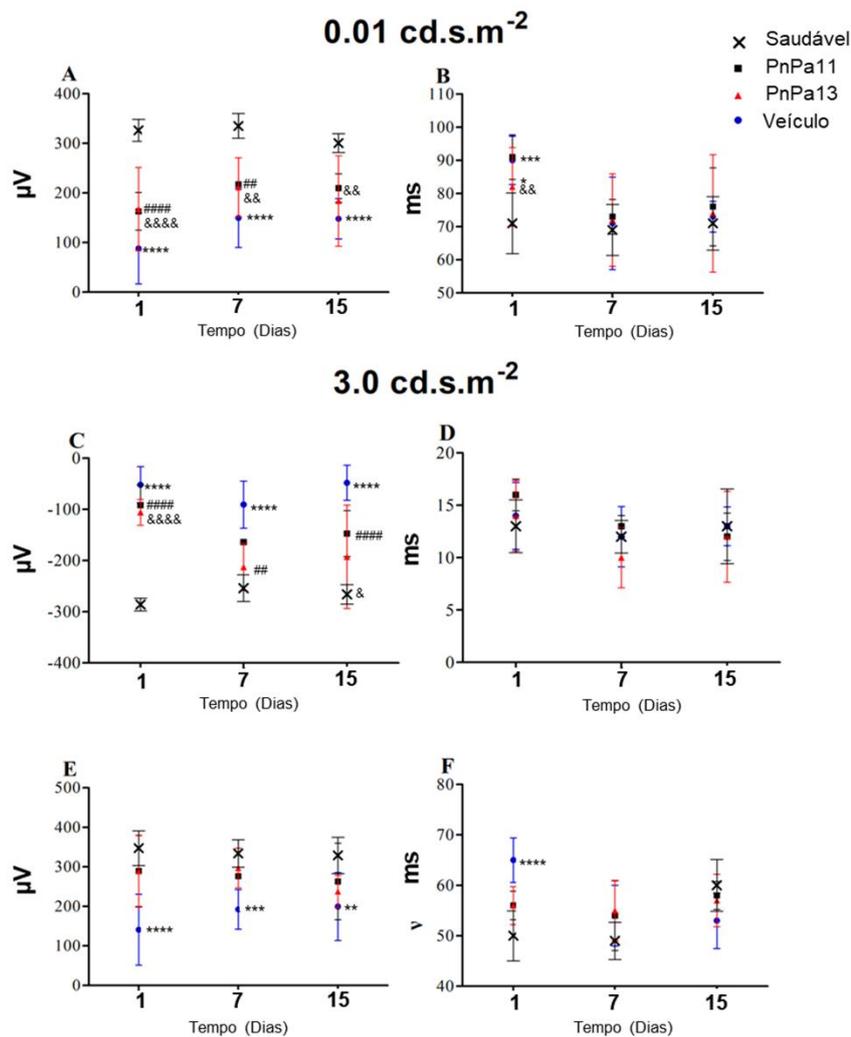
No 7° e 15° dia após a exposição à luz do LED azul, as curvas a e b do grupo veículo apresentaram uma pequena recuperação (**Figuras 21C – 21F**), também observada nos grupos pré-tratados com os peptídeos. Porém, as curvas referentes aos grupos PnPa11 e PnPa13 foram semelhantes às do grupo saudável, o que indica que houve a preservação de parte das atividades eletrofisiológicas dos fotorreceptores nesses grupos (OSADA *et al.*, 2017).

A respeito das amplitudes e tempos implícitos (**Figura 22**), observou-se que no grupo veículo as amplitudes da onda b, após estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, foram, estatisticamente, inferiores ao grupo controle ($****p < 0,0001$) durante todo o estudo. Para o estímulo de $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$, o resultado foi similar. A amplitude da onda a foi estatisticamente menor do que o grupo controle durante os 15 dias ($****p < 0,0001$), assim como a amplitude da onda b que, embora tenha apresentado uma ligeira recuperação ($****p < 0,0001$ após 1 dia; $***p < 0,001$ após 7 dias; $**p < 0,01$ após 15 dias), ao final dos 15 dias a redução permaneceu significativa. Além disso, neste grupo foi observado um aumento do tempo implícito da onda b ($****p < 0,0001$) após o primeiro dia em ambos os estímulos luminosos.

Para os grupos que receberam um pré-tratamento com peptídeo, já no primeiro dia observou-se que ambos foram capazes de amenizar a redução da amplitude da onda b no estímulo luminoso de $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$. Além disso, nenhuma diferença estatística em relação ao grupo saudável foi observada.

Nos resultados do ERG de 7 e 15 dias, observou-se uma melhora nos valores referentes à amplitude da onda b no estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e na onda a no estímulo luminoso de $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$, fato que não foi observado para o grupo que recebeu injeção intravítrea contendo apenas o veículo. Ademais, PnPa11 e PnPa13 foram capazes de inibir mudanças no tempo implícito da onda b após estímulo luminoso de $3,00 \text{ cd.s.m}^{-2}$

Figura 22 – Média \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



Legenda: A) amplitude da onda b com intensidade luminosa de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, B) tempo implícito da onda b na intensidade luminosa de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$, C) amplitude da onda a com intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, D) tempo implícito da onda a com intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, E) amplitude da onda b com intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, F) tempo implícito da onda b na intensidade luminosa de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni ($n = 8$). Os dados são representados pela média \pm DP. *Indica diferença estatística entre os grupos veículo e saudável (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). #Indica diferença estatística entre os grupos PnPa11 e saudável (## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$). &Indica diferenças significativas entre os grupos PnPa13 e saudável (& $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,0001$).

Os resultados mostraram que a exposição à luz do LED azul provocou, principalmente, uma redução da amplitude da onda b, resposta referente a células de Müller e células bipolares. Essa redução comprova o dano causado pela luz do LED azul, uma vez que esta amplitude é um marcador quantitativo muito utilizado para avaliar lesões na retina (OSBORNE, *et al.*, 2004). Além disso, a redução na amplitude da onda a e o aumento significativo no tempo implícito da onda b (respostas referentes aos fotorreceptores) refletem uma extensão dos danos causados à retina e resultam em uma resposta visual diminuída aos estímulos luminosos dos ERG (SHANG *et al.*, 2014).

O pré-tratamento intravítreo com o PnPa11 e PnPa13 foi capaz de atenuar esses danos preservando os fotorreceptores e, principalmente, a resposta das células de Müller e células bipolares, ambas localizadas na CNI. Esse resultado nos permite inferir que ambos os peptídeos exerceram um efeito benéfico contra a degeneração da retina promovida pela luz do LED azul, o que abre espaço para aplicação destes peptídeos em doenças degenerativas que acometem a retina.

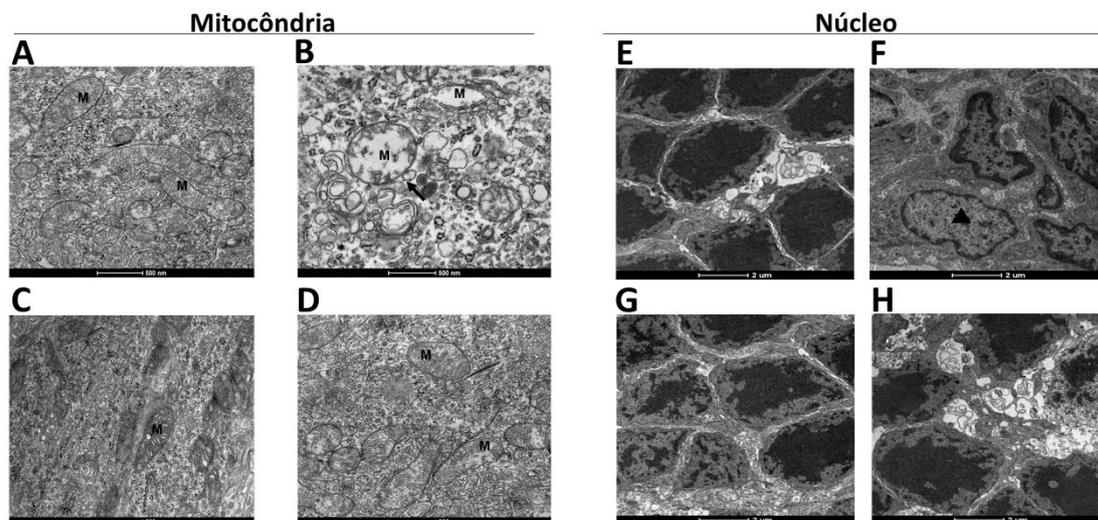
3.4.2 Estudo morfológico das camadas da retina

O dano causado pela fototoxicidade da luz azul na retina é um evento plural mediado por diferentes mecanismos na retina. Estudos prévios indicam que os danos fotoquímicos atingem, inicialmente, o segmento externo (fotossensível) dos fotorreceptores, tornando-os tortuosos e inchados; na sequência, as estruturas lamelares se rompem, formando túbulos e vesículas. A picnose e o inchaço das mitocôndrias ocorrem posteriormente, no segmento interno, com a progressão do processo degenerativo. Os fotorreceptores danificados desaparecem, culminando na adesão completa das células do EPR as células de Müller (JAADANE *et al.*, 2015; KRIGEL *et al.*, 2016; WU; SEREGARD; ALGVERE, 2006).

A fim de investigar o papel neuroprotetor dos peptídeos, as análises que se seguem foram realizadas com o intuito de destacar as principais diferenças entre os grupos expostos à luz do LED azul que receberam ou não um pré-tratamento com peptídeo PnPa11 ou PnPa13.

Tendo como base estudos anteriores que indicam possíveis lesões promovidas pela luz do LED azul a camada de fotorreceptores, a ultraestrutura dessa camada foi analisada pela técnica de MET, 15 dias após a exposição ao estresse luminoso. As imagens referentes ao grupo saudável mostraram a estrutura de mitocôndrias com aspecto saudável (**Figura 23A**) e núcleos de fotorreceptores com morfologia regular sem alteração na cromatina (**Figura 23E**).

Figura 23 – Análise da ultraestrutura de células da retina em olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul



Legenda: A) aparência normal da mitocôndria (M) no grupo saudável em comparação com B) a mitocôndria no grupo veículo, após a exposição à luz LED azul, que revelou cristas fraturadas e desaparecidas (M) e degeneração vacuolar (seta preta). Nos grupos pré-tratados com o C) PnPa11 (1,25 µg/mL) ou D) PnPa13 (1,25 µg/mL) as mitocôndrias (M) apresentaram uma micrografia mais preservada. Em E) observou-se os núcleos fotorreceptores na CNE do grupo saudável, enquanto em F) foi observado uma picnose do núcleo (▲) após a exposição à luz do LED azul. Os núcleos dos fotorreceptores na CNE mostram aparência nuclear relativamente normal nos olhos pré-tratado com G) PnPa11 (1,25 µg/mL) ou H) PnPa13 (1,25 µg/mL) antes da exposição à luz do LED azul. CNE: camada nuclear externa.

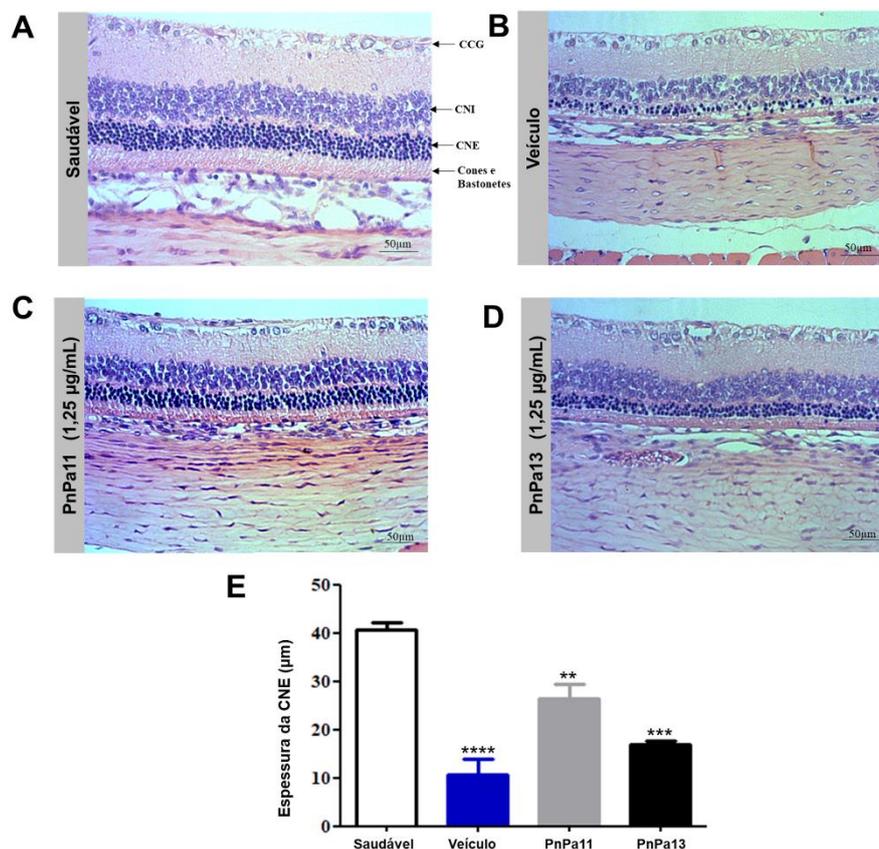
Em olhos pré-tratados com veículo, a mitocôndria apresentou aspecto deteriorado, houve degeneração vacuolar (seta preta) e as cristas estavam fraturadas e algumas vezes ausentes (**Figura 23B**). Além disso, os núcleos dos fotorreceptores foram condensados e a cromatina aderida a periferia das células, caracterizando uma picnose (▲, **Figura 23B**). Esses resultados reforçam o indicativo dos resultados obtidos no ERG, que demonstram uma lesão a camada de fotorreceptores causada pela luz LED azul (HAFEZI *et al.*, 1997).

Em contraste, nas micrografias dos olhos que receberam um pré-tratamento com PnPa11 ou PnPa13, as mitocôndrias estavam mais preservadas (**Figuras 23C e 23D**) e os núcleos de fotorreceptores foram parcialmente protegidos (**Figuras 23G e 23H**). Essas observações sugerem que os peptídeos foram eficientes em reduzir a morte de células fotorreceptoras induzidas por estresse luminoso, preservando essas células da

lesão mitocondrial, o que reforça o efeito neuroprotetor destes peptídeos, conforme indicado nos resultados do ERG (OTT *et al.*, 2007; SIVAPATHASUNTHARAM *et al.*, 2019).

A avaliação da espessura das camadas da retina, principalmente da CNE, são frequentemente usadas para quantificar os danos causados pela exposição aguda à luz (NI *et al.*, 2008; ORGANISCIAK; VAUGHAN, 2010). Em nosso estudo, a análise histológica referente aos grupos expostos a luz do LED azul apresentou alterações importantes na camada de fotorreceptores que se estenderam para as camadas mais internas da retina (**Figura 24**).

Figura 24 – Análise histológica da retina em olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul

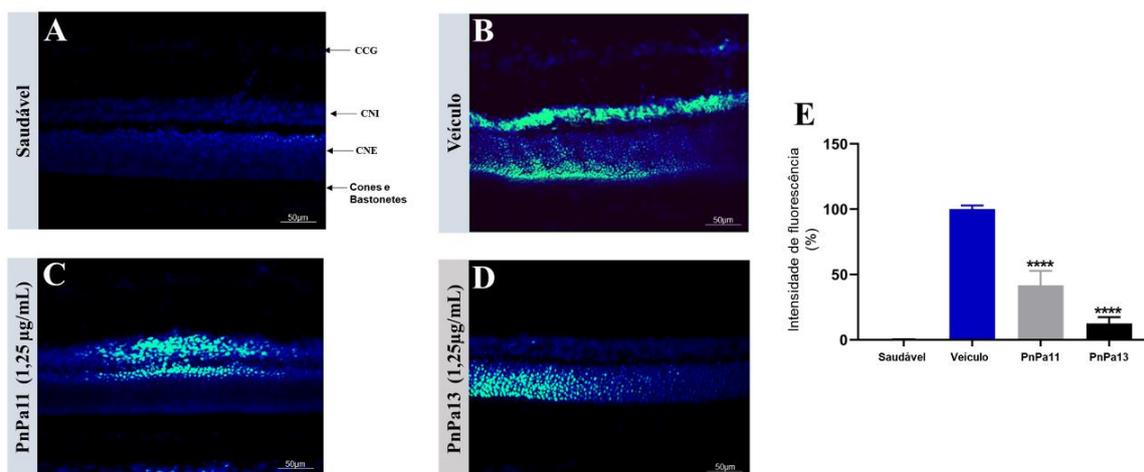


Legenda: Imagens representativas: A) grupo saudável, B) veículo, C) PnPa11 e D) PnPa13. E) A espessura CNE do grupo saudável foi comparada aos demais grupos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Foram realizadas três medidas por lâmina (n = 3). *Indica diferença significativa em relação ao grupo saudável (**p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001). CCG: camada de células ganglionares; CNI: camada nuclear interna; CNE: camada nuclear externa. As imagens digitais foram obtidas com objetiva de 20 x.

Uma redução significativa na espessura do CNE foi observada em todos os grupos expostos ao LED azul (veículo: $7,50 \pm 3,76 \mu\text{m}$; PnPa11: $26,37 \pm 9,50 \mu\text{m}$; PnPa13: $17,01 \pm 2,26 \mu\text{m}$) quando comparados ao grupo saudável ($40,74 \pm 5,14 \mu\text{m}$). Todavia, a redução foi menos intensa nos grupos tratados com os peptídeos. PnPa11 e PnPa13 foram capazes de prevenir aproximadamente 65% e 42%, respectivamente, da redução da espessura CNE.

Somado ao resultado apresentado no parágrafo anterior, o ensaio TUNEL revelou uma coloração positiva nos grupos que foram expostos a luz do LED azul. Entretanto, nos olhos que receberam tratamento prévio com PnPa11 ou PnPa13, foi observada a redução da fluorescência de $58,24 \pm 7,27\%$ e $87,54 \pm 2,21\%$, respectivamente em relação ao grupo veículo (**Figura 25**). Além disso, no grupo PnPa11, as células TUNEL-positivas estavam presentes na CNI e CNE, enquanto no grupo PnPa13, as células TUNEL-positivas estavam restritas a CNE.

Figura 25 – Avaliação da morte celular na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração induzida pela luz do LED azul por ensaio TUNEL



Legenda: Micrografias confocais foram obtidas a partir de secções de A) retina saudável e retinas expostas à luz do LED azul e pré-tratadas com: B) veículo, C) PnPa11 (1,25 µg/mL), e D) PnPa13 (1,25 µg/mL). E) Intensidade de fluorescência do grupo veículo foi comparada a dos grupos PnPa11 e PnPa13. As retinas foram contrastadas com DAPI (em azul) e as células TUNEL-positivas representadas como pontos verdes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Foram realizadas três medidas por lâmina (n = 3). O grupo veículo foi definido como 100% e os dados foram representados pela média \pm DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo saudável (****p < 0,0001).

Estudos anteriores afirmam que o ensaio TUNEL é sempre uma avaliação subjetiva, uma vez que as células apoptóticas são removidas rapidamente do tecido (WU *et al.*, 1999). Em contraponto a isso, com base na literatura, sabe-se que a maior parte da morte celular não ocorre imediatamente após à exposição a luz. O dano fotoinduzido é capaz de formar espécies reativas de oxigênio, moléculas nocivas a várias organelas celulares, que podem desencadear eventos moleculares secundários que culminam na morte celular apoptótica (SPARROW *et al.*, 2002; WU; SEREGARD; ALGVERE, 2006).

O estresse oxidativo está envolvido na patogênese da lesão fotoinduzida leve, que ocorre nos casos em que o estresse luminoso foi suficiente para danificar > 80% das células fotorreceptoras. Esse efeito pode ser visualizado por uma redução da onda b no ERG, sem posterior recuperação (SHANG *et al.*, 2014).

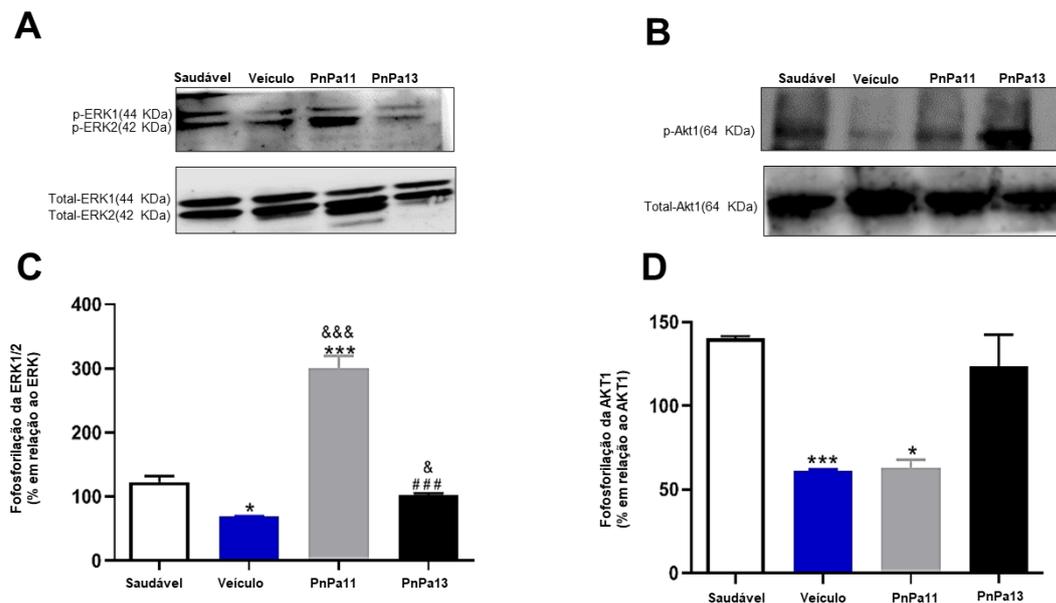
Tendo como base os dados do ERG apresentados em nosso estudo, o grupo veículo apresentou uma redução estatística da amplitude da onda b, sem recuperação após 15 dias da lesão. Em contrapartida, nos grupos que receberam um pré-tratamento com peptídeo, observou-se uma recuperação após 7 e 15 dias. Assim, pode-se inferir que a fluorescência observada para o grupo veículo refere-se principalmente à apoptose gerada pelo estresse oxidativo induzido pela luz do LED azul. Esse resultado reforça o indicativo da ação neuroprotetora dos peptídeos PnPa11 e PnPa13, e levanta a hipótese de que esses peptídeos atuariam nas vias de oxidação da degeneração da retina, prevenindo a apoptose na retina.

3.4.3 Análises de western blot

O estresse oxidativo é o fator de risco crucial para a degeneração dos fotorreceptores (SPARROW *et al.*, 2002). Desta forma, as análises de western blot foram empregadas na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção exercida pelos peptídeos PnPa11 e PnPa13, em modelo de degeneração da retina induzido pela luz do LED azul.

Inicialmente, foi investigado o papel de PnPa11 e PnPa13 na ativação de Erk1/2 e Akt1. No grupo veículo, a exposição a luz do LED azul causou uma diminuição de $54,42 \pm 1,35\%$ em p-Erk1/2 e de $78,76 \pm 0,73\%$ nos níveis de p-Akt1, em comparação ao grupo saudável. PnPa11 promoveu um aumento de $231,68 \pm 19,62\%$ na fosforilação Erk1/2 em comparação ao grupo veículo, mas não foi capaz de prevenir a desfosforilação Akt1 (redução de $77,17 \pm 4,90\%$ em comparação com saudável). Por outro lado, PnPa13 promoveu um aumento de p-Erk1/2 (um aumento de $33,66 \pm 3,25\%$) e p-Akt1 (aumento de $62,04 \pm 19,14\%$) em relação ao grupo veículo (**Figura 26**).

Figura 26 – Avaliação da expressão Erk1/2 e Akt1 na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul



Legenda: São apresentados imunoblots representativos para: A) fosfo- (painel superior) e total-Erk1/2 (painel inferior), B) fosfo- (painel superior) e total-Akt1 (painel inferior), e expressão de Akt1 total (painel inferior) na retina de ratos saudáveis e ratos expostos ao LED azul pré-tratado com veículo, PnPa11 (1,25 µg/mL) ou PnPa13 (1,25 µg/mL). Cerca de 100 mg de lisado celular foram utilizados para cada amostra. Os gráficos mostram a análise densitométrica de C) p-Erk1/2 ou D) p-Akt1 normalizado para expressão de total-Erk1/2 ou total-AKT, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os dados representam as médias \pm DP de quatro experimentos independentes (saudável e PnPa11) ou três experimentos independentes (veículo e PnPa13), expressos como porcentagem de fosforilação Erk1/2 ou Akt1 basal. *Indica diferença estatística em relação ao grupo saudável (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). &Indica diferença estatística em relação ao grupo veículo (& $p < 0,05$; & $p < 0,05$). #Indica diferença estatística entre os grupos PnPa11 e PnPa13 (# $p < 0,001$).

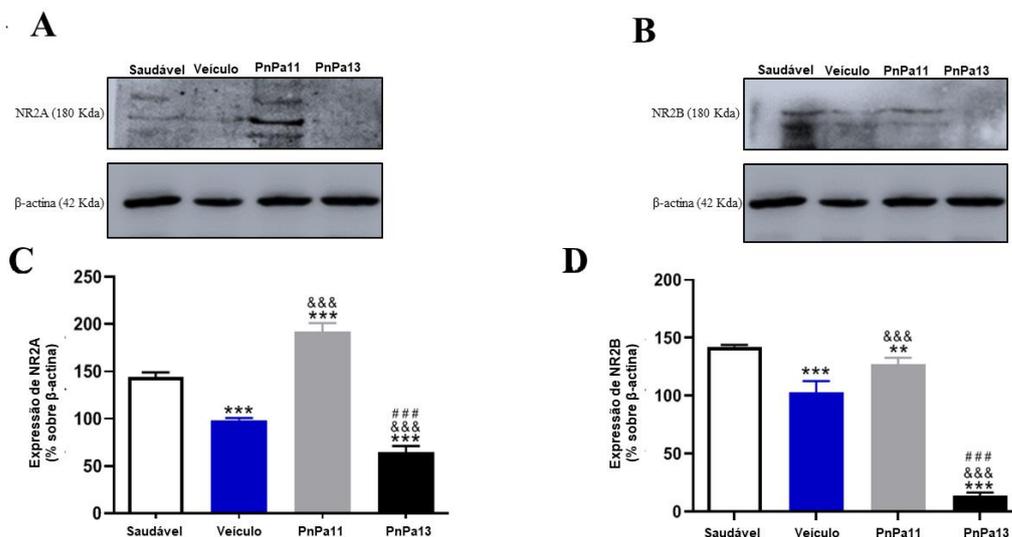
As quinases são proteínas que desempenham papéis importantes nas cascatas de sinalização e são responsáveis por regular diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose. A ERK1/2 (do inglês *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*) são quinases que apresentam uma atividade preferencial a fatores de proliferação e crescimento. A AKT é proteína quinase do tipo B (do inglês *Protein Kinase B*) responsável por regular a síntese de proteínas e diversos marcadores

das vias regulatórias de funcionamento celular relacionados a metabolismo, proliferação, angiogênese e crescimento (CREMER, 2005; LIU; YU; SHAIKH, 2008).

A ativação de ERK1/2 e/ou AKT pode evitar que as células sofram apoptose induzida por certos agentes químicos ou físicos (LIU; YU; SHAIKH, 2008). Estudos anteriores destacam que a ativação dessas vias consiste em uma estratégia terapêutica importante na neuroproteção da retina (KILIC *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2013). Desta forma, os resultados obtidos reiteram o efeito neuroprotetor dos peptídeos, principalmente o PnPa13 que foi capaz de ativar a fosforilação de ERK1/2 e AKT.

O papel de PnPa11 e PnPa13 na expressão de subunidades do receptor NMDA, NR2A e NR2B também foi investigado (Figura 27).

Figura 27 – Avaliação da expressão de NR2A e NR2B na retina de olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul



Legenda: São apresentados imunoblots representativos para A) NR2A e expressão de β -actina (painel superior), B) Expressão de NR2B e β -actina (painel superior). Ambos os níveis de expressão foram realizados na retina do grupo saudável, veículo ou tratados com PnPa11 (1,25 μ g/mL) ou PnPa13 (1,25 μ g/mL). Cerca de 100 mg de lisado celular foram usados para cada amostra. Os gráficos mostram a análise densitométrica de C) NR2A ou D) NR2B normalizado para expressão de β -actina. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os dados representam as médias \pm DP de quatro experimentos independentes (saudável e PnPa11) e três experimentos independentes (veículo e PnPa13), expressos como porcentagem de fosforilação NR2A ou NR2B basal. *Indica diferença estatística em relação ao grupo saudável (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). &Indica diferença estatística em relação ao grupo veículo (&& $p < 0,001$). #Indica diferença estatística entre os grupos PnPa11 e PnPa13 (### $p < 0,001$).

Observou-se que a luz do LED azul promoveu uma redução de $45,29 \pm 2,12\%$ nos níveis de NR2A e $39,28 \pm 9,55\%$ nos níveis de NR2B na retina dos animais pré-tratados com o veículo em comparação ao grupo saudável. O pré-tratamento com o PnPa11 promoveu um aumento da expressão de $93,07 \pm 9,37\%$ no NR2A e $23,96 \pm 5,75\%$ no NR2B em relação ao grupo veículo. Por outro lado, o PnPa13 promoveu queda significativa nos níveis de expressão de NR2A ($34,22 \pm 6,79\%$) e NR2B ($89,44 \pm 2,73\%$) em comparação ao grupo veículo

O envolvimento de receptores NMDA na morte de células neuronais na retina está bem estabelecido. Alguns trabalhos já demonstraram que diferentes subunidades de receptores NMDA desencadeiam vias divergentes: pró-apoptótica e/ou antiapoptótica (LAM *et al.*, 1999).

A subunidade NR2A desempenha um papel neuroprotetor ao fosforilar a proteína CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*), e ativa a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e vias celulares que contribuem para a sobrevivência neuronal. Por outro lado, a ativação da subunidade NR2B é responsável por desencadear vias apoptóticas, uma vez que promove um aumento nos níveis de ROS e inibe a expressão de CREB. Na retina, os receptores NR2A e NR2B estão presentes na camada plexiforme interna (CPI) (FLETCHER *et al.*, 2000).

CHOO *et al.* (2012) mostraram que a ativação da subunidade NR2B proporcionou um influxo de cálcio na mitocôndria, sinal para apoptose neuronal. Por outro lado, a ativação da subunidade NR2A levou a uma resistência do neurônio ao insulto do glutamato. Curiosamente, alguns estudos demonstram que um mesmo composto pode apresentar uma função neuroprotetora, por desempenhar uma modulação diferencial dos receptores NMDA, e, portanto, seria capaz de promover uma ativação da via de sobrevivência NR2A e a inibição da via apoptótica mediada por NR2B (SHEN *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2017). Além disso, os receptores NMDA estão relacionados à ativação das vias ERK 1/2 e AKT. A subunidade NR2B, embora seja responsável pela neurotoxicidade do glutamato, é capaz de ativar ERK1/2, o que promove uma sinalização neuroprotetora (KRAPIVINSKY *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007). Por outro lado, essa mesma subunidade é responsável pela inativação da via Akt, o que possibilita maior apoptose celular (YANSONG, WANG *et al.*, 2014).

Nossos dados demonstraram que a expressão das subunidades p-ERK1/2, p-Akt1 e NR2A ou NR2B foi modificada pela exposição à luz do LED azul. Esses resultados

corroboram com estudos anteriores que descrevem as alterações causadas pela luz nessas vias de sinalização (MO *et al.*, 2013; SAMARDZIJA *et al.*, 2006).

O PnPa11 promoveu aumento na expressão da subunidade NR2A, ativando a via neuronal pró-sobrevivência e evitando a morte das células neuronais. Entretanto, esse peptídeo também ativa NR2B, o que desencadeia vias apoptóticas. Esse resultado ratifica estudos anteriores que descrevem a atividade desse peptídeo em canais glutamato (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Entretanto, ao ativar NR2B, o peptídeo também promove um aumento na fosforilação de ERK1/2 conforme observado anteriormente, o que pode justificar o efeito neuroprotetor exercido por esse peptídeo no modelo de degeneração da retina induzida pela luz do LED azul

O peptídeo PnPa13 estimulou a fosforilação de ERK1/2 e evitou a desfosforilação de Akt1. Além disso, ele foi capaz de inibir a expressão de receptores NMDA. Curiosamente, em estudo realizado por NAKAZAWA *et al.* (2008), camundongos deficientes em ERK1 exibiram morte celular mais intensa nas camadas CGC e CNI após o tratamento com NMDA, em comparação com camundongos-controle. Esse resultado reafirma aqueles obtidos em nosso estudo, que mostrou um menor número de células apoptóticas na CNI nas retinas dos ratos que foram previamente tratados com o PnPa13, reforçando o potencial neuroprotetor desse peptídeo a essas células.

Nossos resultados estabelecem uma correlação entre os efeitos neuroprotetores dos peptídeos PnPa11 e PnPa13 e a degeneração da retina induzida pela exposição à luz LED azul. No entanto, mais estudos serão necessários para melhor compreensão do efeito terapêutico desses peptídeos em doenças neurodegenerativas que acometem a retina.

4 CONCLUSÃO

Os peptídeos derivados da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, PnPa11 e PnPa13, atuam em vias celulares que muitas vezes estão ligadas à etiologia de doenças neurodegenerativas da retina. Dessa forma, há um grande interesse na pesquisa desses peptídeos, bem como em sua aplicação para doenças oculares.

Tendo em vista a ausência de estudos que empregam o uso intraocular desses peptídeos, foi requerido um estudo prévio para avaliar a toxicidade e garantir a segurança no uso intravítreo do PnPa11 e PnPa13. Inicialmente, foi testada uma ampla faixa de concentração (0,50; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 8,00 e 12,50 µg/mL), em estudo de viabilidade celular. Entretanto, nenhuma das doses testadas revelou alterações significativas.

Posteriormente, o ensaio CAM foi utilizado para analisar uma possível atividade angiogênica promovida pelo uso do PnPa11 ou PnPa13 em doses de 0,50 – 5,00 µg/mL. Foi observado que ambos os peptídeos promoveram apenas uma redução no número de junções, sem alterar a área vascularizada da CAM.

Tendo em vista os resultados anteriores, algumas doses (0,50 - 5,00 µg/mL) foram escolhidas para a avaliação da toxicidade *in vivo*, por meio de ERG, avaliações clínicas e análise histológica. Foi determinado que a dose mais adequada seria 1,25 µg/mL, e esta foi utilizada para os testes subsequentes.

Os estudos de degeneração da retina promovida pela luz do LED azul revelaram que ambos os peptídeos foram capazes de proteger a retina do dano induzido. As análises do ERG mostraram que, na presença de um pré-tratamento com os peptídeos, há uma maior preservação da amplitude das ondas a e b, referente à resposta das células de Müller, células bipolares e fotorreceptores. Esse efeito foi refletido nas análises morfológicas que apresentaram uma maior preservação nas camadas em que essas células estão presentes, indicando uma atividade neuroprotetora desses peptídeos. As análises de western blot elucidam alguns dos mecanismos envolvidos nesse efeito, reiterando a hipótese de que esses peptídeos são capazes de proteger a retina contra a degeneração induzida por luz.

Com base nos resultados desta etapa do estudo é possível evidenciar a segurança e o potencial efeito terapêutico de tais compostos para patologias retinianas. Embora os desafios futuros sejam numerosos, os resultados obtidos possibilitam uma nova perspectiva no tratamento de doenças degenerativas da retina, e abrem inúmeros caminhos para a aplicação e o estudo de peptídeos em doenças oculares. Aliado a isso, o desenvolvimento de formulações destinadas para ao segmento posterior do olho, pode ser explorado para melhorar a biodisponibilidade de peptídeo nesses tecidos e, conseqüentemente, promover uma neuroproteção mais eficaz.

**PARTE II: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO
PEPTÍDEO PnPP-19 DERIVADO DE UMA TOXINA PRESENTE NA PEÇONHA DA
ARANHA *Phoneutria nigriventer***

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo e a apoptose estão implicados em várias doenças degenerativas da retina. Logo, há uma vasta infinidade de cascatas celulares que podem servir de alvo terapêutico para essas patologias. Com base nisso, estratégias neuroprotetoras geralmente visam mecanismos múltiplos da doença, e seus benefícios podem ser estendidos a diferentes distúrbios da retina (PARDUE; ALLEN, 2018; SCHMIDT; BERGERT; FUNK, 2008).

Conforme visto na parte I dessa tese, a luz do LED azul foi responsável por induzir um estresse oxidativo às células da retina. Durante esse processo, o glutamato é liberado das vesículas sinápticas, dando início a morte de neurônios, contendo receptores para essa molécula. Em vista disso, agentes terapêuticos como os peptídeos PnPa11 e PnPa13, que bloqueiam a ação do glutamato, podem atuar como neuroprotetores prevenindo ou atenuando na morte celular dessas células (DOURADO *et al.*, 2020).

Outro processo capaz de desencadear doenças degenerativas na retina é a isquemia. Nesse tecido, o fornecimento de oxigênio é controlado pelo fluxo sanguíneo da retina e da coróide. Assim, a elevação aguda da PIO, como acontece em alguns casos de glaucoma agudo de ângulo fechado, restringe a oxigenação e ocasiona o estresse oxidativo e a apoptose (OSBORNE *et al.*, 1999).

Neste contexto, um agente neuroprotetor pode ser definido como uma substância capaz de neutralizar a morte de células nervosas da retina e/ou nervo óptico de maneira direta ou indireta (DOOZANDEH; YAZDANI, 2016). Isso significa que os agentes devem atingir essas estruturas para exercer efeito local, ou podem afetá-las indiretamente, por exemplo, estimulando outros componentes capazes de anular os insultos a esses tecidos.

Um tipo mecanismo indireto, por exemplo, seria a redução da PIO. Por esse motivo, o NO, recentemente, ganhou atenção como uma alternativa potencial para o tratamento do glaucoma. Os estudos destacam o papel neuroprotetor dessa molécula com base em sua capacidade de modular a PIO através do seu efeito vasodilatador (CAVET *et al.*, 2014; TSAI, GRAY, & CAVALLERANO, 2017). Além disso, quando em baixas concentrações fisiológicas, o NO é capaz de exercer uma atividade protetora às células da retina devido as suas propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas (CAVET *et al.*, 2014).

O conhecimento acumulado indica que algumas toxinas presentes na peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* atuam na liberação de NO (NUNES *et al.*, 2008;

YONAMINE; TRONCONE; CAMILLO, 2004). Até o momento não há evidências de que os peptídeos PnPa11 e PnPa13 exerçam tal efeito e eles não tiveram ação após administração tópica. No entanto, um outro peptídeo denominado PnPP-19 vem se destacando pelos efeitos na liberação de NO pela via NO/GMPc em diferentes sistemas (FREITAS *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2019).

Conforme descrito anteriormente, a ação do PnPP-19 está associada à ativação das NOS que culmina em aumento da produção de NO. Porém, algumas dessas isoformas (iNOS e nNOS) estão associadas à geração de ROS e ao influxo do Ca²⁺ intracelular, efeitos que levam ao estresse oxidativo, à apoptose celular e, conseqüentemente, à degeneração da retina. Sabe-se que a exposição da retina a níveis excessivos de luz é responsável por desencadear o estresse oxidativo (DONOVAN; CARMODY; COTTER, 2001; MISHRA *et al.*, 2006). Assim, o modelo de exposição à luz do LED azul dificultaria a visualização de efeitos neuroprotetores do PnPP-19.

Embora a degeneração da retina induzida por aumento da PIO esteja relacionada ao aumento da isoforma iNOS (CHO *et al.*, 2011; SENNLAUB; COURTOIS; GOUREAU, 2001), esse modelo vem sendo amplamente empregado para investigar a atividade de moléculas com potencial terapêutico. Nesses estudos, fármacos ditos neuroprotetores proporcionaram uma manutenção do fluxo sanguíneo e preservação de células da retina, por meio do aumento da expressão de NO (KARIM *et al.*, 2009) ou inativação da acetilcolinesterase (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2013), efeitos relacionados à atividade do PnPP-19.

Fundamentado nos dados acima apresentados, a segunda parte da tese teve como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora do peptídeo PnPP-19 utilizando o modelo de degeneração retiniana induzida pelo aumento abrupto da PIO. Inicialmente, considerando a carência de estudos que avaliem a toxicidade e segurança da aplicação ocular deste peptídeo, o capítulo aborda a viabilidade do uso tópico em olhos de ratos por meio de testes *in vivo*.

Em um segundo momento, tendo em vista o efeito hipotensivo e neuroprotetor produzido pelo NO, o modelo animal de isquemia/reperfusão foi empregado para avaliar a possível ação neuroprotetora do PnPP-19. Esses efeitos foram avaliados por meio de testes eletrofisiológicos e morfológicos.

Essa parte do trabalho contou com a parceria da empresa Biozeus®.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Peptídeo

O PnPP-19 foi sintetizado na GenOne Biotechnologies, no Rio de Janeiro - RJ, Brasil. A massa molecular do PnPP-19 foi avaliada por MALDI-TOF (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*), como previamente descrito por NUNES *et al.*, 2019. O peptídeo foi gentilmente cedido pela professora e colaboradora deste trabalho Maria Elena de Lima (Santa Casa de Belo Horizonte). O projeto cadastrado no SisGen sob número de registro A9C5260 (**Anexo 5**).

2.1.2 HET-CAM

Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Ovos embrionados de aves *Gallus gallus domesticus* - linhagem Ross, Rivelli, Brasil. Solução salina estéril, Equiplex, Brasil, Hidróxido de sódio, Synth, Brasil.

2.1.3 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Cloreto de sódio, Synth, Brasil. Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Tropicamida 1% (m/v), Mydriacyl[®], Alcon, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Solução salina estéril da Equiplex, Brasil. Etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA. Entellan[®], Merck, Alemanha.

2.1.4 Avaliação da liberação de NO

Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Reagente de Griess, ácido fosfórico, etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil.

2.1.5 Estudo da permeação tópica do PnPP-19 marcado com FITC

PnPP-19 marcado com FITC foi sintetizado na GenOne Biotechnologies, no Rio de Janeiro - RJ, Brasil e gentilmente cedido pela professora Maria Elena de Lima (Santa Casa de Belo Horizonte). Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1%

(m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Solução salina estéril da Equiplex, Brasil. Etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA.

2.1.6 Avaliação da atividade neuroprotetora *in vivo*

Solução salina estéril da Equiplex, Brasil. Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Tropicamida 1% (m/v), Mydriacyl[®], Alcon, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA. Entellan[®], Merck, Alemanha.

2.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água Milli-Q[®], Merck Millipore, EUA. Balança analítica Sartorius, Alemanha. Microscópio óptico Axio Imager M2, Zeiss, Alemanha. Incubadora automática digital, Premium Ecológica, Brasil. Estereomicroscópio, modelo DM4000B, acoplado a uma câmera digital CCD modelo DFC 280, Leica, Alemanha. Eletrorretinograma Espion E2 Colordome, estimulador de LED Ganzfeld ColorDome[®], software Espion E³, Diagnosys LLC, EUA. Eletrodos tipo agulha e lente, ERG Jet, Fabrinal SA, Suíça. Tonômetro veterinário Tono-PenVet[®], Reichert, EUA. Oftalmoscópio binocular indireto, Lente Volk 90D, Welch Allyn, EUA. Espectrofotômetro NanoDrop 200, Thermo Scientific, EUA. Leitor de microplacas Tecan Infinite PRO Meilen, Suíça. Centrífuga GS-6R, Beckman Coulter Life Sciences, EUA. Microscópio confocal de varredura a laser LSM 880, ZEISS, Alemanha. Criostato CM1850, Leica, Alemanha.

2.3 Animais

Foram utilizados ratos da espécie Wistar, machos, adultos, com idade entre 7 e 10 semanas, pesando aproximadamente 300 g, adquiridos no biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (27 ± 5 °C) e luminosidade (12 hs luz/12 hs escuro) sem restrição de água ou comida.

Os estudos *in vivo* foram aprovados pelo CEUA-UFMG (Protocolos: nº 203/2018 – **Anexo 6** e 171/2019 – **Anexo 7**). Todos os testes foram realizados seguindo o estatuto para o uso de animais em pesquisa oftálmica e visão da ARVO.

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Preparação da solução para o peptídeo PnPP-19

A solução do peptídeo PnPP-19 foi preparada solubilizando o pó liofilizado em solução salina estéril. Foram pesados $4,0 \pm 0,05$ mg de peptídeo em microtubo, adicionou-se

1 mL de salina estéril e agitou-se por 1 min em agitador orbital, obtendo uma solução com concentração de 40.000 µg/mL. A solução estoque foi armazenada em tubo lo-bind a - 20°C. As dosagens das concentrações dos peptídeos foram realizadas de maneira semelhante à descrita no capítulo anterior (*Seção 2.4.1 – Parte I*).

2.4.2 Avaliação do potencial de irritação ocular

A irritação ocular é um parâmetro largamente empregado para avaliar a possibilidade do uso ocular de uma determinada substância. Entre os testes mais utilizados para a investigação deste parâmetro, tem-se o teste Draize, que avalia os possíveis danos causados por substâncias químicas em olho de coelho (PRINSEN *et al.*, 2017; WILHELMUS, 2001).

Na tentativa de substituir os testes *in vivo* para tal finalidade, conforme o princípio dos 3R's descrito por William Russell e Rex Burch (1992) em "The principles of humane experimental technique", foi desenvolvido o teste denominado HET-CAM (do inglês *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*), um ensaio barato e sensível que usa a CAM de ovos de galinhas fertilizados (LUEPKE; KEMPER, 1986).

Para realização do teste, ovos embrionados da espécie *Gallus gallus domesticus* e linhagem Ross foram incubados na posição vertical em uma incubadora automática digital à temperatura de 37 ± 1 °C e 60 ± 1% de umidade relativa do ar. No 10º dia do desenvolvimento embrionário, foi feita uma abertura circular de aproximadamente 4 cm de diâmetro na região da câmara de ar na casca dos ovos e descartou-se os ovos inviáveis (não embrionados). A membrana interna da casca foi cuidadosamente removida a fim de evitar qualquer dano aos vasos sanguíneos, expondo a CAM.

Os ovos foram divididos em 6 grupos (n = 10): controle negativo (solução salina estéril), controle positivo (NaOH, 0,1 M), PnPP-19 (40 µg), PnPP-19 (80 µg), PnPP-19 (160 µg) e PnPP-19 (320 µg). Os ovos foram levados para um estereomicroscópio com câmera digital acoplada (**Figura 28**) e 300 µL de uma solução contendo a dose correspondente a cada grupo foram aplicados sobre a CAM. O tempo de início das reações, sangramento, lise e coagulação foi anotado e o índice de irritação ocular (IIO) foi calculado de acordo com a equação 3:

$$IIO = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-l) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300} \quad (3)$$

Onde *h* é o tempo em segundos do início da hemorragia, *l* = lise e *c* = coagulação. A proporção foi multiplicada por um fator que indica o impacto do efeito observado no dano vascular (GILLERON *et al.*, 1996).

Figura 28 – Avaliação da irritação ocular por HET-CAM



Em seguida, o IIO foi atribuído com base na seguinte classificação: $IIO \leq 0,9$: não irritante ou levemente irritante; $0,9 < IIO \leq 4,9$: moderadamente irritante; $4,9 < IIO \leq 8,9$: irritante; $8,9 < IIO \leq 21$: severamente irritante, como descrito por Araújo e colaboradores (2009).

2.4.3 Estudo da toxicidade *in vivo*

2.4.3.1 Aplicação tópica

Para investigar uma possível toxicidade no uso ocular do peptídeo PnPP-19, os animais foram, aleatoriamente, randomizados em 4 grupos ($n = 10$). Eles foram manualmente contidos e aplicou-se uma gota ($20 \mu\text{L}$) de um colírio, preparado a partir da solução estoque, durante 7 dias no olho esquerdo de cada animal. Foram testadas as doses 40, 80, 160 μg . Os olhos direitos foram mantidos intactos.

2.4.3.2 Avaliação do estado funcional da retina por ERG

O exame ERG foi realizado previamente e após 1, 7 e 15 dias da administração tópica do colírio. Todos os registros foram obtidos após 12 hs de adaptação ao escuro, conforme descrito na seção 2.4.4.2 – Parte I.

A análise dos registros do ERG se consistiu em medir a amplitude e o tempo implícito das ondas a e b durante a exposição a $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (resposta dos bastonetes) ou $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (respostas combinadas de cones e bastonetes), conforme descrito anteriormente. Os valores obtidos para as diferentes doses dos peptídeos foram comparados ao grupo veículo.

2.4.3.3 Avaliação do fundo de olho

A avaliação do fundo de olho foi realizada antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação do colírio, logo depois da realização do ERG, com o objetivo de detectar sinais de irritação relacionados ao peptídeo. A observação foi realizada com o auxílio de uma lente Volk 90 D e de um oftalmoscópio binocular indireto, conforme descrito na seção 2.4.4.3 – *Parte I*.

2.4.4.4 Análise histológica

Ao final das análises, os animais foram sacrificados e os olhos enucleados para processamento histológico, conforme descrito na seção 2.4.4.4 – *Parte I*. Ao final do processamento, incluiu-se as amostras em parafina para obtenção dos blocos. Com o auxílio de um micrótomo, obteve-se cortes com 4 µm de espessura e estes foram adicionados a uma lâmina para coloração (hematoxilina e eosina). Por fim, uma lamínula foi fixada sobre a lâmina com Entellan®.

A morfologia da córnea e da retina foram avaliadas em microscopia óptica, utilizando uma lente objetiva com aumento de 20x (n = 4), a fim de observar algum sinal de toxicidade.

2.4.4 Estudo de permeação do PnPP-19

Na tentativa de observar a permeação do peptídeo PnPP-19 para o interior do olho, foi realizado um estudo utilizando o peptídeo conjugado com FITC. Neste ensaio, foi utilizado um total de seis animais, aleatoriamente divididos em dois grupos. O primeiro grupo, que foi denominado PnPP-19-FITC, (n = 3) recebeu uma gota (20 µL) do PnPP-19 conjugado com FITC com concentração de 0,004 mg/mL (equivalente a 80 µg/olho -1,6 mM) em salina estéril. O segundo grupo (n = 3) recebeu o mesmo volume de um colírio contendo apenas a solução salina estéril e foi denominado veículo. Ambos os colírios foram aplicados ambiente escuro sob luz de LED vermelha.

Após 2 hs, os animais foram sacrificados com overdose de anestésico e os olhos foram retirados e preparados para análise histológica, conforme descrito na seção 2.4.4.4 - *Parte I*. Após a confecção dos blocos de parafina, foram obtidos cortes com 5 µm de espessura utilizando um micrótomo. Os cortes foram adicionados a lâminas e não se realizou nenhuma técnica de coloração.

As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal com uma objetiva de 20 ×, barra de escala = 50 µm. O FITC foi excitado em 490 nm com emissão em 526 nm. A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando o software ImageJ® (versão 1.50i

- National Institutes of Health, EUA). Pelo menos 10 campos selecionados aleatoriamente de cada seção foram usados para avaliar a intensidade de fluorescência relativa, que foi analisada de acordo com o número de pixels.

2.4.5 Avaliação da liberação de nitrito por PnPP-19

O NO liberado pelos tecidos é rapidamente oxidado a nitrito e nitrato. Dessa forma, uma maneira de avaliar a liberação de NO em um determinado tecido é pela mensuração do nitrito/nitrato. Assim, afim de verificar o potencial efeito do PnPP-19 na liberação de NO em tecidos oculares, o nível de NO foi indiretamente determinado pela medida da concentração de nitrito, utilizando a metodologia de griess (GREEN *et al.*, 1982).

Para a realização do teste, utilizou-se um total de 12 animais, aleatoriamente alocados em dois grupos (n = 6/grupo). O primeiro grupo recebeu o uma gota (20 µL) de um colírio contendo PnPP-19 (0,004 mg/mL, equivalente a 80 µg/olho -1,6 mM) e o segundo grupo recebeu o colírio contendo apenas salina, nas mesmas condições do teste anterior (*seção 2.4.3.1 – Parte I*).

Após 2 hs da instilação dos colírios, os animais foram sacrificados e olhos coletados. Para a análise, a retina e o cristalino foram extraídos e os demais tecidos foram homogeneizados em 100 µL de solução salina. As amostras referentes à cada grupo (~ 5g) foram centrifugadas a 4 °C durante 10 min, e 30 µL do homogenato foram aplicados em duplicata nos poços da placa de microlitro, seguido pela adição de 30 µL de reagente de Griess (sulfanilamida a 2% [m/v], N-(1-naftil) etilenodiamina a 0,2% [m/v] e ácido fosfórico a 5% [m/v] em água deionizada). Esse reagente, na presença de nitritos, forma um composto azo de cor rosada, passível de ser quantificado no espectrofotômetro. Assim, após 10 min à temperatura ambiente, a absorbância foi medida com um leitor de microplaca com comprimento de onda de 540 nm.

As curvas de referência foram estabelecidas com nitrito de sódio em solução salina nas concentrações de 20, 15, 12,5, 10,5 e 1,5 µM em água destilada. O limite de detecção do ensaio foi ± 1,5 µg. A quantidade total de proteína encontrada no tecido ocular foi estimada pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 e a liberação de nitrito normalizada por µg de proteína.

2.4.6 Avaliação da atividade do PnPP-19 na PIO

2.4.6.1 Aplicação tópica

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos contendo seis animais cada. O primeiro grupo, denominado veículo, recebeu uma gota do colírio de solução salina.

O segundo grupo recebeu um uma gota do colírio de PnPP-19 na concentração de 0,004 mg/mL (equivalente a 80 µg/olho -1,6 mM).

Para aplicação, os animais foram manualmente contidos e aplicou-se a gota (20 µL) do colírio correspondente no olho esquerdo de cada animal. Os olhos direitos foram mantidos intactos.

2.4.6.2 Monitoramento de PIO

A PIO foi monitorada utilizando um tonômetro veterinário, previamente calibrado. Para as medições, os animais foram cuidadosamente contidos e quatro leituras de PIO foram realizadas para cada olho (com um erro padrão de < 5%), imediatamente antes e após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 hs da aplicação dos colírios. A média das medidas obtidas para cada intervalo de tempo foi considerada como o valor médio de PIO e os grupos foram comparados entre si.

2.4.7 Estudo da atividade neuroprotetora do PnPP-19

2.4.7.1 Aplicação tópica

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos contendo seis animais cada. O primeiro grupo, denominado veículo, recebeu uma gota do colírio de solução salina 0,9% (m/v). O segundo grupo recebeu um uma gota do colírio de PnPP-19 na concentração de 0,004 mg/mL (equivalente a 80 µg/olho -1,6 mM). Ambos os colírios foram instilados durante 7 dias consecutivos, antes de induzir a isquemia. O terceiro grupo, denominado saudável, recebeu uma gota do colírio de solução salina 0,9% (m/v) durante o mesmo período e não foi exposto ao processo isquêmico.

Para aplicação, os animais foram manualmente contidos e aplicou-se a gota (20 µL) do colírio correspondente no olho esquerdo de cada animal. Os olhos direitos foram mantidos intactos.

2.4.7.2 Indução da isquemia

A fim de simular o processo isquêmico que leva a degeneração da retina, os animais foram anestesiados via injeção intraperitoneal e os olhos topicamente anestesiados, conforme descrito na *seção 2.4.4.1 – Parte I*. A isquemia da retina foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Louzada-junior *et al.* (1992) com adaptações (DOURADO *et al.*, 2021; DOURADO *et al.*, 2021).

A isquemia foi induzida por uma elevação abrupta da PIO. Para isso, a câmara anterior do olho foi canulada por uma agulha de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre acoplada a uma seringa, ligando um reservatório de ar conectado a um manômetro.

Assim, a PIO foi elevada para 155 mmHg durante 60 min e a isquemia pôde ser observada pelo clareamento do fundo do olho em razão da interrupção do fluxo sanguíneo.

Após o período isquêmico, a PIO retornou aos níveis normais, aproximadamente 45 min depois do procedimento (período de reperfusão, durante o qual a cor do fundo do olho volta ao normal). Após a indução da isquemia, a função da retina foi avaliada por meio do ERG após 1 e 7 dias da isquemia, seguindo o mesmo protocolo descrito na seção 2.4.4.2 – *Parte I*.

Ao final do último ERG, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésicos (270:30 cetamina/xilazina mg/kg) via intraperitoneal e os olhos enucleados para análise histológica, conforme descrito na seção 2.4.4.4 – *Parte I*.

2.5 Análise estatística

Para todas as análises, foram determinados os valores de médias \pm DP para o número de experimentos independentes indicado para cada ensaio. Em todos os testes adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$.

Para avaliar a normalidade do padrão das curvas ERG, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk seguido de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

Na avaliação da fluorescência e da histologia os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

Para calcular a diferença entre amplitudes, tempos implícitos das ondas a e b, e PIO, utilizou-se ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

Para avaliação da concentração de nitrito, foi utilizado o teste *t* Student para dados não pareados.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 8.4.2.

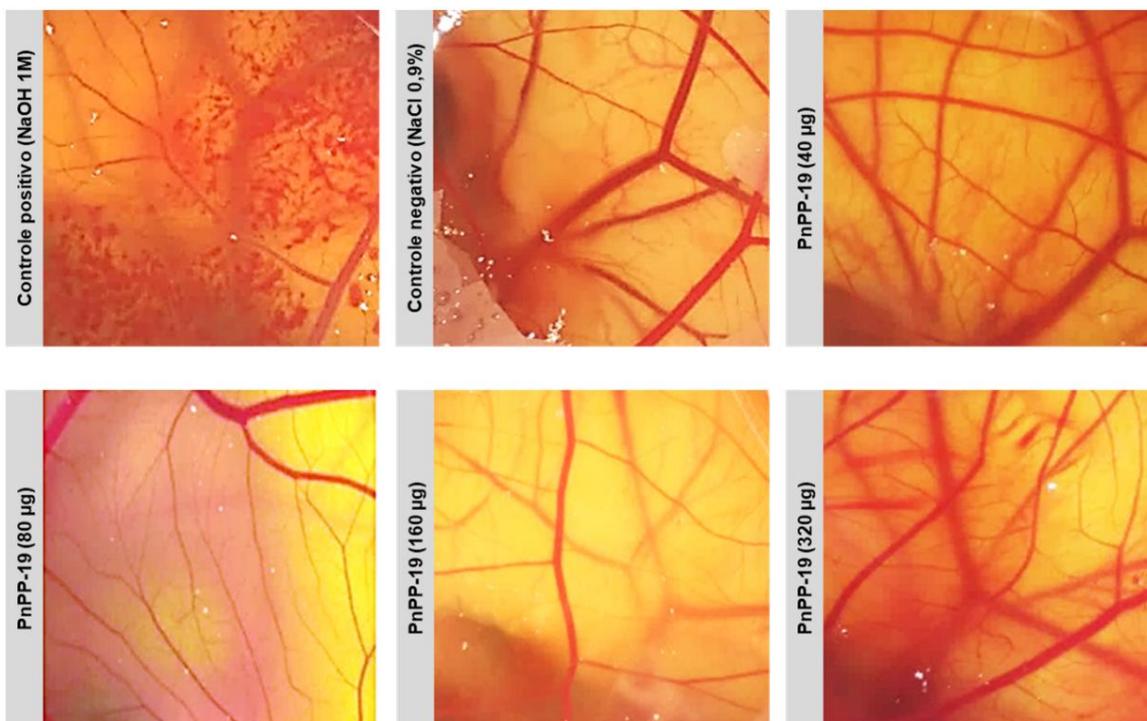
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da irritação ocular de PnPP-19 pelo ensaio HET-CAM

O potencial irritante do PnPP-19 em diferentes doses foi avaliado pelo teste HET-CAM e o IIO obtido após 300 s de observação foi comparado aos índices dos controles positivo (NaOH 0,1 M) e negativo (NaCl 0,9%).

Em relação ao controle positivo, as lesões iniciais foram observadas nos primeiros 30 s quando se notou uma extensa hemorragia seguida de coagulação. O IIO referente a este grupo foi de $20,11 \pm 0,32$; assim, o controle positivo foi classificado como severamente irritante. O controle negativo não apresentou nenhum sinal de toxicidade ($IIO \leq 0,9$) e foi classificado como não irritante (**Figura 29**). Esses resultados validam o experimento e corroboram com dados da literatura (GILLERON *et al.*, 1996; STEILING *et al.*, 1999).

Figura 29 – Fotografias representativas obtidas durante o ensaio de HET-CAM dos grupos que receberam PnPP-19 (40, 80, 160 e 320 µg)/ovo e os controles positivo (NaOH 0,1 M) e negativo (solução salina 0,9%), registradas após 300 s



O PnPP-19, em todas as doses testadas, não apresentou sinais de toxicidade e as pontuações médias obtidas para estes grupos foram inferiores a 0,9. Portanto, as doses testadas para o PnPP-19 foram classificadas como não irritantes (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Escore total obtido no ensaio de HET-CAM e classificação do grau de irritação para os grupos que receberam PnPP-19 (40, 80, 160 e 320 µg) e os controles positivo (NaOH 0,1 M) e negativo (solução salina 0,9%)

Solução testada	IIO ± DP	Classificação
NaOH 1 M (Controle positivo)	20,11 ± 0,32	Severamente irritante
NaCl 0,9% (Controle negativo)	≤ 0,9 ± 0,0	Não irritante
PnPP-19 (40 µg)	≤ 0,9 ± 0,0	Não irritante
PnPP-19 (80 µg)	≤ 0,9 ± 0,0	Não irritante
PnPP-19 (160 µg)	≤ 0,9 ± 0,0	Não irritante
PnPP-19 (320 µg)	≤ 0,9 ± 0,0	Não irritante

O HET-CAM é método alternativo a experimentação animal e tem como objetivo avaliar o potencial corrosivo e/ou irritante de um composto (DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017). De acordo com a literatura, os efeitos da substância testada em vasos da CAM correspondem aos sinais de irritação observados em olhos de coelhos avaliados pelo teste *in vivo* padrão, o teste de Draize (LUEPKE; KEMPER, 1986; STEILING *et al.*, 1999). Em decorrência disso, alguns países já aprovaram o uso do teste HET-CAM para investigar a irritação ocular (WANG, YANSONG *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que o teste HET-CAM é amplamente utilizado para avaliar o potencial irritante de produtos destinados ao uso tópico como: emulsões (ALI *et al.*, 2012), géis (FATHALLA *et al.*, 2017) e diversas preparações cosméticas (DEROUICHE; ABDENNOUR, 2017; GUPTA *et al.*, 2011; STEILING *et al.*, 1999).

Em nossa revisão não foi encontrado nenhum trabalho que investigou a toxicidade ocular do PnPP-19. Todavia, em um estudo realizado por Nunes *et al.* (2019), a aplicação tópica do PnPP-19 preparado em gel de Natrosol 2% m/v (400 µg do peptídeo em 200 µL do gel por animal) foi capaz de restaurar a função erétil sem induzir sinais de toxicidade, o que, de certa forma, corrobora com o nosso resultado.

O ensaio de HET-CAM indicou a ausência de irritação associada ao PnPP-19 nas doses entre 40 e 320 µg. Assim, o PnPP-19 nessas doses foi considerado seguro para aplicação tópica.

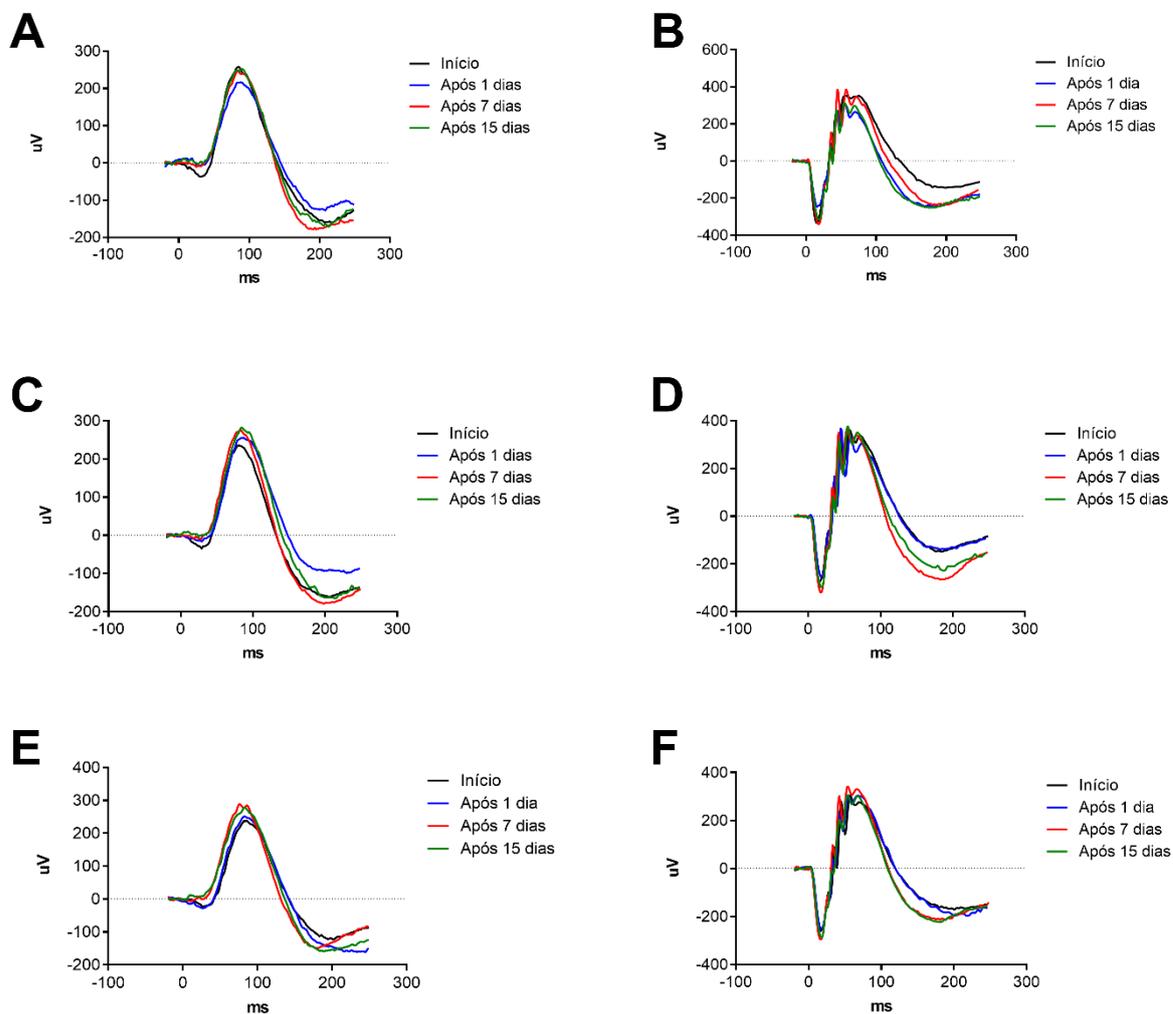
3.2 Avaliação da segurança do uso ocular tópico do PnPP-19

A fim de investigar a segurança *in vivo* do uso ocular tópico do PnPP-19, os animais receberam uma dose de peptídeo durante 7 dias, e após 1, 7 e 15 dias, foram avaliados por ERG, avaliação clínica e, ao final do estudo, por análise histológica. Um ERG foi realizado antes do início do tratamento para comparação. Considerando a ausência de toxicidade no teste HET-CAM, a segurança do uso tópico do PnPP-19 foi investigada utilizando as doses inferiores (40, 80 e 160 µg).

3.2.1 Estudo funcional da retina por ERG

Neste estudo, foi analisado o padrão das ondas a e b após os estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m⁻² e 3,0 cd.s.m⁻² na condição escotópica. Não foi observada nenhuma diferença para os olhos tratados com PnPP-19 após 1, 7 e 15 dias em comparação às curvas obtidas antes do tratamento (início) conforme apresentado na **Figura 30**.

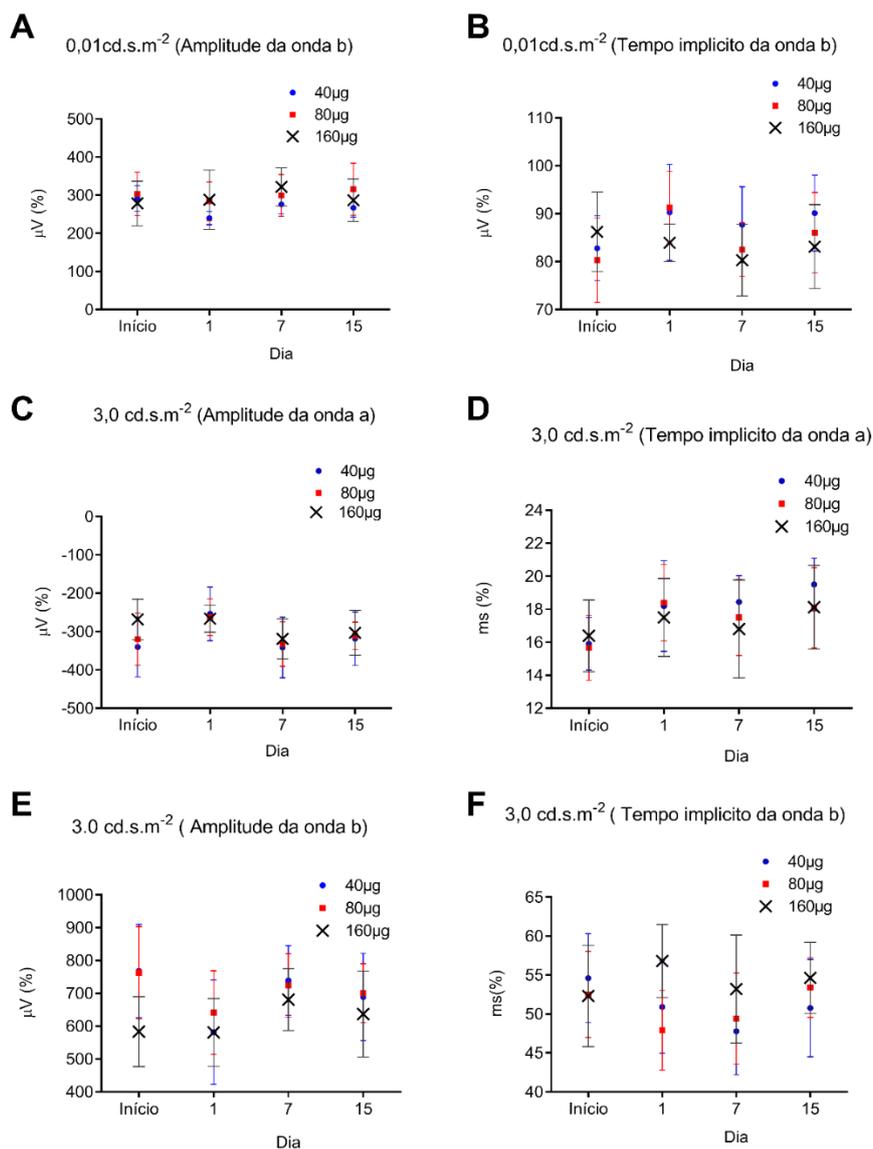
Figura 30 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos que receberam aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 μg) após os estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m^{-2} e 3,0 cd.s.m^{-2} antes e após 1, 7 e 15 dias



Legenda: A) curva obtida após estímulo luminoso de 0,01 cd.s.m^{-2} e B) curva obtida após estímulo luminoso de 3,0 cd.s.m^{-2} em olhos que receberam a aplicação tópica do colírio contendo 40 μg do PnPP-19. C) curva obtida após estímulo luminoso de 0,01 cd.s.m^{-2} e D) curva obtida após estímulo luminoso de 3,0 cd.s.m^{-2} em olhos que receberam a aplicação tópica do colírio contendo 80 μg do PnPP-19. E) curva obtida após estímulo luminoso de 0,01 cd.s.m^{-2} e F) curva obtida após estímulo luminoso de 3,0 cd.s.m^{-2} em olhos que receberam a aplicação tópica do colírio contendo 160 μg do PnPP-19. As curvas obtidas após 1, 7 e 15 dias do tratamento, foram comparadas às curvas obtidas antes do tratamento. O padrão das curvas do ERG foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, sucedido por Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn ($n = 10$).

Na avaliação das amplitudes e tempos implícitos das ondas a e b escotópicas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos durante o período do estudo (15 dias), o que corrobora com os resultados anteriores (**Figura 31**).

Figura 31 – Média \pm DP da amplitude e tempo implícito referente às curvas a e b na condição escotópica antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 μ g)



Legenda: A) amplitude da onda b após estímulo luminoso de 0,01 cd.s.m⁻² e B) o respectivo tempo implícito. C) curva obtida da onda a após estímulo luminoso de 3,0 cd.s.m⁻² e D) o respectivo tempo implícito. E) curva obtida da onda b após estímulo luminoso de 3,0 cd.s.m⁻² e F) o respectivo tempo implícito. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni (n = 10). Os dados são representados pela média \pm DP.

O ERG é um exame objetivo, não invasivo, capaz de detectar pequenas áreas de disfunção da retina (LAI *et al.*, 2007). Desde a sua primeira descrição feita por Sutter e Tran (1992), o ERG modificou a forma de avaliar doenças acometem o segmento posterior do olho. Esse exame permite a estimulação simultânea de várias áreas da retina e o registro de cada resposta de forma independente, fornecendo uma medida topográfica da atividade eletrofisiológica desse tecido. Desta forma, o ERG é capaz de detectar a perda de atividade ocasionada por diversas doenças e pela toxicidade causada pelo uso de medicamentos (DETTORAKI; MOSCHOS, 2016).

A toxicidade ocular induzida por fármacos, embora não seja comum, requer um diagnóstico precoce. A maioria dos efeitos colaterais oculares são reversíveis após a interrupção da terapia, desde que detectado na fase inicial. No entanto, quando esses efeitos não são identificados, eles podem progredir, levar a uma perda visual e até mesmo a cegueira (SANTAELLA; FRAUNFELDER, 2007).

Em alguns casos, disfunção da retina pode ocorrer sem anormalidades estruturais. Desta forma, a avaliação por ERG pode fornecer uma avaliação funcional particularmente útil para o diagnóstico de toxicidade e monitoramento da progressão ou recuperação da disfunção da retina após a suspensão do medicamento (HUANG *et al.*, 2015; PALMHOF *et al.*, 2018).

Com base nos dados obtidos, o uso ocular tópico do PnPP-19 nas doses testadas não alterou a amplitude e a latência das ondas a e b durante o período do estudo. Esses resultados sugeriram que o peptídeo não modificou as funções da retina, reforçando a segurança do seu uso, nas doses experimentadas.

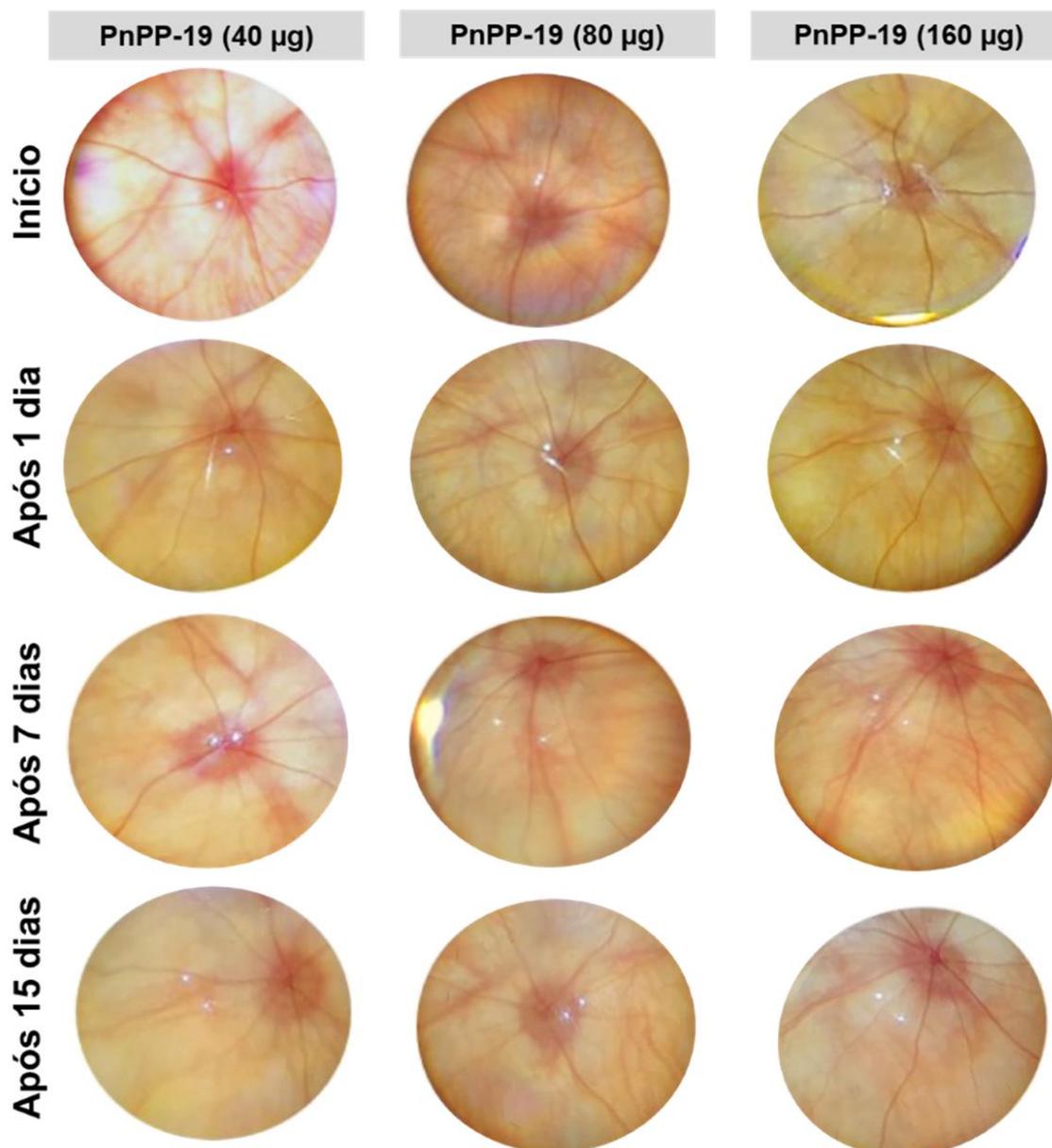
3.2.2 Avaliação da superfície ocular e do fundo de olho

É importante destacar que para uma avaliação mais aprimorada da toxicidade, deve-se realizar o exame oftalmológico com observação das superfícies oculares e do fundo de olho, após dilatação, a fim de verificar algum sinal de irritabilidade. O uso de fotografia no exame clínico proporciona um monitoramento mais preciso e aumenta a sensibilidade para detectar mudanças graduais (DE SOUSA *et al.*, 2017). Aliado a isso, o exame de fundo de olho é uma avaliação importante, capaz de estimar um possível comprometimento da retina e observar mudanças no disco óptico (MOSS *et al.*, 1985).

Os animais que receberam o PnPP-19 nas diferentes doses foram submetidos a uma avaliação antes e após 1, 7 e 15 dias do tratamento. As superfícies oculares examinadas não apresentaram sinal de opacidade da córnea, produção de secreção ou anormalidades nas pálpebras (arquivo pessoal). As fotografias obtidas do fundo do olho

aparentavam normalidade, sem a presença de hemorragia ou exsudatos, com nervo óptico livre de alterações (**Figura 32**).

Figura 32 – Imagens do fundo de olho antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 µg)



Legenda: Fotografias digitais foram obtidas antes e após 1, 7 e 15 dias da aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 e 160 µg).

No estudo realizado por PESCINA *et al.* (2018), foi realizado um levantamento em relação à citotoxicidade de peptídeos em células da conjuntiva e da córnea. Os autores observaram uma baixa toxicidade associada a esses compostos, entretanto o trabalho também destacou a necessidade de uma investigação individual da toxicidade para outras linhagens celulares, por exemplo, células endoteliais e retinianas.

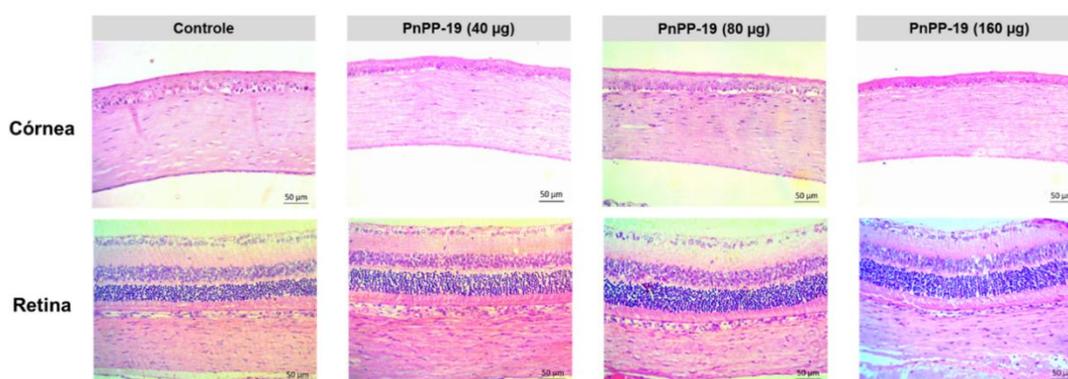
A aplicação tópica é a via mais utilizada para o tratamento de doenças oculares devido a sua praticidade e segurança (SASAKI *et al.*, 1996). Entretanto, efeitos adversos associados a medicamento administrado pela via tópica não são raros (FRAUNFELDER, 2006). Na córnea saudável, o endotélio forma uma barreira semipermeável que regula a troca de fluidos e solutos entre o humor aquoso e o estroma avascular da córnea. Porém, alguns fármacos afetam a integridade da barreira epitelial da córnea, desencadeando processos inflamatórios. A exemplo disso, alguns estudos relatam a associação entre o uso tópico do latanoprostá e o surgimento de ceratite relacionada a herpes simples (EKATOMATIS, 2001; MORALES *et al.*, 2001).

A avaliação da superfície ocular e do fundo de olho não detectou nenhum sinal de toxicidade associado ao peptídeo. Este resultado reitera a análise obtida no ERG e endossa a segurança do uso ocular tópico do PnPP-19.

3.2.3 Análise histológica

Ao final das análises clínicas, lâminas histológicas foram preparadas para observar possíveis efeitos nocivos associados ao uso ocular tópico do PnPP-19. Assim, foram obtidas imagens da córnea e da retina dos animais que receberam as doses de 40, 80 ou 160 µg do PnPP-19 por olho. Lâminas de animais saudáveis foram utilizadas para comparação (**Figura 33**).

Figura 33 – Avaliação histológica da córnea e da retina 15 dias após aplicação tópica do PnPP-19 (40, 80 ou 160 µg)



Legenda: Imagens representativas da córnea e retina após a instilação de PnPP-19 nas doses de 40, 80 e 160 µg (n = 4). As imagens foram obtidas com objetiva de 20 x em microscópio.

O estudo da tolerabilidade do PnPP-19 no sistema ocular é inédito; entretanto, um estudo de toxicidade foi realizado por SILVA *et al.* (2015) revelou que esse peptídeo

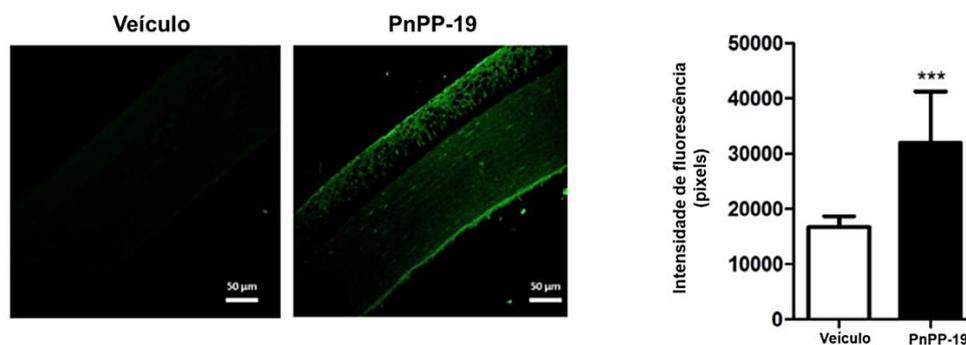
também não induziu danos histológicos nos rins, coração, fígado, pulmão e tecidos cerebrais.

Nossos resultados revelaram a ausência de alterações morfológicas na córnea ou retina que caracterizem um efeito nocivo relacionado ao uso tópico do PnPP-19 nas doses avaliadas testadas. Essa observação corrobora com os resultados anteriores que descartam efeitos tóxicos associados ao uso do PnPP-19 e nos permite inferir a segurança do seu uso. Assim, para os testes subsequentes, a dose intermediária de 80 µg/olho foi escolhida para investigar os potenciais efeitos do PnPP-19.

3.3 Investigação da permeação do PnPP-19 pela aplicação tópica

A fim de observar a permeabilidade do PnPP-19 no segmento anterior do olho, o peptídeo marcado com FITC foi instilado sobre a córnea e após 2 hs os animais foram sacrificados, os olhos enucleados e as lâminas histológicas preparadas (**Figura 34**). O FITC emite fluorescência quando excitado a 490 nm; dessa forma foi possível quantificar a fluorescência presente nos olhos dos animais onde se instilou o peptídeo marcado e compará-los ao grupo veículo (receberam apenas salina).

Figura 34 – Permeação de PnPP-19 (80 µg/olho) através da córnea



Legenda: A fluorescência promovida por PnPP-19 marcado com FITC mostrou que esse peptídeo foi capaz de permear através da córnea. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey ($n = 3$). Os dados são representados pela média \pm DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (***) $p < 0,001$).

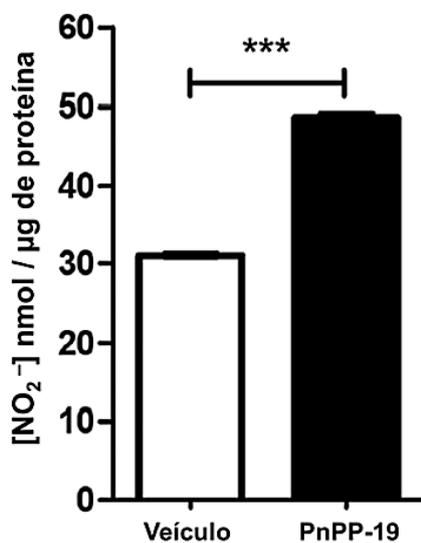
O resultado indicou que o PnPP-19 conjugado com FITC foi capaz de permear através da córnea. A fluorescência promovida por PnPP-19 marcado com FITC foi qualitativamente e estatisticamente maior (***) $p < 0,001$ se comparado ao grupo que recebeu apenas salina ($n = 3$). Além disso, é importante ressaltar que uma fluorescência intensa pode ser observada no endotélio da córnea, evidenciando a permeação desse peptídeo.

Trabalhos anteriores mostraram que este peptídeo não foi capaz de permear somente a córnea, mas também a pele humana. Em estudo realizado por DE MARCO ALMEIDA *et al.* (2018), observou-se a permeação através da pele humana para o peptídeo em sua forma livre e encapsulado em lipossomas catiônicos deformáveis. Por outro lado, em estudo desenvolvido por SILVA *et al.* (2019), os autores perceberam uma baixa permeabilidade cutânea do PnPP-19, cerca de 10% da dose aplicada. No entanto, isso não afetou a sua ação uma vez que o composto demonstrou atividade após a aplicação tópica. Nosso resultado corrobora com esses trabalhos e abre espaço para novos estudos investigarem a ação ocular por meio do uso tópico do PnPP-19.

3.4 Estudo da liberação de NO promovida pelo uso tópico do PnPP-19

Sabe-se que o PnPP-19 é capaz de promover um aumento na liberação de NO em diferentes tecidos (FREITAS *et al.*, 2017; NUNES DA SILVA *et al.*, 2019). Desta forma, investigou-se os níveis de nitrito (produto da oxidação do NO) no segmento anterior do olho, após aplicação tópica, a fim de investigar se essa liberação também ocorreria nos tecidos oculares. Esse resultado foi apresentado na **Figura 35**.

Figura 35 – Efeito da instilação de PnPP-19 (80 µg/olho) na concentração de nitrito (NO₂⁻) em tecidos do segmento anterior do olho



Legenda: Os tecidos dos olhos foram coletados 2 hs após a instilação tópica do veículo (solução salina) ou PnPP-19 (80 µg/olho). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* Student, para dados não pareados (*n* = 6). Os dados são representados pela média ± DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (***) *p* < 0,001).

Nossas análises revelaram que PnPP-19 estimulou um aumento estatístico (***) *p* < 0,001 na produção de nitrito em tecidos oculares do segmento anterior de ratos

saudáveis ($48,70 \pm 1,19$ [NO_2^-] nmol/mg de proteína) em comparação com olhos de ratos tratados apenas veículo ($31,01 \pm 0,38$ [NO_2^-] nmol/mg de proteína).

Trabalhos anteriores relatam que o PnPP-19 foi capaz de estimular a liberação do NO pela ativação das enzimas nNOS e iNOS no corpo cavernoso de ratos, potencializando a função erétil (SILVA, 2017) e eNOS e nNOS em patas de ratos promovendo efeito antinociceptivo periférico (FREITAS *et al.*, 2017). Assim, deve-se considerar que o PnPP-19 apresenta uma ativação de NOS específica para cada tecido.

Nossos resultados mostram que após a administração tópica de PnPP-19 foi observado um aumento nos níveis de nitrito em tecidos oculares do segmento anterior, o que pode ser justificado pela ativação das NOS presentes nestes tecidos. Porém, mais estudos serão realizados para averiguar qual ou quais NOS são ativadas após a instilação do peptídeo.

3.5 Avaliação da atividade do PnPP-19 na PIO

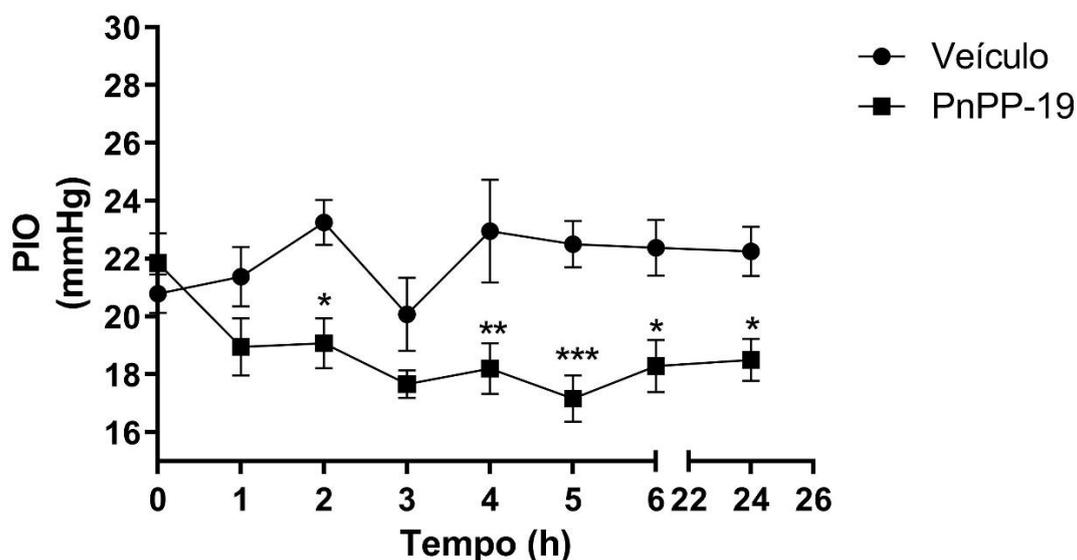
Recentemente, várias pesquisas têm enfatizado o papel do NO no controle da PIO (CAVET *et al.*, 2014; HAEFLIGER *et al.*, 1999). Evidências convergentes indicam que a via de sinalização NO/GMPc está envolvida em processos homeostáticos no olho, incluindo a regulação na produção/eliminação de humor aquoso (CAVET *et al.*, 2014).

O NO é produzido em ambos os segmentos do olho humano, fato evidenciado pela presença das três isoformas de NOS nesses tecidos. Em relação aos tecidos diretamente envolvidos na regulação PIO, eNOS é encontrada no músculo ciliar e em células do canal de Schlemm. Na malha trabecular, a síntese de NO é mediada pela iNOS, após estimulação (CHANG *et al.*, 2015; STAMER *et al.*, 2011; SCHNEEMANN *et al.*, 2003; TSAI, GRAY, & CAVALLERANO, 2017).

O canal de Schlemm, estrutura semelhante à de uma veia, e a malha trabecular são altamente contráteis. Neste contexto, a produção e liberação endógena de NO produz um relaxamento do tônus vascular e do trabeculado justacanalicular promovendo maior facilidade de saída do humor aquoso e, portanto, induz uma redução da PIO (GOEL *et al.*, 2010; SCHNEEMANN *et al.*, 2002; WIEDERHOLT; STURM; LEPPLE-WIENHUES, 1994).

O resultado anterior revelou que a aplicação tópica do PnPP-19 promoveu um aumento na concentração de NO nos tecidos do segmento anterior. Assim, o peptídeo foi instilado na superfície ocular de ratos normotensos a fim de verificar o seu potencial na redução da PIO. Os animais receberam uma única gota de PnPP-19 (80 μg /olho) ou o mesmo volume (20 μL) de veículo, e a PIO foi avaliada durante 24 hs (**Figura 36**).

Figura 36 – Avaliação da PIO em ratos normotensos após aplicação tópica do PnPP-19 (80 µg/olho)



Legenda: Comparação da PIO entre os grupos: PnPP-19 e veículo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni (n = 6). Os resultados foram expressos em mmHg (média ± DP). *Indica diferença estatística em relação ao grupo veículo (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Os resultados mostram que PnPP-19 promoveu uma redução significativa da PIO, após 2 hs (p < 0,05), 4 hs (p < 0,01), 5 hs (p < 0,001), 6 hs (p < 0,05), e 24 hs (p < 0,05) da instilação, em comparação ao grupo veículo. Sendo uma redução equivalente a 12,69 ± 8,57 % após 2 hs, 16,69 ± 9,96 % após 4 hs, 21,46 ± 9,15 % após 5 hs, 16,31 ± 8,62 % após 6 hs e 15,85 ± 8,00 % após 24 hs da instilação.

A elevação da PIO é um fator de risco crítico para o glaucoma, uma doença neurodegenerativa e causa frequente de cegueira em todo o mundo (THAM *et al.*, 2014). Embora haja uma vasta disponibilidade de medicamentos antiglaucomatosos, ainda existe uma necessidade médica importante neste campo (SHALABY *et al.*, 2020).

Atualmente, grande parte dos medicamentos destinados ao tratamento do glaucoma atuam reduzindo o fluxo do humor aquoso ou aumentando a sua saída através da via uveoescleral. Porém, o tecido comprometido no glaucoma e responsável por aumentar a PIO – o fluxo trabecular – permanece como um alvo terapêutico importante, embora pouco explorado (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014). Nesse contexto, o peptídeo PnPP-19 surge como uma opção terapêutica interessante.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo, a capacidade do PnPP-19 de reduzir a PIO também foi avaliada em um modelo experimental de hipertensão ocular induzida por injeção intraocular de ácido hialurônico (DA SILVA *et al.*, 2020). Os resultados revelaram que, uma vez estabelecida a hipertensão ocular, o grupo tratado com uma dose do PnPP-19 reduziu significativamente a PIO em relação a um segundo grupo, tratado com veículo (salina), durante todo o período do estudo. Além disso, mesmo após 24 hs, a PIO permaneceu estatisticamente reduzida ($p < 0,001$) para grupos tratados com peptídeo ($22,9 \pm 3,6$ mmHg), em comparação ao grupo veículo ($29,3 \pm 2,8$ mmHg). O grupo tratado com PnPP-19 também apresentou PIO inferior ao grupo tratado com bimatoprost, um medicamento antiglaucomatoso disponível comercialmente.

No estudo discutido no parágrafo anterior, também foi investigado, por meio de análises histológicas, o efeito do PnPP-19 nas camadas da retina. O glaucoma é uma doença caracterizada por dano progressivo do nervo óptico com perda da camada de células ganglionares da retina. Essa perda se manifesta como uma diminuição da camada de fibras nervosas desse tecido e escavação da cabeça do nervo óptico, o que, funcionalmente, resulta em perda de campo visual (WEINREB; AUNG; MEDEIROS, 2014).

A análise histológica do estudo apontou uma perda significativa de células ganglionares em olhos de ratos tratados com veículo. Entretanto, no grupo tratado com PnPP-19 o número de células ganglionares foi semelhante ao de animais saudáveis, sugerindo que o tratamento com PnPP-19 também foi capaz de proteger essas células. O trabalho destacou a necessidade de mais estudos complementares para uma melhor compreensão desse efeito (DA SILVA *et al.*, 2020).

3.6 Estudo da atividade neuroprotetora do PnPP-19

A elevação do PIO no glaucoma pode comprometer o fluxo sanguíneo na retina, tornando-o insuficiente para atender às necessidades metabólicas desse tecido, um dos que mais consomem oxigênio (OSBORNE *et al.*, 1999). Essa hipoperfusão desencadeia alterações funcionais e morfológicas irreversíveis, conhecidas como retinopatia isquêmica (HUGHES, 1991). Além disso, sabe-se que nem todas as células da retina são comprometidas simultaneamente durante a isquemia. Com base na literatura, o processo isquêmico gera, inicialmente, um dano primário que atinge um determinado número de células e, posteriormente, ocorre uma perda secundária proveniente do estresse oxidativo. Assim, agentes capazes de neutralizar o efeito desses radicais livres podem atuar como neuroprotetores (OSBORNE *et al.*, 2004; VASUDEVAN; GUPTA; CROWSTON, 2011).

Outra via neuroprotetora potencial está relacionada aos receptores de acetilcolina como mostram estudos sobre a galantamina, um inibidor de acetilcolinesterase utilizado clinicamente no tratamento de Alzheimer. Os estudos iniciais dessa droga revelaram que ela seria capaz de aumentar a sobrevivência das células ganglionares em modelo de lesão aguda do nervo óptico (axotomia). Esse efeito não foi relacionado a uma redução da PIO porque a galantamina não alterou a pressão em olhos glaucomatosos. Assim, os autores apontaram a ativação de receptores muscarínicos de acetilcolina como um novo alvo terapêutico para prevenção de morte neuronal e perda da visão em neuropatias ópticas (ALMASIEH *et al.*, 2010).

Em outro trabalho o grupo de pesquisa de Almasieh e colaboradores observou que o efeito neuroprotetor da galantamina estava associado a uma manutenção do fluxo sanguíneo da retina, observado em modelo de glaucoma induzido por salina hipertônica. Nesse estudo, foi observado que a elevação da PIO é acompanhada por uma redução na microvasculatura da retina, um processo passível de ser revertido, ao contrário da apoptose em células ganglionares. Logo, intervenções precoces capazes de proteger a microvasculatura e melhorar o fluxo sanguíneo podem exercer um efeito benéfico às células da retina, reduzindo ou minimizando os processos degenerativos (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2013). Esse efeito foi atribuído ao aumento de acetilcolina, induzido pela galantamina, que levou a ativação de células endoteliais e uma maior preservação da rede vascular e do fluxo sanguíneo da retina (BORDA *et al.*, 2005).

É sabido que o PnPP-19 é capaz de induzir a produção de NO por meio da ativação de NOS em diferentes tecidos (DA SILVA *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2017; NUNES DA SILVA *et al.*, 2019). Além disso, esse peptídeo foi responsável por inibir acetilcolinesterase em estudos *in vitro* (ensaios realizados pela Biozeus®, dados não publicados). Diante disso, investigamos o potencial efeito neuroprotetor do PnPP-19 sobre os danos causados às camadas de células da retina após um episódio de isquemia seguido de reperfusão.

3.6.1 Estudo eletrorretinográfico de animais pré-tratados com PnPP-19 e submetidos a isquemia

Para investigar a ação neuroprotetora do PnPP-19 (80 µg/olho) na função retiniana, registros de ERG adaptados ao escuro (escotópico) foram realizados antes e após 1 e 7 dias da indução de degeneração induzida por modelo experimental de isquemia (LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 1992). O modelo utilizado é responsável por interromper o fluxo sanguíneo por meio da elevação abrupta da PIO, o que ocasiona a hipóxia. Em um segundo momento, há o reestabelecimento desse fluxo (reperfusão) e

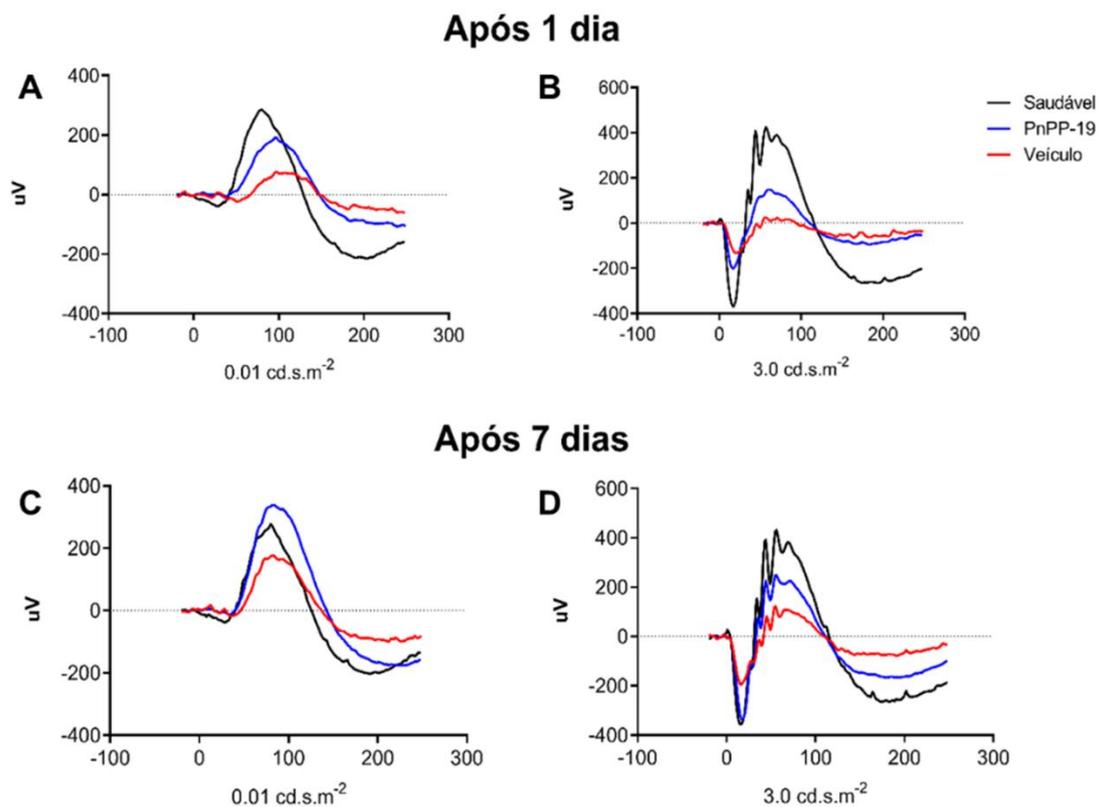
a oxigenação dos tecidos retorna, concomitantemente. Contudo, é justamente na restauração do fluxo sanguíneo que ocorre a exacerbação da lesão tecidual e uma resposta inflamatória aguda, denominada lesão de reperfusão (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011).

A isquemia ocular induzida pelo aumento da PIO é um modelo frequentemente utilizado. Este método produz isquemia global, com obstrução tanto da circulação retiniana quanto da uveal, e seus efeitos são evidenciados pelo achatamento das ondas a e b do ERG e por um clareamento do fundo de olho (DOURADO *et al.*, 2021). Este ensaio produz características patológicas semelhantes às do glaucoma agudo de ângulo fechado (OSBORNE *et al.*, 2004).

Nossos resultados revelaram que as ondas obtidas nos flashes de intensidade de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ dos grupos submetidos à isquemia apresentaram uma modificação no padrão das curvas a e b em relação ao grupo saudável (animais que não sofreram isquemia). Porém, os animais que receberam um pré-tratamento com o PnPP-19 apresentaram uma manutenção parcial no padrão dessas ondas após 24 hs, o que reforça hipótese do potencial neuroprotetor do PnPP-19.

No 7º dia, ambos os grupos submetidos à isquemia apresentaram uma recuperação das ondas a e b em resposta aos estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.m.s}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$. Todavia, essa recuperação foi superior no grupo pré-tratado com PnPP-19 (**Figura 37**). Vale ressaltar que após 7 dias, a onda a (em resposta ao estímulo de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$) apresentou um padrão de curva muito semelhante à do grupo saudável. Esses efeitos também foram observados quando os valores de amplitude e tempo implícito foram avaliados. Após o estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.m.s}^{-2}$, embora tenha sido observado uma redução expressiva da amplitude da onda b para o grupo veículo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Porém, houve um aumento estatístico no tempo de resposta (tempo implícito) da onda b para o grupo veículo ($p < 0,05$) 1 dia após a isquemia (**Figura 38B**).

Figura 37 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos pré-tratados com o PnPP-19 e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



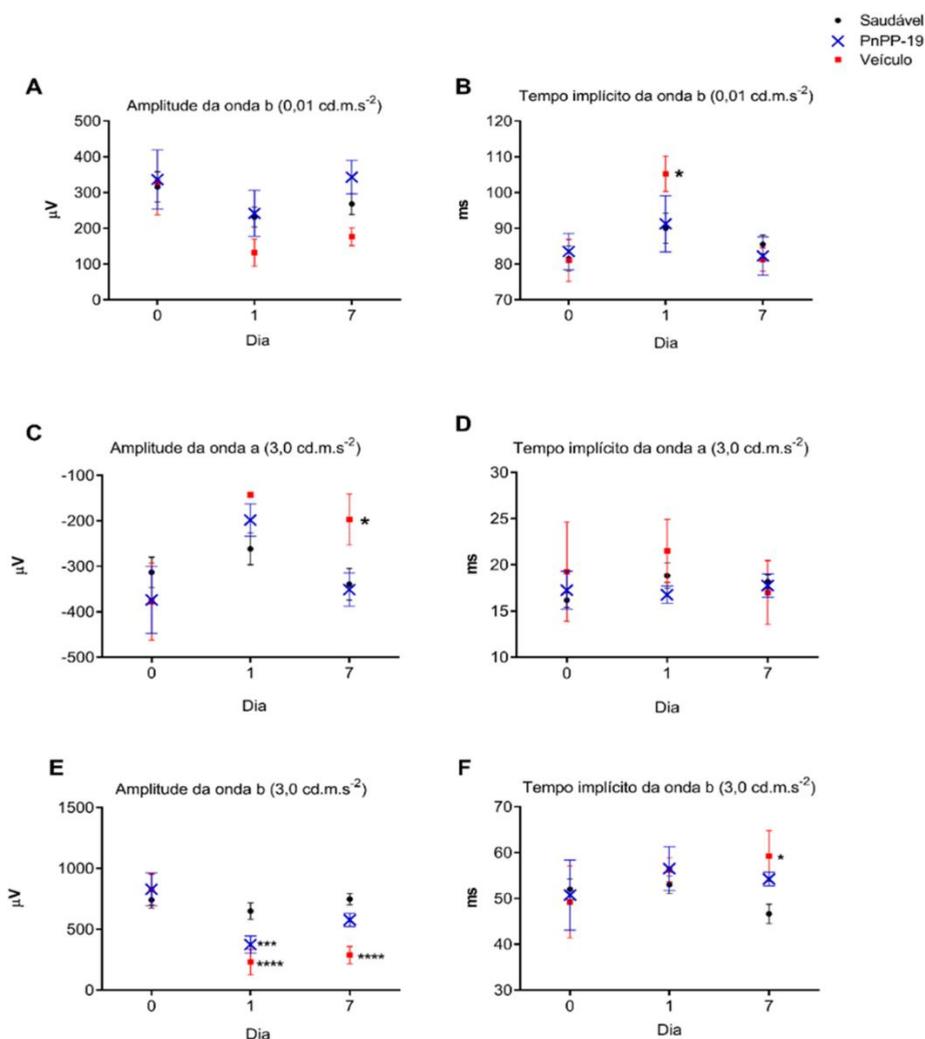
Legenda: Respostas aos estímulos luminosos de: A) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e B) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ após 1 dia da indução da isquemia. Respostas aos estímulos luminosos de: C) $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e D) $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$ após 7 dias da indução da isquemia. O padrão das curvas do ERG foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, sucedido por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($n = 6$).

Alterações no tempo implícito estão associadas a disfunções na CNI da retina, local onde estão localizadas as células bipolares e células de Müller. Essas alterações são características de algumas doenças oculares como glaucoma e retinopatia (MUKAIDA *et al.*, 2004). Em estudo realizado por KIM *et al.* (2013), os autores também observaram aumento do tempo implícito na onda b após indução da isquemia.

Em revisão publicada por Osborne *et al.* (2004), os autores atribuíram esse efeito a uma alteração na atividade das células de Müller; entretanto, esse mecanismo não está totalmente elucidado. Os autores sugerem ainda que fármacos capazes de minimizar a redução da amplitude e aumento do tempo implícito podem ser consideradas neuroprotetoras.

Em relação ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$, o grupo tratado com salina apresentou redução estatística na amplitude da onda a, após 7 dias (**Figura 38C**). Essa redução não foi observada para o grupo PnPP-19, evidenciando o efeito desse peptídeo em fotorreceptores.

Figura 38 – Médias \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos pré-tratados com o PnPP-19 e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de $0,01 \text{ cd.s.m}^{-2}$ e $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$



Legenda: A) amplitude da onda b em resposta ao estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.m.s}^{-2}$. B) tempo implícito da b em resposta ao estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.m.s}^{-2}$. C) amplitude da onda a em resposta ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$. D) tempo implícito da onda a em resposta ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$. E) amplitude da onda b em resposta ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$. F) tempo implícito da onda b em resposta ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.m.s}^{-2}$. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

Em relação a onda b, foi observada uma redução da amplitude e um aumento do tempo implícito no sétimo dia de experimento (**Figura 38E**). Esses efeitos foram atenuados pelo pré-tratamento com PnPP-19. Como reportado anteriormente, a onda b refere-se às respostas das células bipolares e células de Müller, logo, esse resultado endossa a hipótese de que o PnPP-19 seria capaz de exercer um efeito neuroprotetor a essas células.

Alterações nos fotorreceptores levam à perda de um impulso excitatório, visualizado pela ausência da onda a hiperpolarizante e, como consequência, as células bipolares não são capazes de gerar a onda b despolarizante, refletindo em uma ausência de transmissão de impulsos elétricos na retina (OSBORNE, *et al.*, 2004). Estudos anteriores estabeleceram que o NO é capaz de promover um aumento da hiperpolarização evocada pela luz (SATO; OHTSUKA, 2010).

Em retina de rato, as NOS estão localizadas principalmente na CPI (prolongamentos de células amácrinas, bipolares e ganglionares) e nos fotorreceptores (YAMAMOTO *et al.*, 1993). A maneira pela qual as NOS são ativadas nas células da retina ainda não foi totalmente elucidada; entretanto, sabe-se que esse processo envolve a despolarização das células devido as altas concentração externas de íons potássio em torno dos fotorreceptores no escuro (KURENNY *et al.*, 1994).

O PnPP-19 é capaz de induzir a produção de NO por meio da ativação de NOS em diferentes tecidos (FREITAS *et al.*, 2017; NUNES DA SILVA *et al.*, 2019), incluindo a câmara anterior do sistema ocular (DA SILVA, *et al.*, 2020). Embora ainda não haja uma comprovação da liberação de NO na retina, esse efeito poderia justificar a preservação da amplitude das ondas a e b observadas nos grupos pré-tratados com o peptídeo.

O papel duplo do NO (neuroprotetor ou neurotóxico) na fisiopatologia de distúrbios neurodegenerativos ainda precisa ser elucidado. Esses efeitos parecem depender do tipo de doador do NO, da quantidade e duração da liberação. Alguns estudos conseguiram associar fármacos doadores de oxigênio a um efeito neuroprotetor as células da retina (CAVET *et al.*, 2014). A exemplo disso, um trabalho realizado por KARIM *et al.* (2009) comprovou que a aplicação tópica de um doador de NO e beta-bloqueador (nipradiol) apresentou efeitos neuroprotetores na retina de ratos, após modelo de degeneração induzida por esmagamento do nervo óptico.

Acredita-se que o dano oxidativo seja um contribuinte importante para a patogênese das doenças neurodegenerativas e não existe um consenso sobre o papel de cada isoforma NOS (LUNDBERG *et al.*, 2009). Estudos anteriores associam um aumento na

expressão de iNOS na retina sob condições isquêmicas (SENNLAUB; COURTOIS; GOUREAU, 2001). Esse aumento promove uma maior produção de NO, capaz de interagir com o EROs para produzir peroxinitrito e outras moléculas citotóxicas que podem causar morte neuronal (HEYNE *et al.*, 2013; LUNDBERG *et al.*, 2009). Somado a isso, a produção excessiva de NO por iNOS também está implicada em distúrbios inflamatórios e autoimunes crônicos, caracterizados pela presença abundante de macrófagos e neutrófilos (SCHMETTERER; POLAK, 2001; SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007).

Por outro lado, durante a inflamação há um aumento na permeabilidade do endotélio, o que permite a passagem dos constituintes do sangue e do plasma da vasculatura para o interstício. Esse efeito culmina na formação de edema e inicia o processo inflamatório. As ações do NO na permeabilidade vascular parecem ser predominantemente antiinflamatórias, ou seja, diminuem a permeabilidade endotelial. Dessa forma, doadores de NO são capazes de reduzir a formação de edema em vários modelos experimentais, enquanto os inibidores da síntese de NO promovem a formação de edema (PERSSON; EKELUND; GRÄNDE, 2003; WALLACE, 2005).

Alguns estudos descrevem a capacidade do NO de eliminar e reduzir a produção de radicais livres (KANNER; HAREL; RINA, 1991). Consequentemente, essa moléculas são capazes de diminuir a oxidação mediada por EROs, como o peróxido e o superóxido, limitando a lesão induzida pelo estresse oxidativo (WINK *et al.*, 2001).

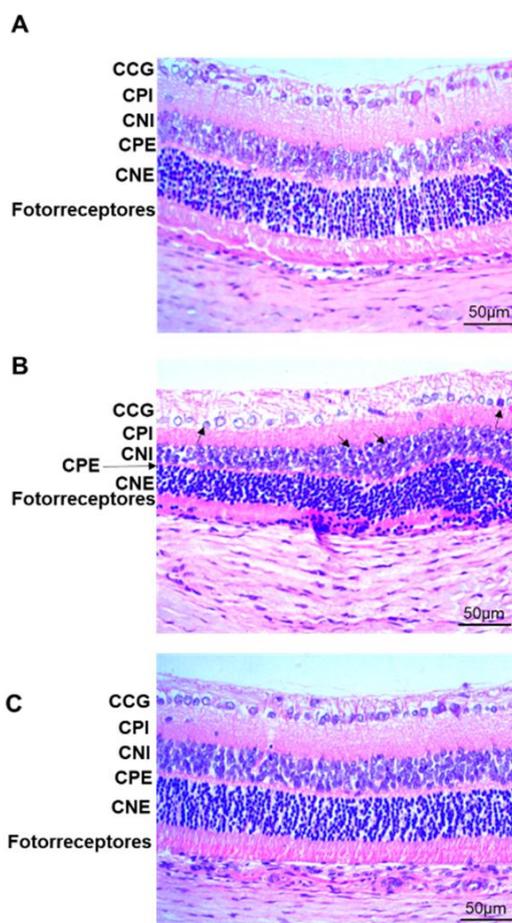
Uma outra hipótese que poderia justificar o efeito neuroprotetor do PnPP-19 seria a sua capacidade de inibir acetilcolinesterase, como observado em estudos *in vitro* realizados pela empresa Biozeus. A via metabólica da acetilcolina foi destacada como um potencial alvo neuroprotetor para o glaucoma por meio de mecanismos que independem da PIO. Esse efeito foi relacionado a uma capacidade antioxidante de agonistas de receptores muscarínicos, cuja falta foi relacionada a danos na retina e a uma manutenção da circulação da retina promovida por inibidores de acetilcolinesterase (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2013; LASPAS *et al.*, 2019).

Diante do que já sabemos sobre PnPP-19, podemos inferir que esse peptídeo também é capaz de neuroproteger a função visual da retina, devido, possivelmente, a sua ação na liberação de NO e/ou inibição da acetilcolinesterase. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

3.6.2 Análise histológica de animais pré-tratados com PnPP-19 e submetidos a isquemia

O modelo de elevação transitória da PIO leva a uma perda da funcionalidade, inflamação e danos em toda a retina (PALMHOF *et al.*, 2019). Desta forma, a observação de lâminas histológicas (**Figura 39**) trata-se de uma análise complementar ao ERG para analisar a extensão dos danos causados pela isquemia e a possível proteção conferida pelo PnPP-19.

Figura 39 – Análise histológica em olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia



Legenda: As setas pretas destacam áreas de vacuolização e núcleos picnóticos. Fotografias representativas de: A) grupo saudável, B) grupo veículo e (C) grupo PnPP-19. Abreviações: CCG - camada de células ganglionares, CNI - camada nuclear interna, CNE - camada nuclear externa, CPI – camada plexiforme interna, CPE – camada plexiforme externa. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. Barra de escala = 50 µm.

Ao analisar os cortes histológicos, notou-se em uma redução acentuada no número de células ganglionares no grupo pré-tratado com veículo. Além disso, foi observado um

aumento na vacuolização citoplasmática e a presença de núcleos picnóticos (indicado por setas, **Figura 39B**). Nesse mesmo grupo, a CPI aparentou uma redução em sua espessura, assim como a camada de fotorreceptores. Na CNI foram encontrados núcleos picnóticos (indicado por setas) e uma redução no número de células. Em relação a CNE, não foram observadas alterações morfológicas expressivas.

Em retinas pré-tratadas com PnPP-19, houve maior preservação da CCG e ausência de sinais de degeneração como núcleos picnóticos ou desorganização na CNI e CNE. Além disso, houve maior manutenção da morfologia das CPI e dos fotorreceptores (**Figura 39C**).

Na tentativa de mensurar esses dados, a espessura da retina e de algumas camadas foram medidas e comparadas entre os grupos (**Tabela 2**). Nos cortes histológicos de animais submetidos a isquemia, houve redução na espessura total da retina quando comparado ao grupo saudável, porém esse efeito foi atenuado nos animais pré-tratados com o peptídeo (redução de $21,61 \pm 4,28$ % e $12,45 \pm 3,85$ % para os grupos veículo e PnPP-19, respectivamente).

Tabela 2 – A espessura das camadas da retina e contagem de células ganglionares em olhos expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia

Grupo	Espessura (μm)			Células ganglionares (número/200 μm)
	Retina	CNI	CNE	
Saudável	$179,47 \pm 12,42$	$31,91 \pm 3,94$	$44,40 \pm 3,7$	$30,00 \pm 5,50$
Veículo	$140,68 \pm 13,37^{**\#}$	$24,83 \pm 4,08^*$	$39,77 \pm 7,09$	$18,00 \pm 4,50^{\#}$
PnPP-19	$157,12 \pm 8,43$	$28,31 \pm 1,16$	$39,51 \pm 5,80$	$28,25 \pm 4,50$

* Indica diferente estatística com um valor de $p < 0,05$ em comparação ao grupo saudável

** Indica diferente estatística com um valor de $p < 0,01$ em comparação ao grupo saudável

Indica diferente estatística com um valor de $p < 0,05$ em comparação ao grupo PnPP-19

Legenda: Os valores são apresentados como média \pm DP. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni ($n = 3$). Abreviações: CCG - camada de células ganglionares, CNI - camada nuclear interna, CNE - camada nuclear externa.

A CNI também apresentou alterações decorrentes do processo isquêmico. No grupo veículo foi observado uma espessura média de $24,83 \pm 4,08$ μm , $22,16 \pm 8,87$ % a menos do que a média do grupo saudável ($31,91 \pm 3,94$ μm). Contudo, nos animais do

grupo PnPP-19, a espessura média dessa camada foi de $28,31 \pm 1,16 \mu\text{m}$, semelhante ao grupo saudável, o que ressalta o papel neuroprotetor do peptídeo para esse grupo de células. Em relação a CNE, não foram observadas alterações significativas entre os grupos analisados.

Em relação ao número médio de células ganglionares, o grupo saudável apresentou uma média de $30,00 \pm 5,50$ células/200 μm . O grupo tratado com veículo exibiu uma redução significativa no valor médio ($18,00 \pm 4,50$ células/200 μm), refletindo o efeito degenerativo do processo isquêmico. Todavia, semelhante ao observado na CNI, o grupo PnPP-19 revelou uma média de $28,25 \pm 4,50$ células/200 μm , valor semelhante ao grupo saudável, o que mais uma vez reitera o efeito neuroprotetor desse peptídeo para as células ganglionares.

A isquemia retiniana é o principal contribuinte para o dano tecidual em doenças como glaucoma, oclusões vasculares da retina, retinopatia diabética e retinopatia da prematuridade (OSBORNE *et al.*, 2004). Um aspecto importante desse tipo de lesão é que a ausência de oxigênio e nutrientes, durante o período isquêmico, cria uma condição na qual a restauração da circulação (reperusão) resulta na geração excessiva de radicais livres e desencadeia um processo inflamatório, responsável por induzir alterações histopatológicas (EPSTEIN; MCCORD, 1985; SZABO *et al.*, 1991).

Neste estudo, observamos que o PnPP-19 foi capaz de proteger as células da retina contra a lesão isquêmica, indicada por uma redução do dano às camadas da retina. Os resultados histológicos corroboram com as análises do ERG, que destacam um efeito protetor do PnPP-19, principalmente em células bipolares (localizadas na CNI) e fotorreceptores. Além disso, o estudo histológico evidenciou maior preservação das células ganglionares para o grupo pré-tratado com o PnPP-19.

Nossos resultados concordam com trabalhos anteriores que descreveram um efeito neuroprotetor associado a doadores de NO (DITLEVSEN *et al.*, 2007; WAREHAM *et al.*, 2019). Além disso, alguns estudos comprovam que a neuroproteção induzida pelo NO é parcialmente mediada pela ativação da via NO/GMPc (GARHÖFER; SCHMETTERER, 2019), mecanismo associado à ação do PnPP-19 (SILVA *et al.*, 2019).

O NO também está diretamente envolvido na regulação da PIO (CAVET *et al.*, 2014). Em razão do seu efeito vasodilatador, a redução da PIO por si só é capaz de retardar ou interromper a progressão da degeneração em pacientes com glaucoma. (GARHÖFER; SCHMETTERER, 2019; HAYREH, 2001; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007). Assim, o efeito neuroprotetor do PnPP-19 também pode estar associado à

redução na PIO exercida por esse peptídeo. Portanto, testes mais aprofundados são requeridos para avaliação individual de cada um desses mecanismos.

A outra hipótese levantada foi em razão da inibição de acetilcolinesterase promovida *in vitro* pelo PnPP-19. Com base na literatura, a acetilcolina endógena é responsável por induzir a proliferação de células endoteliais e angiogênese *in vivo* (KIUCHI *et al.*, 2008). Desta forma, inibidores de acetilcolinesterase podem amenizar os danos teciduais promovidos pela isquemia ao preservar o fluxo sanguíneo na retina (ALMASIEH, MOHAMMADALI *et al.*, 2013; LASPAS *et al.*, 2019). Esse efeito pode estar envolvido na neuroproteção conferida à retina pelo PnPP-19. Assim, estudos que avaliem a atividade angiogênica desse peptídeo, por exemplo o teste CAM, podem auxiliar na elucidação essa hipótese.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o peptídeo, PnPP-19, quando administrado por via tópica, não induziu sinais de toxicidade nas doses de 40, 80 e 160 µg. Além disso, o ensaio do PnPP-19 marcado com FITC revelou que esse peptídeo foi capaz de permear pelas camadas da córnea, atingindo tecidos da câmara anterior.

Na investigação da ação do PnPP-19, observou-se que o peptídeo promoveu a liberação de NO, fato evidenciado pelo aumento da concentração de nitrito nos tecidos do segmento anterior, após aplicação tópica. Esse efeito pode mediar uma vasodilatação e relaxamento em tecidos responsáveis pela redução da PIO observada.

O pré-tratamento com PnPP-19 foi capaz prevenir danos à retina induzidos por isquemia. Hipotetizamos que esse efeito neuroprotetor seja devido a uma associação entre o efeito hipotensivo e efeitos antioxidantes estabelecidos pelo aumento na produção do NO e/ou inibição da acetilcolinesterase. Assim, esse peptídeo apresenta um enorme potencial para o tratamento da hipertensão ocular devido a sua ação dupla, hipotensiva e neuroprotetora.

PARTE III: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA RESERVATÓRIO PARA ENTREGA OCULAR DE PEPTÍDEOS

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos medicamentos utilizados na oftalmologia é administrada por via tópica, forma que apresenta maior facilidade de aplicação e comodidade para o paciente (GAUDANA *et al.*, 2010). Em contrapartida, estes são rapidamente eliminados, em razão de fatores biológicos que protegem o olho e, conseqüentemente, limitam a permeação de moléculas terapêuticas nos tecidos oculares (BARAR; JAVADZADEH; OMIDI, 2008; FIALHO; CUNHA JÚNIOR, 2007; HUGHES *et al.*, 2005).

As barreiras estáticas trabalham em conjunto com as barreiras dinâmicas, a fim de impedir a entrada de substâncias estranhas e patogênicas no espaço intravítreo. Assim, após a administração tópica de colírios, menos de 3% do medicamento administrado chega ao humor aquoso. No segmento posterior, essa concentração é ainda menor, o que dificulta o tratamento de doenças que promovem a degeneração da retina (BODDU; GUPTA; PATEL, 2014; SIGURDSSON *et al.*, 2007).

Para enfrentar os desafios da via tópica, diferentes formulações vêm sendo desenvolvidas. Recentemente, sistemas de entregas de medicamentos baseados em nanotecnologia, como micelas poliméricas, nanopartículas e lipossomas, foram desenvolvidos, com o objetivo de superar as barreiras e alcançar níveis de fármaco terapêuticamente significativos no segmento posterior do olho (RODRIGUES *et al.*, 2018; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011; WANG, *et al.*, 2018). Outro exemplo são as lentes de contato carregadas de fármacos que aumentam a biodisponibilidade do medicamento em comparação aos colírios (CARVALHO *et al.*, 2015; GULSEN; CHAUHAN, 2004).

Nesse contexto, a entrega ocular de peptídeos tem desafiado pesquisadores e empresas farmacêuticas (MATHUR *et al.*, 2018). Essas moléculas possuem estruturas complexas, facilmente modificadas por alterações de temperatura, pH, entre outros. Diante disso, apenas um número limitado de formulações é capaz de veicular peptídeos sem comprometer o resultado terapêutico (CROMWELL; HILARIO; JACOBSON, 2006; WITTING *et al.*, 2015).

Os sistemas reservatórios de fármacos formados a partir de biopolímeros têm se destacado pela versatilidade, facilidade de obtenção e baixo custo (WADHWA; MATHURA; LEWIS, 2018). Dentre esses sistemas está o nanowafer: um disco pequeno, fabricado a partir de polímeros biodegradáveis e mucoadesivos, que possui em sua superfície poços com tamanho nanométrico capazes de abrigar o fármaco (MANDAL *et al.*, 2018). Quando colocado sobre a esclera, esse sistema adere à superfície ocular e libera fármacos lentamente, à medida que se dissolve, o que

umenta a biodisponibilidade e a eficiência do tratamento. Durante o curso de liberação do fármacos, o nanowafer dissolve-se gradualmente e então desaparece, descartando a necessidade de sua remoção (MARCANO *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2015).

Fundamentado no efeito neuroprotetor e hipotensivo apresentado pelo uso ocular tópico do peptídeo PnPP-19 apresentado na parte II desta tese, avaliamos a eficácia dos nanowafers na entrega ocular desse peptídeo. Para isso, nanowafers de PVA foram produzidos e caracterizados. Posteriormente, a taxa de liberação e a eficácia desses dispositivos foram comparadas às do colírio contendo a mesma dose de PnPP-19.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.2 Peptídeo

O peptídeo PnPP-19 foi obtido conforme descrito na *seção 2.1.2 – Parte II*.

2.1.3 Preparo e caracterização do nanowafer

Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Kit Sylgard[®] 184, Dow Corning, USA. PVA, Etanol, Sigma-Aldrich, EUA. Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato monobásico de potássio, Synth, Brasil.

2.1.4 Animais

Foram utilizados ratos da espécie Wistar, machos, adultos, com idade entre 7 e 10 semanas, pesando aproximadamente 300 g, adquiridos no biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (27 ± 5 °C) e luminosidade (12 hs luz/12 hs escuro) sem restrição de água ou comida.

Os estudos *in vivo* foram aprovados pelo CEUA-UFMG sob protocolo n° 198/2020 - **Anexo 8**. Todos os testes foram realizados seguindo o estatuto para o uso de animais em pesquisa oftálmica e visão da ARVO.

2.1.5 Estudo da liberação in vivo do PnPP-19 a partir do nanowafer

Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Fluoresceína 1% (m/v), Allergan, Brasil.

2.1.6 Estudo de eficiência do nanowafer

Solução salina estéril da Equiplex, Brasil. Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Tropicamida 1% (m/v), Mydracyl[®], Alcon, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA.

2.1.7 Estudo da permeação tópica do PnPP-19 marcado com FITC a partir do nanowafer

PnPP-19 marcado com FITC (gentilmente cedido pela professora Maria Elena, Santa Casa de Belo Horizonte). Água ultrapura, Mili Q plus[®], Millipore, EUA. Agulha ultra fine II 0,3 mm, BD, Brasil. Cloridrato de tetracaína 1% (m/v) e cloridrato de fenilefrina 0,1% (m/v), Anestésico[®], Allergan, EUA. Cloridrato de cetamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®], Ceva, Brasil. Solução salina estéril da Equiplex, Brasil. Etanol e paraformaldeído, Sigma-Aldrich, EUA. Tissue Tek[®], OCT, Japão.

2.2 Equipamentos

Sistema de purificação de água Milli-Q[®], Merck Millipore, EUA. Balança analítica Sartorius, Alemanha. Microscópio óptico Axio Imager M2, Microscópio confocal de varredura a laser LSM 880, Microscópio eletrônico de varredura DSM940-A, Zeiss, Alemanha. Eletroretinograma Espion E2 Colordome, estimulador de LED Ganzlfield ColorDome[®], software Espion E³, Diagnosys LLC, EUA. Eletrodos tipo agulha e lente, ERG Jet, Fabrial SA, Suíça. Tonômetro veterinário Tono-PenVet[®], Reichert, EUA. Criostato CM1850, Leica, Alemanha. Lâmpada de fenda, Apramed HS5, Brasil, acoplado a câmera digital, modelo EOS Rebel T5, Canon, Japão. Metalizador Q150R ES, Quorum Technologies, Inglaterra.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparação do nanowafer de PVA

Uma base de silício contendo poços circulares (600 nm de diâmetro e 600 nm de profundidade) foi fabricada por litografia de feixe de elétrons (no inglês é frequentemente abreviada como *e-beam lithography*) no Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais da UFMG (LCPNano).

A litografia por feixe de elétrons é uma das técnicas mais flexíveis para a fabricação de dispositivos em escala submicrométrica. Esta técnica consiste em retirar, com um feixe focalizado de elétrons, regiões específicas de uma superfície coberta com um material

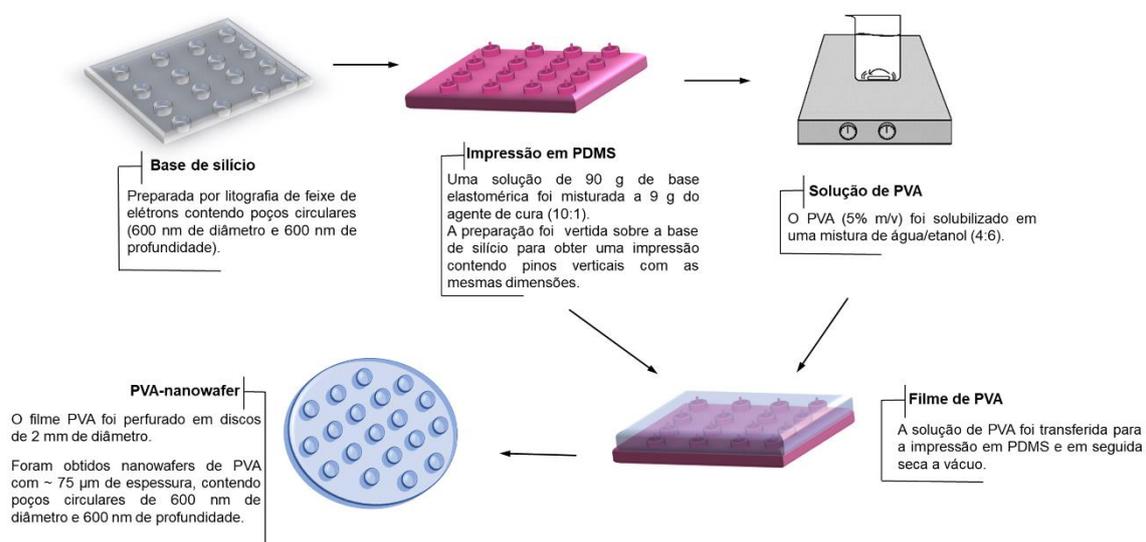
sensível ao elétron. O feixe de elétrons altera a solubilidade desse material, o que permite a remoção de áreas pré-definidas (ALTISSIMO, 2010).

A base de silício foi utilizada para preparar uma impressão de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) contendo pinos verticais com as mesmas dimensões (600 nm de diâmetro e 600 nm de profundidade). O PDMS é um polímero muito utilizado para a fabricação de microdispositivos. Entre as suas principais vantagens, se destacam o fato desse polímero possuir propriedades elastoméricas, biocompatibilidade e fácil moldagem (DUFFY *et al.*, 1998; MCDONALD; WHITESIDES, 2002).

Para a fabricação da impressão de PDMS, 90 g de base elastomérica foram misturadas com 9 g do agente de cura (10:1). A mistura foi vertida sobre o molde de silício e curada a 80 °C por 10 hs em um forno. No final deste período, a impressão do PDMS foi cuidadosamente removida da base de silício.

Para o preparo do nanowafer de PVA, inicialmente o polímero foi solubilizado em uma mistura de água/etanol (4:6) em uma concentração de 5% (m/v). Em seguida, a solução foi transferida com uma pipeta para a impressão de PDMS e depois seca a vácuo em temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente (**Figura 40**).

Figura 40 – Etapas de preparo do nanowafer



Legenda: Um molde de silício, produzido por litografia de feixe de elétrons, foi utilizado para preparar uma impressão de PDMS contendo postes circulares verticais. A solução de PVA 5% (m/v) foi preparada e transferida para a impressão do PDMS e os nanowafers foram obtidos. PDMS: poli(dimetilsiloxano); PVA: poli (álcool vinílico).

No final do processo, um filme de PVA com aproximadamente 75 µm de espessura, contendo poços circulares de 600 nm de diâmetro e 600 nm de profundidade, foi obtido.

Este filme foi perfurado em discos circulares de 2 mm com um perfurador de papel. Nanowafers de PVA com 2 mm de diâmetro foram utilizados para os estudos subsequentes.

2.3.2 Análise morfológica

2.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A ultra morfologia dos moldes de silício e PDMS foram avaliadas através da análise da superfície dos materiais em um microscópio eletrônico de varredura, a 3kV, disponível no LCPNano. As amostras foram fixadas em suporte metálico e em seguida submetidas à metalização, esta que foi realizada pela técnica de pulverização (no inglês denominada *sputtering*) em um metalizador.

2.3.2.2 Microscopia óptica

As microfotografias dos nanowafers foram avaliadas usando microscopia óptica. As imagens foram obtidas por meio de uma câmera acoplada ao microscópio, utilizando uma lente objetiva com ampliação de 40x.

2.3.3 Avaliação do pH da superfície

Nanowafers de PVA foram submersos em água destilada a 37°C por 30 min; em seguida, o pH superficial foi medido por meio de um pHmetro digital e colocado sobre a superfície do nanowafers. As medidas foram realizadas em triplicata (MAHAJAN; DESHMUKH, 2015).

2.3.4 Análise de intumescência do nanowafers

Os nanowafers de PVA foram pesados e colocadas em placas de Petri contendo 2 mL de tampão PBS, pH 7,4 a 25 ± 1 °C. Após intervalos de tempo pré-definidos (5, 10, 15 ou 20 min), as amostras foram removidas e a superfície foi seca com papel absorvente, momento em que a massa dos filmes atingiu um valor constante (MA *et al.*, 2019). Seis amostras foram utilizadas para cada intervalo de tempo. O grau de intumescimento (GI) foi determinado medindo o peso das amostras antes e após a secagem, utilizando a equação 4:

$$GI(\%) = \frac{(M_u - M_s)}{M_u} \times 100 \quad (4)$$

Onde: M_u (g) é a massa do filme úmido e M_s (g) é a massa do filme seco.

2.3.5 Estudos de liberação *in vivo*

A fim de se comparar a velocidade de liberação de fármacos do nanowafer com a dos colírios, foi realizado um teste utilizando nanowafers carregados com fluoresceína, um composto orgânico de baixa massa molecular, hidrossolúvel e altamente fotoluminescente (FERREIRA *et al.*, 2015). Esse corante, quando estimulado pela luz em comprimento de onda entre 465 – 490 nm (correspondente a luz azul), absorve energia luminosa e imediatamente reemite (fluoresce) a um comprimento de onda superior, entre 520 – 530 nm, que corresponde a luz verde. Desta forma, após a aplicação tópica do fluoresceína, utiliza-se a lâmpada de fenda com o feixe de luz difusa e o filtro azul-cobalto, o que permite a passagem apenas da luz azul contida no flash de luz branca, facilitando a visualização do corante sobre a superfície ocular (CBO, 2016).

Os nanowafers foram preparados conforme descrito anteriormente (seção 2.3.1) e preenchidos com 1 µL de uma solução de fluoresceína. Essa solução foi preparada adicionando 1 µL do corante a 1% (m/v) a 9 µL uma solução de PVA, semelhante à utilizada para o preparo dos nanowafers (5% de PVA em uma mistura de água/etanol 4:6). A solução foi cuidadosamente espalhada sobre o nanowafer e a preparação foi mantida sob vácuo, em temperatura ambiente e protegidos da luz, até a completa evaporação do solvente (cerca de 10 min). Além disso, foi preparado um colírio de fluoresceína, com a mesma quantidade utilizada no preparo do nanowafer. Assim, 1 µL de fluoresceína a 1% (m/v) foi adicionado a 9 µL de solução salina estéril e 1 µL dessa solução adicionada a 19 µL de solução salina. Esse preparo foi mantido à temperatura ambiente e protegido da luz. Todas as soluções contendo fluoresceína foram preparadas previamente ao uso.

A fim de se avaliar a liberação de fluoresceína, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal e os olhos esquerdos anestesiados, conforme descrito na seção 2.4.4.1 – *Parte I*. O nanowafer preparado com fluoresceína foi colocado, cuidadosamente, com o lado que contém os poços, sobre a superfície ocular, de modo que a fluoresceína possa difundir diretamente sobre os tecidos oculares (grupo nanowafer, n = 3). Em um segundo grupo, 20 µL da solução contendo fluoresceína foram instilados sobre a superfície dos olhos esquerdos (grupo do colírio, n = 3).

Após 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min e 180 min, a superfície dos olhos foi exposta utilizando uma lâmpada de fenda acoplada a uma câmera digital, ao flash de luz com o filtro azul de cobalto e obteve-se as fotografias. Quando necessário, uma dose anestésica de manutenção foi administrada nos animais ($\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ da dose inicial).

2.3.6 Avaliação da redução da PIO

Semelhante ao que foi descrito para o teste anterior, para preencher os poços no nanowafer de PVA, PnPP-19 foi adicionado em uma solução de PVA (5% de PVA em uma mistura de água/etanol 4:6). Em cada disco circular, foi adicionada uma quantidade de 80 µg de PnPP-19 e, após o preenchimento dos nanowafers, esses foram secos a vácuo em temperatura ambiente, para completa evaporação do solvente. Para fins de comparação, também foram produzidos nanowafers preenchidos apenas com a solução de PVA. Além disso, foi obtido um colírio com 80 µg de PnPP-19 a cada 20 µL.

Para o monitoramento da PIO, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, com oito animais cada. Os olhos foram anestesiados topicamente (conforme descrito anteriormente na seção 2.4.4.1 – *Parte I*) e uma formulação foi atribuída a cada grupo:

I - Nanowafer preenchido com solução de PVA (controle);

II - Colírio contendo 80 µg de PnPP-19 (PnPP-19 colírio);

III - Nanowafer preenchido com 80 µg de PnPP-19 (PnPP-19 nanowafer);

Todas as preparações foram administradas nos olhos esquerdos, como descrito na seção anterior.

A PIO foi medida, imediatamente antes e após 1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 24h, conforme descrito na seção 2.4.5.2 – *Parte II*.

2.3.7 Estudo da atividade neuroprotetora

2.4.7.1 Aplicação tópica

Para avaliar a atividade neuroprotetora do nanowafer frente ao colírio, utilizou-se o modelo de degeneração da retina induzido por isquemia, descrito na seção 2.4.7.2 – *Parte II*.

Para a realização do estudo, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos contendo seis animais cada. O primeiro grupo, denominado veículo, recebeu uma gota do colírio de solução salina 0,9% (m/v). O segundo grupo recebeu uma gota do colírio de PnPP-19 (equivalente a 80 µg/olho). O terceiro grupo recebeu um nanowafer contendo PnPP-19, preparado conforme descrito na seção 2.3.6. As formulações foram aplicadas uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos, antes da isquemia. O quarto grupo, denominado saudável, recebeu uma gota do colírio de solução salina 0,9% (m/v) durante o mesmo período e não foi exposto ao processo isquêmico.

Posteriormente a indução da isquemia, a função eletrofisiológica da retina foi avaliada por meio do ERG após 1 e 7 dias, seguindo o mesmo protocolo descrito na seção 2.4.4.2 – *Parte I*. Ao final do último ERG, os animais foram sacrificados e os olhos enucleados para análise histológica conforme descrito na seção 2.4.4.4 – *Parte I*.

2.3.8 Estudo de permeação *in vivo*

Para o estudo de permeação *in vivo*, os nanowafers foram preenchidos de forma semelhante ao descrito em seção anterior (2.3.6). No entanto, nesse momento aqui o PnPP-19 utilizado foi previamente conjugado com FITC. Também foi preparado um colírio contendo 80 µg/gota (20 µL) do peptídeo conjugado com FITC em salina estéril. Um terceiro grupo que recebeu o mesmo volume de um colírio (solução salina) sem peptídeo foi utilizado como controle.

Neste ensaio, foram utilizados 21 animais, aleatoriamente alocados em três grupos. O primeiro grupo foi denominado PnPP-19 colírio (n = 9) recebeu uma gota (20 µL) do PnPP-19 conjugado com FITC. O segundo grupo recebeu o mesmo volume de um colírio contendo apenas a solução salina estéril e foi denominado controle (n = 3). O terceiro grupo recebeu o nanowafers contendo o PnPP-19 conjugado com FITC (n = 9). As formulações foram aplicadas ambiente escuro sob luz de LED vermelha.

Após 1 h, 4 hs ou 24 hs, 3 animais de cada grupo que recebeu o peptídeo conjugado foram sacrificados e, ao final das 24 hs, os animais do grupo controle também foram eutanasiados para comparação. Os olhos foram coletados e preparados conforme descrito na seção 2.4.4.4 – *Parte I*.

Após confecção dos blocos de parafina, foram obtidos cortes com 5 µm de espessura utilizando um micrótomo. Esses cortes foram adicionados a lâminas e não foi realizada a técnica de coloração. As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal com uma objetiva de 20 x. O FITC foi excitado em 490 nm com emissão em 526 nm. A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando o software ImageJ® (versão 1.50i - National Institutes of Health, EUA), conforme descrito na seção 2.4.4 – *Parte II*.

2.4 Análise estatística

Para todas as análises, foram determinados os valores de médias ± DP para o número de experimentos independentes indicado para cada ensaio. Em todos os testes adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$.

Para avaliar a normalidade do padrão das curvas ERG, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk seguido de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

Para calcular a diferença entre amplitudes, tempos implícitos das ondas a e b, PIO e fluorescência utilizou-se ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

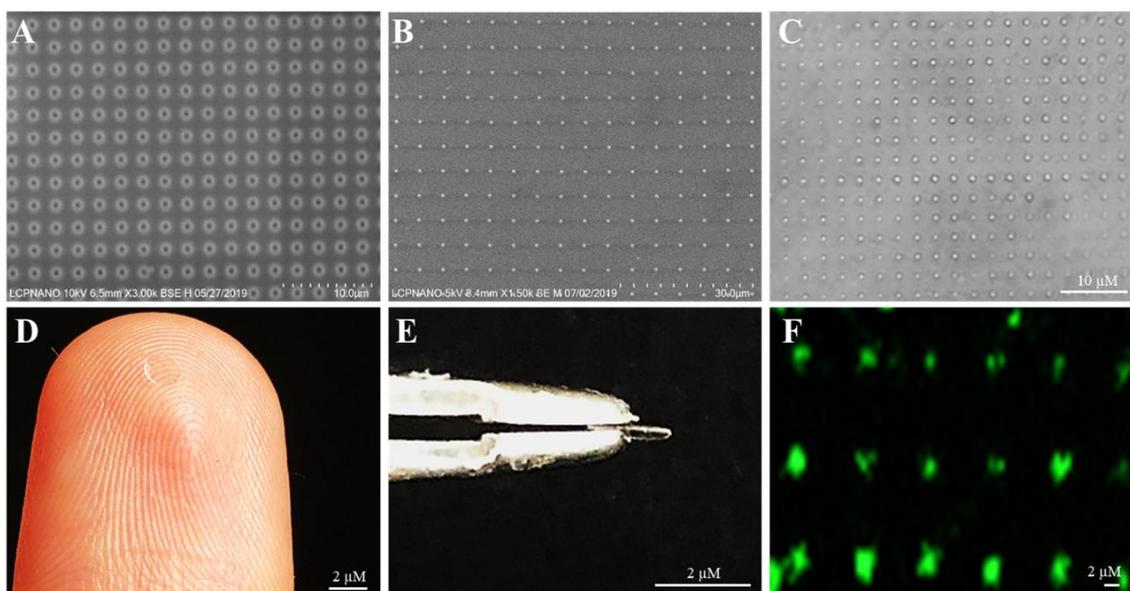
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism® versão 8.4.2.

3 RESULTADOS

3.1 Análise da morfologia

A MEV revelou que a litografia de feixe de elétrons foi capaz de produzir poços circulares na base de silício (**Figura 41A**). De maneira semelhante, a morfologia da impressão de PDMS apresentou postes verticais correspondentes aos poços da base de silício (**Figura 41B**), o que possibilitou a utilização desse molde nas etapas seguintes.

Figura 41 – Análise morfológica dos moldes de silício, PDMS e do nanowafer de PVA



Legenda: A) molde de silício contendo poços circulares, B) impressão em PDMS contendo colunas verticais, C) imagem dos nanorreservatórios presentes no filme de PVA, D) nanowafer na ponta do dedo para destacar o tamanho e transparência, E) nanowafer na ponta da pinça para mostrar a espessura e F) nanowafer preenchido com fluoresceína para destacar os reservatórios em escala nanométrica.

A solução de PVA, quando colocada no modelo PDMS, produziu um filme de PVA contendo reservatórios com tamanho similar aos poços da base de silício, que foram observados por microscopia óptica (**Figura 41C**). Além disso, os nanowafers obtidos apresentaram uma estrutura transparente (**Figura 41D**), flexível e fina (**Figura 41E**). Na

Figura 41F, quando os poços foram preenchidos com fluoresceína, observou-se a capacidade desses dispositivos atuarem como um sistema reservatório para liberação de fármacos.

Em trabalho realizado por Yuan e colaboradores (2015), os autores desenvolveram nanowafers a partir de diferentes polímeros, entre esses o PVA. Os resultados apresentados nesse estudo destacam que o nanowafer de PVA, diferente dos demais, não estimulou a expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, o que indica que esses dispositivos são bem tolerados pela superfície ocular.

Outro resultado do trabalho de Yuan e colaboradores indicou que os nanowafers produzidos a partir do PVA foram responsáveis por uma maior eficácia em comparação ao tratamento com uso do colírio. Os autores atribuem esse resultado a um aumento do tempo de residência do medicamento na superfície ocular que, posteriormente, se difundiu para os tecidos oculares e exerceu uma melhora na ação terapêutica. Os nanowafers obtidos em nosso trabalho possuem características morfológicas semelhantes ao estudo citado, assim estes dispositivos foram utilizados nas etapas seguintes.

3.2 Avaliação do pH de superfície

O pH ideal para uma formulação destinada aplicação oftálmica deve ser próxima a 7,4, valor do pH da lágrima. Nessas formulações, frequentemente utiliza-se um sistema tampão, que ajuda a aproximar o pH da formulação ao da lágrima. Um pH mais ácido ou alcalino pode causar irritação ocular e estimular a produção lacrimal, o que imediatamente dilui a formulação aplicada e afeta a absorção do fármaco (MA *et al.*, 2020). O valor de pH obtido para o nanowafer foi de 6,5, o que atende aos requisitos das formulações oftálmicas destinadas à aplicação tópica (BRASIL, 2012).

3.3 Perfil de intumescimento do nanowafer de PVA

O PVA é um polímero de origem sintética, produzido a partir do monômero de acetato de vinila em um processo composto por várias etapas. Este polímero é um dos únicos polímeros vinílicos solúveis em água, característica relacionada ao seu grau de hidrólise e massa molar (MANSUR *et al.*, 2008; MARIO GUIMARÃES JUNIOR, 2015).

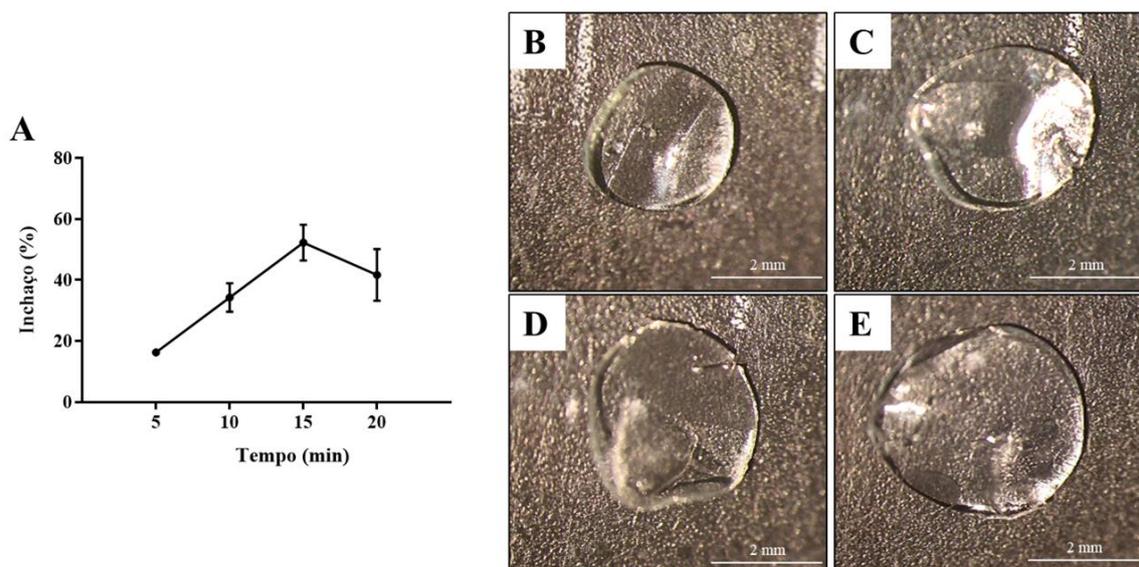
Em razão da sua natureza atóxica, o PVA é empregado há muitos anos em embalagens de alimentos e dispositivos médicos (DEMERLIS; SCHONEKER, 2003). Além disso, devido a sua alta biodegradabilidade, o PVA é frequentemente utilizado na produção de filmes hidrofílicos para melhorar a entrega de fármacos (SINGH, 2012; WANG, *et al.*, 2010). Nos últimos anos, a bioadesividade do PVA tem sido largamente explorada no

desenvolvimento de dispositivos para a liberação transdérmica de fármacos (GUO, *et al.*, 2011; VECCHI; DOS SANTOS; BRUSCHI, 2020).

Nesse contexto, quando um polímero ou dispositivo polimérico com características bioadesivas entra em contato com uma mucosa, ocorre a transferência de água da camada de muco para o polímero, resultando no intumescimento do material. Nessa fase, as cadeias poliméricas adquirem maior mobilidade e se ligam às cadeias glicoproteicas do muco, resultando em uma adesão (EQUANI *et al.*, 2001). Esse intumescimento do polímero afeta diretamente a liberação do fármaco (ALANAZI *et al.*, 2007). Portanto, a avaliação desse parâmetro é de extrema relevância não só para avaliar a capacidade bioadesiva da matriz polimérica, como também para estimar a velocidade de liberação do fármaco (VARUM *et al.*, 2008).

Em nosso estudo foi calculado o GI do nanowafer de PVA em relação ao tempo (**Figura 42A**).

Figura 42 – Avaliação do grau de intumescimento dos nanowafers de PVA



Legenda: A) Intumescimento em relação ao tempo, B) nanowafer após 5 min, C) nanowafer após 10 min, D) nanowafer após 15 min, E) nanowafer após 20 min. Seis amostras foram utilizadas para cada intervalo de tempo. Todos os testes foram realizados em meio PBS de pH 7,4 a 25 ± 1 °C.

Com base em nossos dados, observou-se que o intumescimento dos dispositivos ocorreu gradualmente (após 5 min: $16,3 \pm 2,9\%$; após 10 min: $34,3 \pm 11,6\%$, **Figuras 42B e 42C**, respectivamente) até 15 min, quando o grau de inchaço passa a ser

constante (após 15 min: $52,3 \pm 14,43$, após 20 min: $41,6 \pm 20,9\%$, **Figuras 42D e 42E**, respectivamente).

Os polímeros hidrofílicos podem apresentar diferentes graus de intumescimento. Quanto maior o número e a força das ligações de hidrogênio entre as cadeias de polímero, mais lenta é a difusão de moléculas de água na matriz polimérica e, conseqüentemente, menor é o grau de intumescência (ABURAHMA; MAHMOUD, 2011).

Em estudo realizado por Pawar; khurana; arora (2012), os autores observaram que filmes que continham concentrações maiores de PVA foram responsáveis por uma grande absorção de umidade. Um outro estudo realizado por Mohammadi *et al* (2019), revelou que a adição de PVA acarretou em um maior índice de intumescência. Esses trabalhos corroboram com os nossos resultados, que apontam um aumento rápido no percentual de intumescimento para os nanowafers de PVA.

Outro aspecto importante é que a absorção de umidade promovida pelos dispositivos pode afetar a integridade deles (SHINDE; GARALA; MORE, 2008). Em nosso estudo, observamos que a intumescência foi acompanhada por um aumento no tamanho do nanowafers, porém os dispositivos mantiveram a sua integridade, embora tenha sido utilizado um volume de meio maior do que o fluido lacrimal. Com base nessa observação, podemos inferir que o nanowafers foi capaz de aderir à superfície ocular e a intumescência não deformou os dispositivos, entretanto, testes *in vivo* são necessários para garantir esse comportamento.

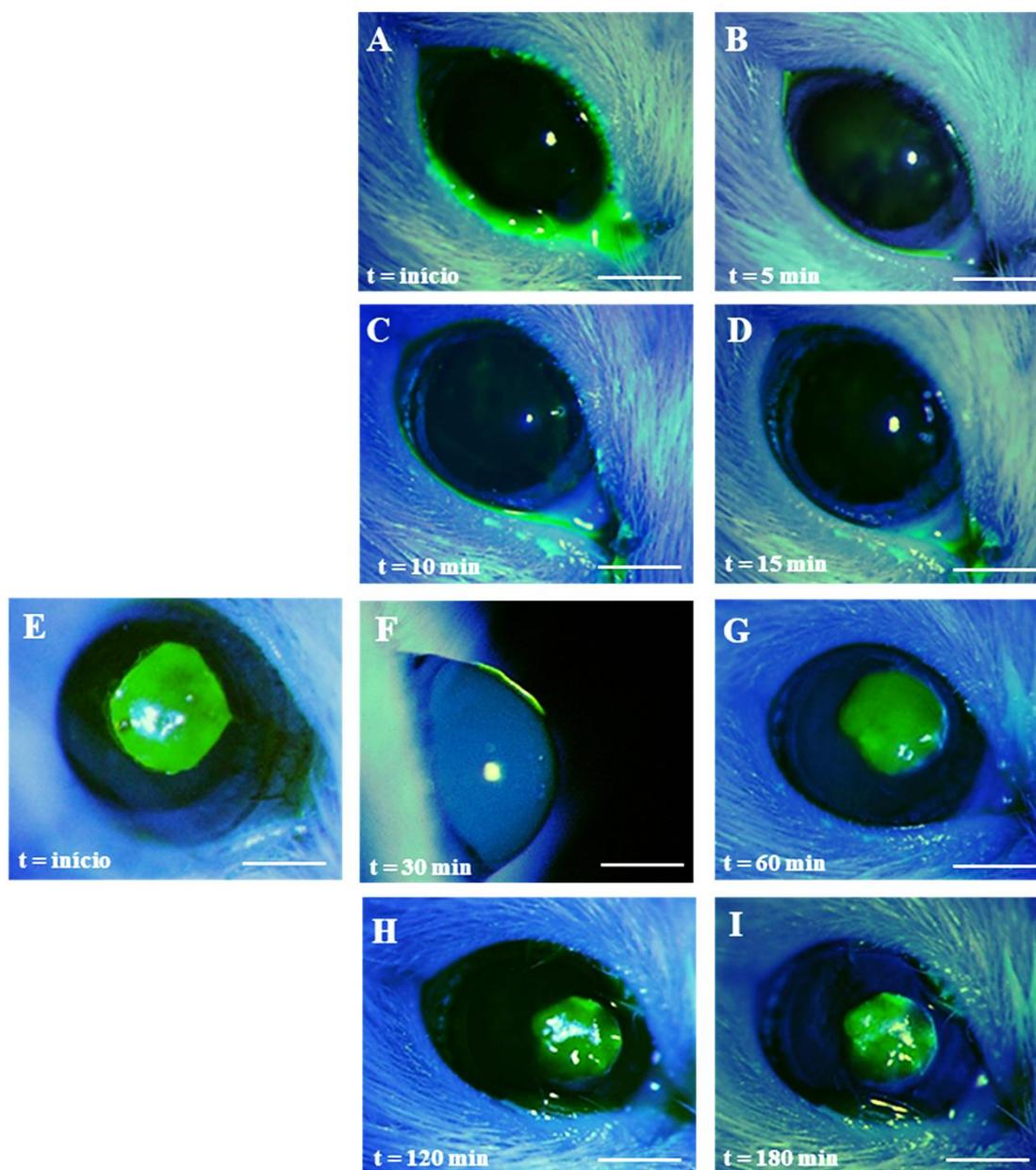
3.4 Avaliação do tempo de residência do nanowafers na superfície ocular

A fim de avaliar o tempo de permanência do nanowafers na câmara anterior e a sua capacidade de promover a liberação sustentada do fármaco, o dispositivo preenchido com fluoresceína, um corante fluorescente verde (MM = 332 g/mol), foi aplicado sobre a superfície ocular e a fluorescência observada ao longo do tempo foi comparada à de um colírio contendo a mesma dose de fluoresceína.

Com base nas imagens obtidas, foi possível observar que, após aplicação de fluoresceína todo o filme lacrimal é corado e logo nos primeiros minutos, há uma rápida eliminação do colírio. Após 15 min, notou-se uma expressiva redução da fluorescência, o que reafirma o tempo curto de residência de fármacos na superfície ocular (**Figura 43A – 43D**). Por outro lado, nos olhos que receberam o nanowafers, notou-se o dispositivo aderido à superfície ocular (**Figuras 43E e 43F**) e ele ainda foi capaz de manter uma alta intensidade de fluorescência por mais de 180 min (**Figuras 43G – 43I**).

Com isso, concluiu-se que o nanowafers promoveu a liberação controlada de fluoresceína.

Figura 43 – Estimativa do tempo de residência da fluoresceína a partir do nanowafers de PVA em comparação ao colírio



Legenda: Imagens do tempo de residência em olhos de rato para colírio de fluoresceína no início A) e após B) 5 min, C) 10 min e D) 15 min. E) Imagem do nanowafers carregado com fluoresceína no início e após F) 30 min, aderido à superfície ocular do rato, G) 60 min, H) 120 min e I) 180 min.

Estudos anteriores envolvendo o desenvolvimento de nanowafers também descreveram um aumento no tempo de permanência da fluoresceína quando comparado a colírios. A

liberação contínua e mais estável promovida por esse dispositivo aparenta ser mais eficaz frente aos tratamentos convencionais, além de possibilitar uma redução no número de administrações diárias (COURSEY *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2015).

A revisão da literatura indica que os estudos que empregaram a aplicação de nanofafers em doenças oftálmicas são restritos a doenças que acometem o segmento anterior do olho, como cistinose (MARCANO *et al.*, 2016), doença do olho seco (COURSEY *et al.*, 2015) e neovascularização da córnea (YUAN *et al.*, 2015). Além disso, não encontramos nenhum trabalho que utilize essa forma farmacêutica para a veiculação de peptídeos.

3.5 Eficácia *in vivo* do nanowafer de PVA contendo PnPP-19

Tendo em vista os resultados obtidos na parte II deste trabalho, optou-se por avaliar a eficácia do nanowafer em promover uma melhora na biodisponibilidade do peptídeo PnPP-19. Para isso, investigou-se, inicialmente, a redução na PIO em olhos de ratos normotensos e, posteriormente, a neuroproteção promovida por esse dispositivo. Em ambos os testes, a eficácia do dispositivo foi comparada a de um colírio contendo a mesma dose de peptídeo.

3.5.1 Avaliação da PIO

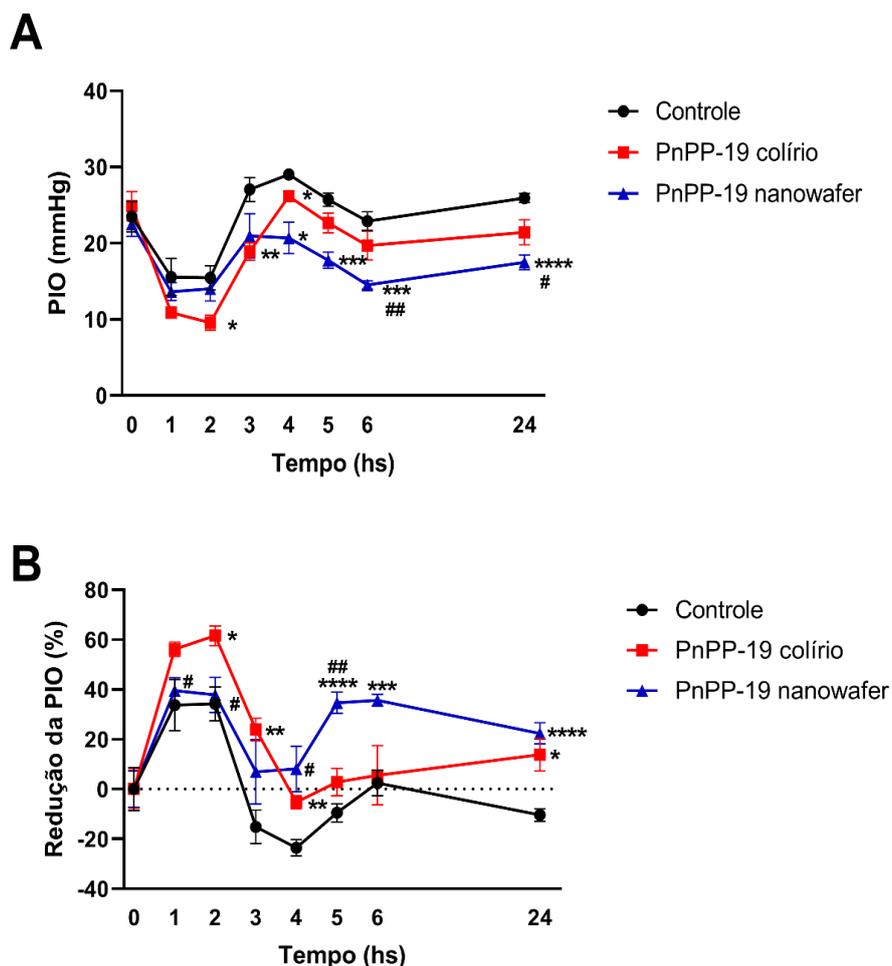
O nanowafer preparado contendo 80 µg/olho do PnPP-19 foi aplicado sobre a superfície ocular e a PIO foram utilizadas como parâmetro para estimar a permeação de PnPP-19, em comparação ao grupo que recebeu o colírio contendo a mesma dose de peptídeo.

O grupo PnPP-19 colírio apresentou uma redução estatística da PIO, 2 hs após a instilação, efeito que permanece até 4 hs após a instilação (2 hs: $p = 0,0224$; 3 hs: $p = 0,0030$; 4 hs: $p = 0,0340$). Após esse período, embora não tenha sido observada uma diferença estatística, essa tendência se manteve (5 hs: $p = 0,1791$; 6 hs: $p = 0,3704$; 24 hs: $p = 0,0678$). Além disso, quando se analisou-se a redução da PIO (%), foi observada uma redução estatística após as 24 hs ($p = 0,0176$). Esse resultado corrobora com a redução verificada para o peptídeo na parte II deste trabalho.

O grupo que recebeu o nanowafer preenchido com PnPP-19 apresentou uma redução estatística da PIO 4 hs após a aplicação ($p = 0,0110$) e este efeito se manteve durante todo o período do estudo (após 5 hs: $p = 0,0001$; após 6 hs: $p = 0,0003$ e após 24 hs: $p < 0,0001$). Ao se comparar os grupos que receberam o peptídeo (colírio ou nanowafer) observou-se que ambos promoveram uma redução da PIO estatisticamente semelhante primeiras 5 hs. Após esse período, a redução da PIO promovida pelo nanowafer foi mais intensa (**Figura 44A**).

Em relação à diminuição da PIO (%), observou-se que o colírio foi responsável por valores de redução da PIO mais expressiva, porém esse efeito é minimizado após algumas horas. No grupo PnPP-19 nanowafer, a redução da PIO foi menos intensa; entretanto, o efeito hipotensivo foi mais duradouro (**Figura 44B**).

Figura 44 – Análise da eficácia do nanowafer contendo PnPP-19 na redução da PIO



Legenda: A) níveis de PIO do grupo controle, colírio contendo PnPP-19 e o nanowafer carregado com PnPP-19. B) diminuição da PIO do grupo controle, colírio contendo PnPP-19 e o nanowafer carregado com PnPP-19. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni ($n = 8$ olhos/grupo). Os dados são representados pela média \pm DP *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). #Indica uma diferença estatística em relação ao grupo PnPP-19 colírio (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

A PIO é determinada pelo equilíbrio entre as taxas de produção e de drenagem do humor aquoso. Desta forma, a mensuração indireta e não-invasiva da PIO pela tonometria é uma ferramenta de extrema importância para a diagnóstico da hipertensão ocular (GUO, LI *et al.*, 2005). Estudos anteriores observaram que o ritmo circadiano

exerce um efeito importante na PIO (LIU, 1998; LOZANO; HARTWICK; TWA, 2015; MOORE; JOHNSON; MORRISON, 1996). O ritmo circadiano é o período no qual se baseia o ciclo biológico do seres vivos e está principalmente relacionado à variação da luz (NOGUEIRA, 2007).

Em ratos submetidos a um ciclo de 12 hs claro e 12 hs escuro, uma curva diária revelou que a PIO média no escuro foi de $31,3 \pm 1,3$ mmHg e, quando o ambiente estava claro, essa PIO era reduzida, apresentando um valor médio de $19,3 \pm 1,9$ mmHg (MOORE; JOHNSON; MORRISON, 1996). Esse valor é próximo a PIO média observada nos animais, no início do nosso estudo ($22,52 \pm 3,75$).

No tratamento do glaucoma, a fim de prevenir ou desacelerar a progressão da doença, os medicamentos são aplicados diariamente pelo resto da vida do paciente, o que pode ocasionar uma baixa adesão ao tratamento. Um estudo realizado por BELHASSEN *et al.* (2016) revelou que no primeiro ano do tratamento, menos da metade dos pacientes com glaucoma crônico continuava administrando colírios diariamente. Além disso, quando a adesão ao tratamento do glaucoma foi comparada a outros seis medicamentos para condições crônicas, os colírios anti-glaucoma foram classificados como o segundo pior, com uma taxa média de adesão de 37% (DIGIUNI; FOGAGNOLO; ROSSETTI, 2012).

Neste contexto, um dispositivo capaz de liberar o fármaco hipotensivo por um tempo superior aos colírios poderia contribuir significativamente para um melhor controle de doenças degenerativas da retina (GOOCH *et al.*, 2012). Com base nos resultados apresentados, o nanowafer seria uma alternativa interessante, uma vez que esse dispositivo foi capaz estender o efeito hipotensivo do PnPP-19 em olhos de ratos normotensos.

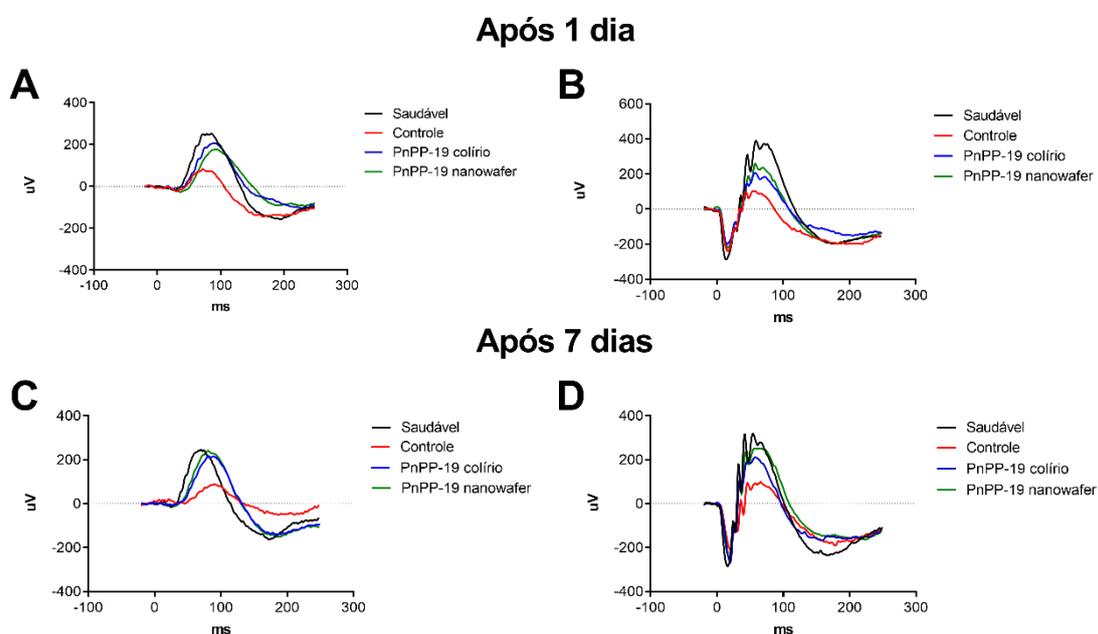
3.5.2 Avaliação do efeito neuroprotetor

A segunda parte do estudo de eficácia do nanowafer teve como objetivo analisar a eficiência desse dispositivo em promover um aumento na proteção da retina de ratos, mediado pelo PnPP-19, durante o processo isquêmico. Logo, foi possível estimar a capacidade deste dispositivo na entrega de fármacos para o segmento posterior.

Após a indução da isquemia, os olhos de animais pré-tratados com o peptídeo, por meio de um colírio (PnPP-19 colírio) ou o nanowafer (PnPP-19 nanowafer), foram comparados a olhos tratados apenas com solução salina (controle). Um quarto grupo que não foi submetido ao processo isquêmico foi utilizado para comparação. Essa avaliação foi realizada por meio de exame eletrorretinográfico e análise histológica.

A análise das curvas do ERG, após 1 (**Figura 45A e 45B**) e 7 dias (**Figura 45C e 45D**), revelou uma maior preservação das ondas a e b escotópica nos olhos que receberam um pré-tratamento contendo PnPP-19, após estímulos luminosos de 0,01 e 3,0 cd.s.m⁻². Este resultado corrobora com os dados na parte II deste trabalho, que destaca o efeito neuroprotetor do pré-tratamento com o PnPP-19 no processo isquêmico. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os olhos dos animais que receberam o pré-tratamento na forma de colírio e aqueles que receberam por meio do nanowafer.

Figura 45 – Curvas do ERG em condição escotópica de olhos pré-tratados com veículo ou PnPP-19 (80 µg/olho) por meio de colírio ou nanowafer e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida pela isquemia, após estímulos luminosos 0,01 cd.s.m⁻² e 3,0 cd.s.m⁻²

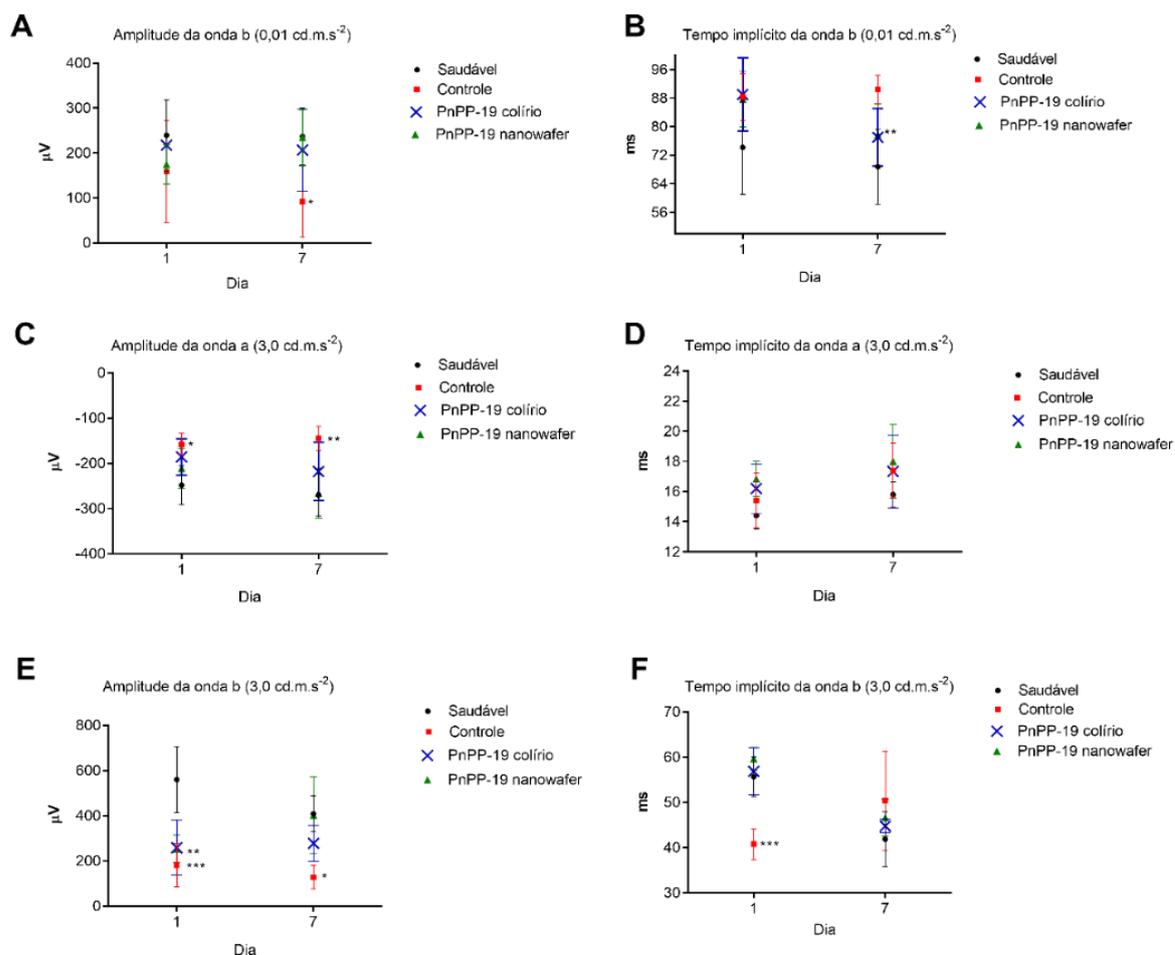


Legenda: Respostas aos estímulos luminosos de: A) 0,01 cd.s.m⁻² e B) 3,0 cd.s.m⁻² após 1 dia da indução da isquemia. Respostas aos estímulos luminosos de: C) 0,01 cd.s.m⁻² e D) 3,0 cd.s.m⁻² após 7 dias da indução da isquemia. O padrão das curvas do ERG foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, sucedido por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (n = 6).

Sabe-se que o processo isquêmico é responsável por promover alterações funcionais em retina de ratos, o que no ERG é observado pela redução da amplitude das onda e tempos implícitos mais longos (OSBORNE *et al.*, 2004). A **Figura 46** traz as amplitudes e tempos implícitos correspondentes às ondas a e b nos estímulos analisados acima.

De maneira geral, os resultados apontam maior preservação destes indicadores nos animais pré-tratados com o peptídeo.

Figura 46 – Médias \pm DP da amplitude e tempo implícito das curvas a e b na condição escotópica de olhos pré-tratados com veículo ou PnPP-19 (80 μ g/olho) por meio de colírio ou nanowafer e expostos ao modelo de degeneração da retina induzida por isquemia, após estímulos luminosos de 0,01 cd.s.m^{-2} e 3,0 cd.s.m^{-2}



Legenda: A) amplitude da onda b em resposta ao estímulo luminoso de 0,01 cd.m.s^{-2} . B) tempo implícito da b em resposta ao estímulo luminoso de 0,01 cd.m.s^{-2} . C) amplitude da onda a em resposta ao estímulo luminoso de 3,0 cd.m.s^{-2} . D) tempo implícito da onda a em resposta ao estímulo luminoso de 3,0 cd.m.s^{-2} . E) amplitude da onda b em resposta ao estímulo luminoso de 3,0 cd.m.s^{-2} . F) tempo implícito da onda b em resposta ao estímulo luminoso de 3,0 cd.m.s^{-2} . A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni ($n = 6$). *Indica uma diferença com um valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo saudável. **Indica uma diferença com um valor

de $p < 0,01$ em relação ao grupo saudável. ***Indica uma diferença com um valor de $p < 0,001$ em relação ao grupo saudável.

No estímulo luminoso de $0,01 \text{ cd.m.s}^{-2}$, observa-se que o grupo controle apresentou uma amplitude da onda b inferior aos demais, embora tenha sido observada uma diferença estatística apenas 7 dias após a indução da isquemia ($p = 0,0394$). Além disso, este grupo apresentou um aumento estatístico no tempo implícito após 7 dias ($p = 0,0074$), evidenciando o dano causado pela isquemia a camada de fotorreceptores. Em contrapartida, os grupos que receberam um pré-tratamento contendo o PnPP-19 não apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo saudável, o que reitera o efeito protetor do peptídeo as estas células.

Em relação ao estímulo luminoso de $3,0 \text{ cd.s.m}^{-2}$, algo semelhante foi observado. O grupo controle apresentou uma redução significativa da amplitude da onda a nos períodos analisados em comparação ao grupo saudável, efeito não observado nos demais grupos. Na onda b, a isquemia foi responsável por reduzir a amplitude e aumentar o tempo implícito 1 dia após a isquemia. Nesse mesmo período, os grupos pré-tratados com o peptídeo também apresentaram uma redução significativa da amplitude da onda b (PnPP-19 colírio: $p = 0,014$; PnPP-19 nanowafer: $p = 0,020$); entretanto, esse efeito foi revertido após 7 dias. O tempo implícito referente a essa onda apresentou aumento significativo no grupo controle ($p = 0,003$), em relação ao grupo saudável após 1 dia. Porém, este aumento não foi observado nos demais grupos, reforçando o efeito protetor do PnPP-19.

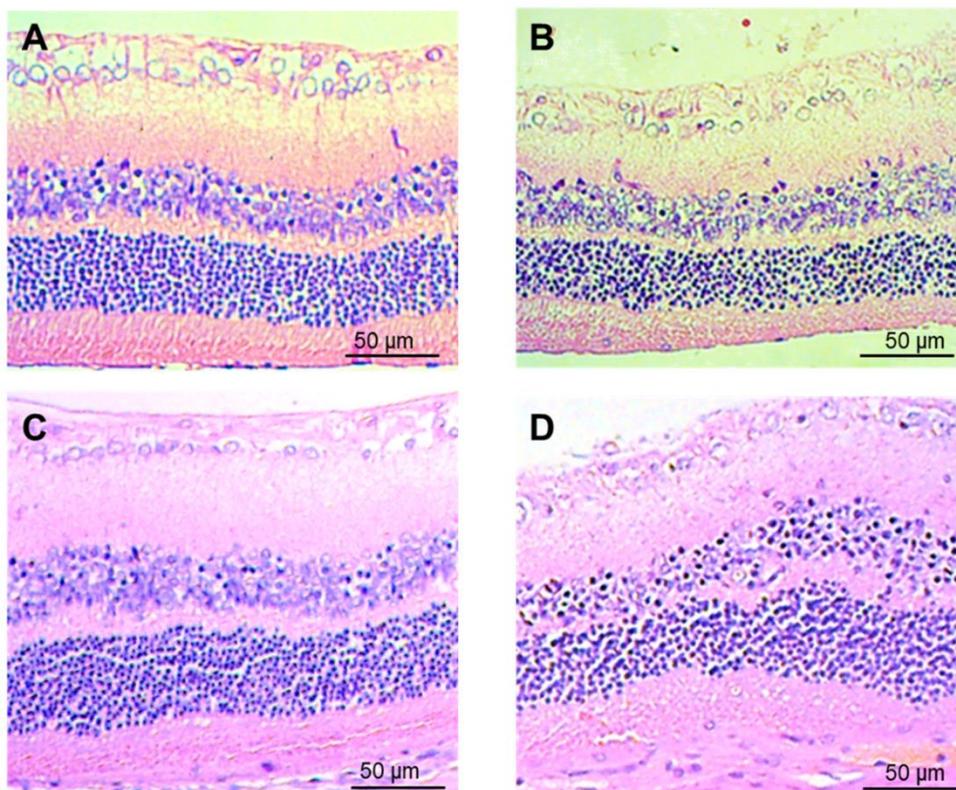
Em síntese, os resultados obtidos pelo exame ERG não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos pré-tratados com o PnPP-19. Assim, concluiu-se que nanowafer conferiu uma proteção à atividade eletrofisiológica da retina semelhante ao colírio.

Na avaliação histológica realizada ao final do estudo foram observadas alterações condizentes com os resultados do ERG. O processo isquêmico foi responsável por causar uma desorganização nas camadas da retina e expressiva perda de células na camada ganglionar (**Figura 47**). O pré-tratamento com o PnPP-19, de maneira semelhante a parte II desse estudo, foi capaz de preservar as camadas da retina. Entretanto, assim como observado nas análises do ERG, não foram observadas diferenças entre os animais tratados com o colírio e o nanowafer.

Conforme discutido anteriormente, diversos fatores dificultam a obtenção de fármacos em doses terapêuticas no segmento posterior. Nesse contexto, a aplicação ocular tópica de fármaco foi considerada durante muito tempo a via de administração ideal para o

tratamento de doenças oculares que afetam o segmento anterior do olho (YELLEPEDDI; PALAKURTHI, 2016).

Figura 47 – Análise histológica 7 dias após indução da isquemia para os grupos pré-tratados com veículo e PnPP-19 (80 µg/olho) por meio de colírio ou nanowafer, comparados a animais saudáveis



Legenda: Fotografias representativas de: A) grupo saudável, B) grupo veículo, C) grupo PnPP-19 colírio e D) grupo PnPP-19 nanowafer. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. Barras = 50 µm.

Embora a escolha da via ocular tópica represente inúmeros desafios, diversos pesquisadores relataram ter alcançado níveis terapêuticos de fármacos no segmento posterior, por meio da administração tópica (BALGURI *et al.*, 2017; SCHOPF *et al.*, 2015; WANG, YANYAN *et al.*, 2020). Dentre as abordagens estudadas, a melhora da biodisponibilidade de fármacos para o segmento posterior por meio de sistemas de liberação controlada tem se destacado (KANG-MIELER; OSSWALD; MIELER, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que, embora dispositivo tenha sido capaz de aprimorar a entrega do peptídeo para o segmento anterior, no estudo da neuroproteção da retina não houve diferença estatística em comparação ao grupo que recebeu o colírio, ou seja, o efeito neuroprotetor exercido pelo PnPP-19 foi similar,

independente da forma de administração. Hipoteticamente essa observação pode ser justificada pela capacidade do peptídeo em atuar nas doenças degenerativas da retina. Isto significa que a quantidade de PnPP-19 que atinge o segmento posterior do olho, por meio do colírio, já seria capaz de exercer a proteção máxima às camadas da retina. Logo, um aumento na biodisponibilidade do peptídeo para o segmento posterior não necessariamente resultaria em uma melhora da neuroproteção. Assim, para uma melhor compreensão desse efeito, fez-se necessário investigar a biodistribuição desse peptídeo nos tecidos oculares promovida pelo nanowafer e compará-la a do colírio.

3.6 Estudo de permeação *in vivo* do PnPP-19 marcado com FITC

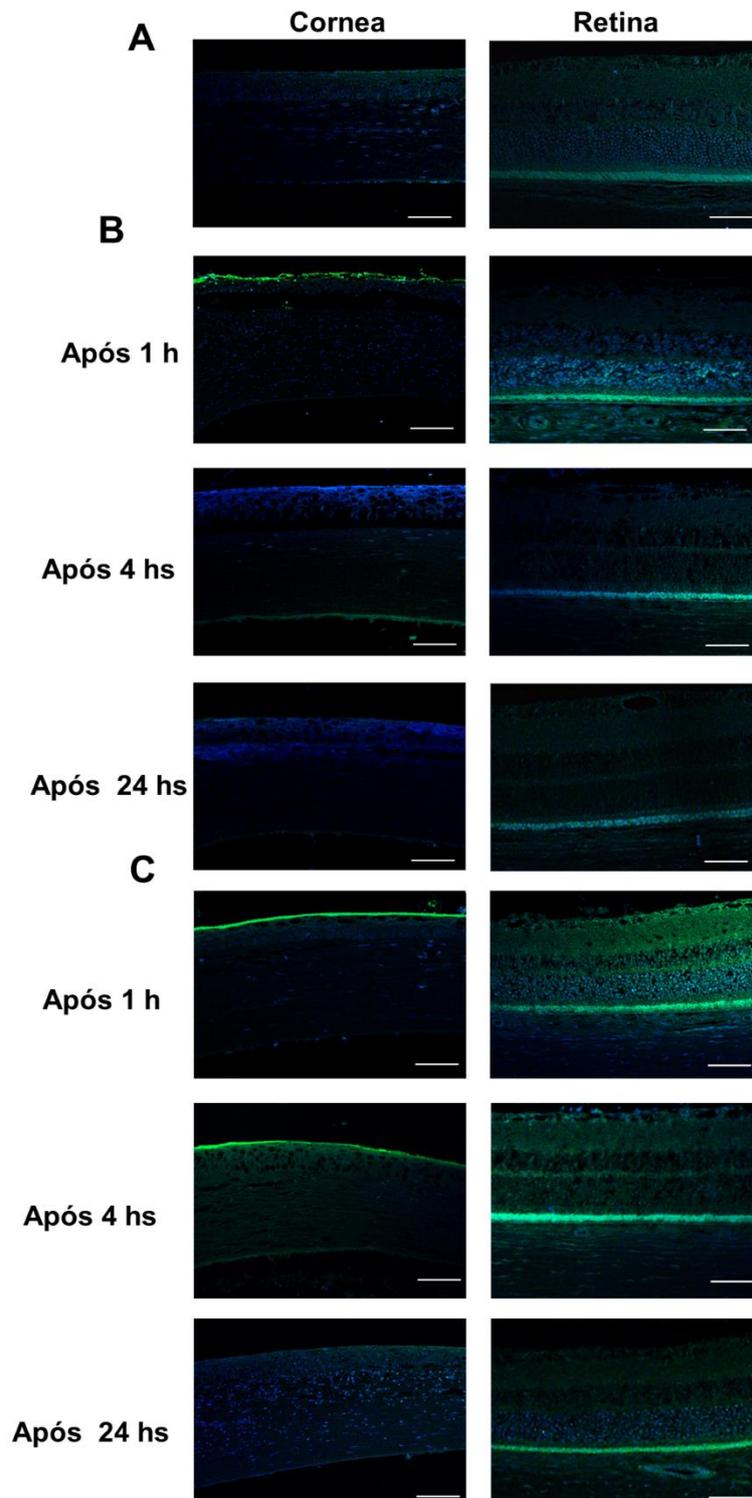
Com objetivo de compreender a permeação do peptídeo para os tecidos oculares, o PnPP-19 marcado com FITC foi administrado por meio de um colírio ou nanowafer contendo a mesma dose (80 µg), e após 1 h, 4 hs ou 24 hs, os animais foram sacrificados e os olhos preparados para observação da distribuição da fluorescência em ambos os segmentos do olho.

Em comparação ao grupo controle, os animais que receberam o peptídeo marcado por meio do colírio apresentavam uma camada fluorescente sobre o epitélio da córnea, após 1h (estatisticamente maior que o grupo controle, $p < 0,0001$). Além disso, também foi observado um aumento da fluorescência na retina ($p = 0,0040$), principalmente nas camadas mais externa como coróide, fotorreceptores e, especialmente, a CNE (**Figura 48B e Figura 49**).

Após o período de 4 hs, a fluorescência da córnea era restrita ao endotélio da córnea, revelando uma eliminação desse peptídeo. Neste mesmo período, foi observada uma redução na fluorescência nas camadas da retina, e após 24 hs, a fluorescência foi reduzida em ambos os segmentos.

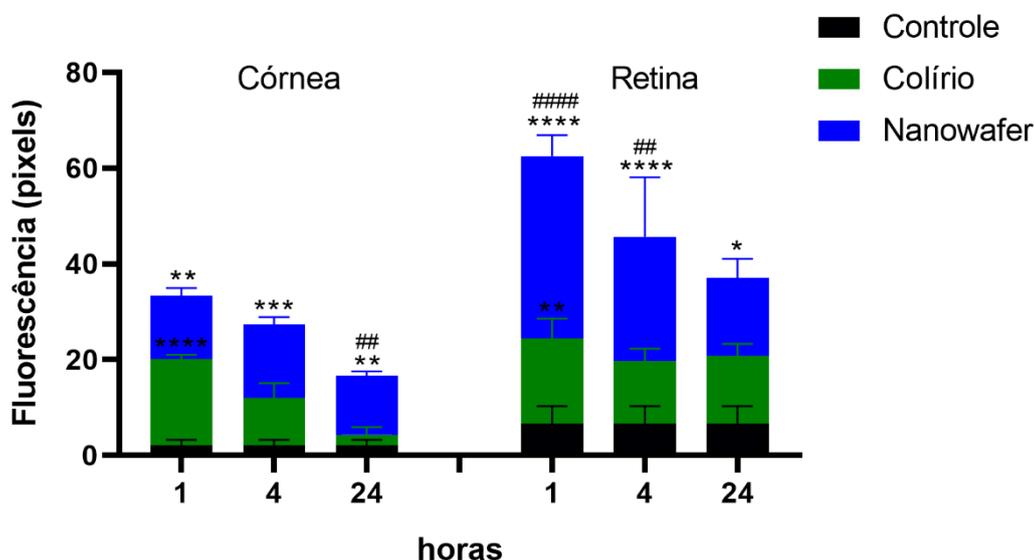
No grupo nanowafer, após o período de 1 h (**Figura 48C**, observou-se um comportamento semelhante ao grupo colírio, em que se nota a formação de um filme fluorescente sobre o epitélio da córnea (estatisticamente maior que o grupo controle, $p = 0,0047$) e um aumento da fluorescência nas camadas da retina (estatisticamente maior que o grupo controle, $p < 0,0001$). Porém, no segundo intervalo de tempo analisado (4 hs), houve a manutenção do filme fluorescente (estatisticamente maior que o grupo controle, $p = 0,0007$), diferentemente do grupo colírio. Além disso, foi possível observar que a fluorescência se estendia por toda a córnea, semelhante ao observado na retina, em que todas as camadas aparentavam um aumento da fluorescência (estatisticamente maior que o grupo controle, $p < 0,0001$).

Figura 48 – Imagens representativas da córnea e retina destacando a fluorescência promovida por PnPP-19 marcado com FITC a partir do colírio ou do nanowafer



Legenda: Avaliação da fluorescência em: A) grupo controle (que não recebeu o peptídeo), B) colírio contendo PnPP-19 marcado com FITC, C) nanowafer preenchido com o PnPP-19 marcado com FITC. Barra de escala = 50 μ m.

Figura 49 – Quantificação da fluorescência referente ao PnPP-19 marcado com FITC na córnea e retina a partir do colírio ou do nanowafer



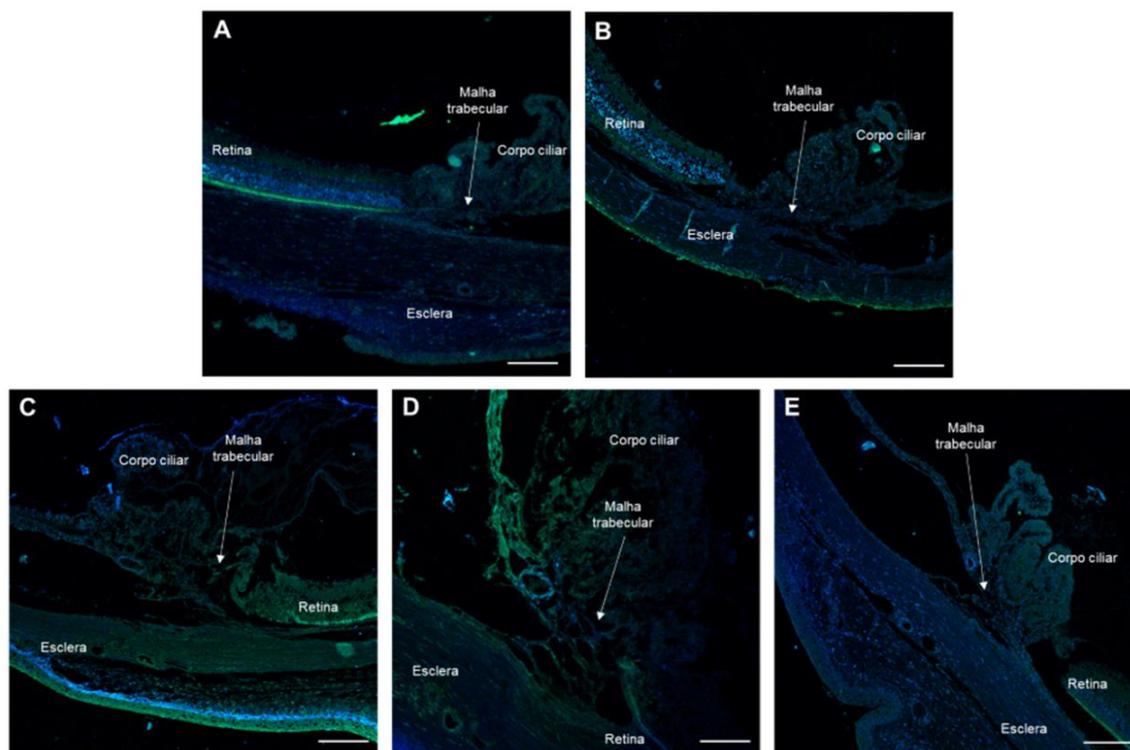
Legenda: A fluorescência promovida por PnPP-19 marcado com FITC nos tecidos oculares. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA de duas vias com pós teste de tukey ($n = 3$). Os dados são representados pela média \pm DP. *Indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). #Indica diferença estatística em relação ao grupo colírio (## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$).

Após período de 24 hs, observou-se que, embora não houvesse a presença do filme fluorescente, a córnea ainda apresentava uma fluorescência (estatisticamente maior que o grupo controle, $p = 0,0089$), assim como nas camadas da retina (estatisticamente maior que o grupo controle, $p = 0,0135$). No entanto, ao analisarmos a região da malha trabecular, notou-se um relaxamento tônus vascular e do trabeculado justacanalicular nas seções histológicas de animais que receberam o PnPP-19, quando comparadas ao grupo controle (**Figura 50A**). No grupo colírio, este relaxamento foi mais significativo após 1 h da instilação, quando se observou um alargamento dessas estruturas. Além disso, é importante ressaltar a fluorescência na parte externa da esclera, revelando a distribuição do peptídeo a partir do colírio (**Figura 50B**).

No grupo nanowafer, imagens representativas destacaram um relaxamento ainda mais expressivo (**Figura 50C – 50E**). Esse efeito foi acentuado após 4 hs, o que corrobora com o resultado anterior, no qual os índices de fluorescência mais intensos neste

período foram observados. Aliado a isso, notou-se uma fluorescência intensa nos tecidos que compõem a malha trabecular após 1 h e 4 hs da aplicação do nanowafer contendo o PnPP-19 marcado com o FITC.

Figura 50 – Imagens representativas da malha trabecular em olho tratados com PnPP-19 marcado com FITC a partir do colírio ou do nanowafer



Legenda: Região da malha trabecular em: A) grupo controle (que não recebeu o peptídeo), B) colírio contendo PnPP-19 marcado com FITC A após 1 h, C) nanowafer preenchido com o PnPP-19 marcado com FITC após 1 h, D) nanowafer preenchido com o PnPP-19 marcado com FITC após 4 hs, E) nanowafer preenchido com o PnPP-19 marcado com FITC após 24 hs. Barra de escala = 50 μ m

O resultado apresentado no parágrafo anterior elucida a hipótese discutida na parte II dessa tese, que discutiu acerca do efeito hipotensivo do PnPP-19. Conforme visto anteriormente, a liberação de NO por meio da ativação de eNOS (encontrada no músculo ciliar e em células do canal de Schlemm) e/ou iNOS (presente na malha trabecular) é responsável por promover um relaxamento do tônus vascular e do trabeculado justacanalicular, e, portanto, reduzir a PIO (CHANG *et al.*, 2015; STAMER *et al.*, 2011; SCHNEEMANN *et al.*, 2003; TSAI, GRAY, & CAVALLERANO, 2017).

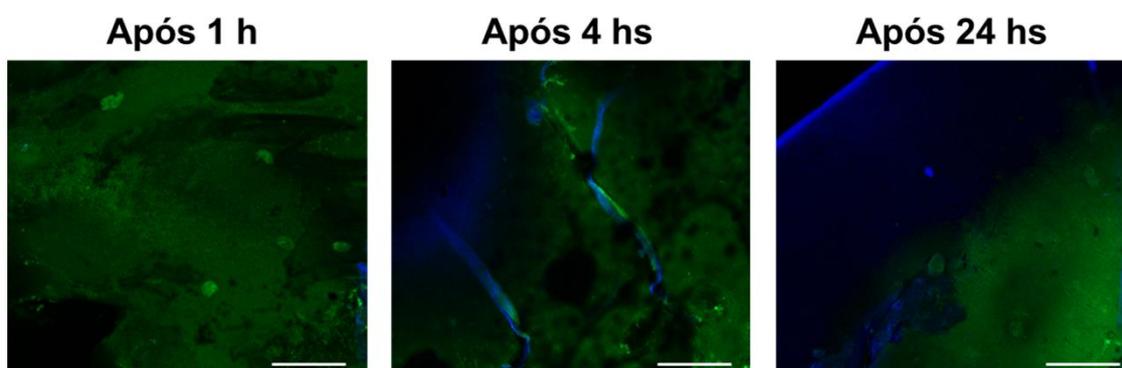
O conjunto de resultados obtidos neste trabalho indicam que o nanowafer foi capaz de promover uma entrega mais eficaz de peptídeo aos tecidos oculares frente ao colírio.

Esse aperfeiçoamento, certamente, teve impacto na melhor manutenção no efeito hipotensivo promovido pelo dispositivo. Em relação à ação neuroprotetora, esse resultado reforça a hipótese de que o colírio já exerce o efeito máximo do PnPP-19 na degeneração da retina promovida por processo isquêmico.

No final do experimento foi possível recuperar os dispositivos inseridos e observar que eles estavam íntegros e, mesmo após 24 hs, uma quantidade expressiva de fluorescência pode ser observada, o que confirma a capacidade do nanowafer de liberar o peptídeo de maneira controlada.

A **Figura 51** traz seções representativas da extremidade dos dispositivos recuperados. Foi possível observar que, após 1 h, dificilmente se vê a base polimérica do nanowafer (em azul), uma vez que a superfície do dispositivo é dominada pela difusão do PnPP-19 marcado com FITC (em verde). Após 4 hs, observou-se na extremidade do dispositivo o polímero (em azul) e, após 24 hs, a base polimérica se tornou mais aparente, estando o peptídeo mais concentrado no centro do dispositivo.

Figura 51 – Fluorescência residual do PnPP-19 marcado com FITC presente no nanowafer após estudo de permeação *in vivo*



Legenda: Imagens representativas de nanowafers preenchidos com o PnPP-19 marcado com FITC após 1h, 4 hs e 24 hs. Barra de escala = 100 μ m

As observações oriundas da análise da **Figura 51** nos permite sugerir que o nanowafer foi capaz de otimizar a liberação do PnPP-19 e, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade do mesmo para os tecidos do segmento posterior do olho. Além disso, após o período analisado (24 hs), foi possível detectar resquícios de fluorescência nos tecidos oculares e no dispositivo recuperado, o que nos faz pensar que a liberação promovida pelo nanowafer se estende por mais de 24 hs.

Em trabalhos anteriores, nos quais se investigou a capacidade do nanowafer de promover uma liberação prolongada de fármacos para a superfície ocular, obteve-se

resultados similares aos apresentados neste estudo. O nanowafer foi capaz de liberar o fármaco por um período médio de 4hs, tempo superior ao do colírio, o que traz inúmeros benefícios para o tratamento de doenças que acometem o segmento anterior do olho (COURSEY *et al.*, 2015; MARCANO *et al.*, 2016). Todavia, pouco se investigou em relação à permeação da substância para o segmento posterior do olho.

Em trabalho desenvolvido por YUAN *et al.* (2015), nanowafers de PVA carregados com doxiciclina — um antibiótico com propriedade fluorescente (verde) — foram produzidos e aplicados sobre a córnea de camundongos. Em seguida, a liberação do fármaco foi monitorada por meio de amostras de lágrimas e por imagem de fluorescência em tempos pré-estabelecidos. Os autores observaram que, mesmo após 4 hs, não foi possível detectar a doxiciclina em amostras de lágrimas. Entretanto, as imagens de fluorescência indicavam a presença intravítrea do fármaco após 24 hs, tempo superior se comparado a um grupo que recebeu o colírio contendo o fármaco, o qual não exibiu fluorescência minutos após a aplicação.

Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que foi detectada a fluorescência referente ao PnPP-19, marcado com FITC, após 24 hs de sua administração. Dessa forma, o estudo demonstra claramente a capacidade do nanowafer de liberar o peptídeo por um período prolongado, aumentando assim o tempo de residência pré-corneal e a subsequente difusão do peptídeo para os demais tecidos oculares. Esse resultado representa um avanço significativo na entrega de fármacos para o segmento posterior a partir desses dispositivos.

4 CONCLUSÃO

Embora avanços significantes tenham sido realizados na terapia de doenças oculares degenerativas, os desafios são numerosos. Dentre eles, as barreiras oculares representam uma grande limitação para que os fármacos atinjam os tecidos oculares em doses terapêuticas.

Nesse cenário, essa parte da tese investigou a capacidade de um sistema reservatório de fármacos, o nanowafer, de promover um aumento na biodisponibilidade do PnPP-19, um promissor peptídeo com atividade hipotensiva e neuroprotetora.

Os resultados do presente estudo relevaram que o dispositivo foi capaz de prolongar a entrega do peptídeo na superfície ocular, quando comparado ao uso de um colírio. Esse efeito foi observado por um aumento na fluorescência da superfície ocular e pela melhora da capacidade hipotensiva do peptídeo.

Quando se investigou a capacidade do dispositivo em aumentar a biodisponibilidade do peptídeo para o segmento posterior do olho, observou-se um aumento na quantidade do peptídeo nos tecidos da retina. No entanto, esse efeito não implicou em uma melhora na capacidade neuroprotetora do peptídeo, fato que pode ser justificado por uma ação limitada do PnPP-19 nos processos isquêmicos neurodegenerativos. Contudo, os resultados obtidos sugerem que o nanowafer é um dispositivo promissor, capaz de fornecer um tratamento aprimorado, não invasivo e capaz de melhorar a biodisponibilidade de peptídeos para os tecidos oculares.

PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados no trabalho fornecem uma melhor compreensão acerca da atividade neuroprotetora de peptídeos derivados da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Esses resultados abrem inúmeras perspectivas quanto à possibilidade do uso desses peptídeos em doenças neurodegenerativas. Dessa forma, estudos subsequentes devem ser conduzidos, a fim de investigar as vias de sinalização envolvidas na neuroproteção promovida por esses peptídeos. Aliado a isso, o dispositivo estudado comprovou ser um sistema capaz de promover o aprimoramento da entrega ocular de fármacos, o que trará um impacto positivo no tratamento de doenças oculares, e seus benefícios podem ser estendidos a outros peptídeos e fármacos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

Artigos científicos publicados relacionados a tese

DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES; SILVA, FLAVIA RODRIGUES DA; TOLEDO, CIBELE RODRIGUES; SILVA, CAROLINA NUNES DA; SANTANA, CLEILDO PEREIRA; COSTA, BRUNA LOPES DA; DE LIMA, MARIA ELENA; CUNHA JUNIOR, ARMANDO DA SILVA. Intravitreal injection of peptides PnPa11 and PnPa13, derivatives of *Phoneutria nigriventer* spider venom, prevents retinal damage. JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES, v.26, 2020.

DA SILVA, CAROLINA NUNES; **DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES**; DE LIMA, MARIA ELENA; DA SILVA CUNHA-JR, ARMANDO. PnPP-19 Peptide as a Novel Drug Candidate for Topical Glaucoma Therapy Through Nitric Oxide Release. Translational Vision Science & Technology, v.9, p.33, 2020.

Artigos científicos publicados não relacionados a tese

DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES; OLIVEIRA, LUCAS GOMES; DA SILVA, CAROLINA NUNES; TOLEDO, CIBELE RODRIGUES; FIALHO, SILVIA LIGÓRIO; JORGE, RODRIGO; SILVA-CUNHA, ARMANDO. Intravitreal ketamine promotes neuroprotection in rat eyes after experimental ischemia. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, v.133, p.110948, 2021.

DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES; DA SILVA, CAROLINA NUNES; DOS ANJOS, LILIAN CARNEIRO; MORTARI, MÁRCIA RENATA; DA SILVA CUNHA JÚNIOR, ARMANDO; FIALHO, SILVIA LIGÓRIO. Ischemia-induced retinal injury is attenuated by Neurovespina, a peptide from the venom of the social wasp *Polybia occidentalis*. NEUROPEPTIDES, v.1, p.102113 - , 2020.

DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES; DA SILVA, CAROLINA NUNES; ARRIBADA, RAQUEL GREGORIO; JÚNIOR, ARMANDO DA SILVA CUNHA. Assessment of Biocompatibility and Vascular Effects of Polymeric Materials Using Chick Chorioallantoic Membrane, an Alternative Method. Macromolecular Symposia (Online). v.394, p.2000046, 2020.

DA SILVA, FLAVIA RODRIGUES; SILVA, RUMMENIGGE OLIVEIRA; DE CASTRO OLIVEIRA, HORTÊNCIA MACIEL; **NUNES DOURADO, LAYS FERNANDA**; DA COSTA, BRUNA LOPES; LIMA, BRUNO SANTOS; LIMA SANTOS, NAYARA GOMES; PALANCH REPEKE, CARLOS EDUARDO; MENEZES, GUSTAVO BATISTA; DE SOUZA ARAÚJO, ADRIANO ANTUNES; DA SILVA-CUNHA, ARMANDO; NUNES, PAULA SANTOS. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposomes: A new treatment strategy for corneal healing. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, v.130, p.110391, 2020.

PAIVA, MAYARA RODRIGUES BRANDÃO; ANDRADE, GRACIELLE FERREIRA; **DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES**; CASTRO, BRENDA FERNANDA MOREIRA; FIALHO, SILVIA LIGÓRIO; SOUSA, EDÉSIA MARTINS BARROS; SILVA-CUNHA, ARMANDO. Surface functionalized mesoporous silica nanoparticles for intravitreal application of tacrolimus. Journal of Biomaterials Applications., v.1, p.088532822097760, 2020.

SILVA, KLÁUDIA MARIA MACHADO NEVES; COSTA, BRUNA LOPES; **DOURADO, LAYS FERNANDA**; SILVA, RUMMENIGGE OLIVEIRA; SILVA'CUNHA, ARMANDO; SANTOS, ANDERSON KENEDY; RESENDE, RODRIGO RIBEIRO; FARIA, PAULO EUSTÁQUIO; CAMPOS RUBIO, JUAN CARLOS; GOULART, GISELE ASSIS CASTRO; SILVA'CALDEIRA, PRISCILA PEREIRA. Four modified sodium alginate/carboxymethylcellulose blends for prednisone delivery. JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, v.1, p.50383 - , 2020.

OLIVEIRA SILVA, RUMMENIGGE; DA COSTA, BRUNA LOPES; DA SILVA, CAROLINA NUNES; DA MATA MARTINS, THAÍS MARIA; **NUNES DOURADO, LAYS FERNANDA**; DE GOES, ALFREDO MIRANDA; LOPES, MIRIAM TERESA; SALAS, CARLOS EDMUNDO; SILVA-CUNHA, ARMANDO DA; DA SILVA, FLAVIA RODRIGUES. The proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* accelerates wound healing after corneal chemical burn in rabbits. BURNS, v.46, p.928 - 936, 2020.

SILVA, CAROLINA; SILVA, FLAVIA; **DOURADO, LAYS**; REIS, PABLO; SILVA, RUMMENIGGE; COSTA, BRUNA; NUNES, PAULA; AMARAL, FLÁVIO; SANTOS, VERA; DE LIMA, MARIA; SILVA CUNHA JÚNIOR, ARMANDO. A New Topical Eye Drop Containing LyeTxI-b, A Synthetic Peptide Designed from A *Lycosa erithrognata* Venom Toxin, Was Effective to Treat Resistant Bacterial Keratitis. Toxins, v.11, p.203, 2019.

TOLEDO, CIBELE RODRIGUES; PEREIRA, VINÍCIUS VIANA; **DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES**; PAIVA, MAYARA RODRIGUES BRANDÃO; SILVA-CUNHA, ARMANDO. Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. DOCUMENTA OPHTHALMOLOGICA, v.138, p.181 - 194, 2019.

SILVA, RUMMENIGGE OLIVEIRA; DA COSTA, BRUNA LOPES; DA SILVA, FLAVIA RODRIGUES; DA SILVA, CAROLINA NUNES; DE PAIVA, MAYARA BRANDÃO; **DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES**; MALACHIAS, ÂNGELO; DE SOUZA ARAÚJO, ADRIANO ANTUNES; NUNES, PAULA SANTOS; DA SILVA-CUNHA, ARMANDO. Treatment for chemical burning using liquid crystalline nanoparticles as an ophthalmic delivery system for pirlfenidone. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, v.568, p.118466, 2019.

SILVA, FLAVIA RODRIGUES DA; PAIVA, MAYARA RODRIGUES BRANDÃO DE; **DOURADO, LAYS FERNANDA NUNES**; SILVA, RUMMENIGGE OLIVEIRA; SILVA, CAROLINA NUNES DA; COSTA, BRUNA LOPES DA; TOLEDO, CIBELE RODRIGUES; DE LIMA, MARIA ELENA; SILVA-CUNHA, ARMANDO DA. Intravitreal injection of the synthetic peptide LyeTx I b, derived from a spider toxin, into the rabbit eye is safe and prevents neovascularization in a chorio-allantoic membrane model. JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES, v.24, p.24 - 31, 2018.

Trabalhos apresentados em eventos científicos relacionados a tese

SILVA, C. N.; **DOURADO, L. F. N.**; GARCIA, M. E. L. P.; CUNHA JUNIOR, A. S. Peptídeo sintético PnPP-19 é um promissor medicamento para o tratamento do glaucoma. V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2020.

DOURADO, L. F. N.; SILVA, C. N.; OLIVEIRA, L. G.; CUNHA JUNIOR, A. S. BIODEGRADABILITY STUDY BY ALTERNATIVE TEST FOR POLYMERIC BIOMATERIALS. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

Trabalhos apresentados em eventos científicos não relacionados a tese

DOURADO, L. F. N.; OLIVEIRA, LUCAS GOMES; SILVA, C. N.; TOLEDO, C. R.; FIALHO, S.; JORGE, R.; CUNHA JUNIOR, A. S. Injeção intravítrea de cetamina atenua degeneração retiniana induzida por processo isquêmico. V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2020.

DOURADO, L. F. N.; SILVA, C. N.; ARRIBADA, RAQUEL GREGORIO; CUNHA JUNIOR, A. S. BIOCOPATIBILITY OF POLYMERS USING CHORIOALLANTOIC MEMBRANE, AN ALTERNATIVE *IN VIVO* MODEL, 15° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

DOURADO, L. F. N.; ALVES, A. P.; PAIVA, M. R. B.; AJERO, U.; SIQUEIRA, R.; CUNHA JUNIOR, A. S. Effect of near-infrared light therapy using an alternative method in association with retina degeneration by light-stress model. 15° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

SILVA, C. N.; **DOURADO, L. F. N.;** LAGE, N.; ARRIBADA, RAQUEL GREGORIO; CUNHA JUNIOR, A. S. HET-CAM: UMA FERRAMENTA NÃO INVASIVA PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE BIOMATERIAIS. 15° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

PEREIRA, V. V.; INOUE, T. T.; **DOURADO, L. F. N.;** CUNHA JUNIOR, A. S. URSOLIC ACID LOADED POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) NANOPARTICLES WITH ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITY. 15° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

OLIVEIRA, L. G.; **DOURADO, L. F. N.;** SILVA, C. N.; TOLEDO, C. R.; CUNHA JUNIOR, A. S. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DA KETAMINA EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA. 15° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2020.

PAIVA, M. R. B.; ANDRADE, G. F.; **DOURADO, L. F. N.;** CUNHA JUNIOR, A. S. DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS À BASE DE SÍLICA MESOPOROSA CONTENDO TACROLIMUS. o III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR, 2018.

DOURADO, L. F. N.; TOLEDO, C. R.; BORGES, P. S.; CUNHA JUNIOR, A. S. LIGHT TOXICOLOGICAL INVESTIGATION: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AN ALTERNATIVE METHOD. IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2018.

SILVA, C. N.; SILVA, F. R.; **DOURADO, L. F. N.;** REIS, PABLO; SILVA, R. O.; COSTA, B. L.; AMARAL, FLÁVIO; GARCIA, M. E. L. P.; CUNHA JUNIOR, A. S. LyeTxI-b, peptídeo derivado da aranha *Lycosa erythrognatha*, um novo composto para tratamento de ceratite bacteriana. III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR, 2018.

TOLEDO, C. R.; PEREIRA, V. V.; **DOURADO, L. F. N.;** PAIVA, M. R. B.; CUNHA JUNIOR, A. S. Ophthalmic application and evaluation of corosolic acid toxicity. IV ABCF Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2018.

Pedidos de patente depositados relacionados a tese

CUNHA JUNIOR, A. S.; GARCIA, M. E. L. P.; SILVA, C. N.; **DOURADO, L. F. N.**; SILVA, P. V. B. D.; LACATIVA, P. G. S.; GROSS, G. M.; PAULA JUNIOR, I. F. D. Method and Use of PnPP-19 for Preventing and Treating Eye Diseases, 2019. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: United States Patent and Trademark Office. País: Estados Unidos. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: 62/895252. Data de depósito: 03/09/2019. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais.

DOURADO, L. F. N.; CUNHA JUNIOR, A. S.; GARCIA, M. E. L. P.; SILVA, F. R.; SILVA, C. N.; TOLEDO, C. R.; SANTANA, C. P.; DONATO, M. F. PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NEUROPROTETORES E ANALGÉSICOS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E USOS, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020180750356. Data de depósito: 03/12/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de São João Del-Rei, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

DOURADO, L. F. N.; CUNHA JUNIOR, A. S.; GARCIA, M. E. L. P.; SILVA, F. R.; SILVA, C. N.; TOLEDO, C. R.; SANTANA, C. P.; DONATO, M. F.; MAGALHAES, B. L. E.; DUARTE, I. D. G.; COSTA, B. L.; PIMENTA, A. M. C. PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NEUROPROTETORES E ANALGÉSICOS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E USOS, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020180750615. Data de depósito: 03/12/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação Ezequiel Dias, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

CUNHA JUNIOR, A. S.; GARCIA, M. E. L. P.; SILVA, C. N.; **DOURADO, L. F. N.**; SILVA, P. V. B. D.; LACATIVA, P. G. S.; GROSS, G. M.; PAULA JUNIOR, I. F. D. Method and Use of PnPP-19 for Preventing and Treating Eye Diseases, 2019. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: United States Patent and Trademark Office. País: Estados Unidos. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: 62/895252. Data de depósito: 03/09/2019. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais.

Pedidos de patente depositados não relacionados a tese

CUNHA JUNIOR, A. S.; GARCIA, M. E. L. P.; SILVA, C. N.; SILVA, F. R.; **DOURADO, L. F. N.**; TOLEDO, C. R.; SILVA, R. O.; COSTA, B. L.; PAIVA, M. R. B. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA APLICAÇÃO INTRAVÍTREA E SEU USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS DA RETINA, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020180163183. Data de depósito: 09/08/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais.

CUNHA JUNIOR, A. S.; SILVA, R. O.; SILVA, F. R.; **DOURADO, L. F. N.**; SILVA, C. N.; COSTA, B. L.; SALAS, C. B.; LOPES, M. T. P. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO DE FERIDAS OCULARES E USO, 2018. Categoria: Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020180157701. Data de depósito: 01/08/2018. Depositante/Titular: Universidade Federal de Minas Gerais.

Premiação

1º Lugar Prêmio BRAVO, Brazilian Research Association in Vision and Ophthalmology 2019.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRISHAMI, M. *et al.* Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration. *Retina*, v. 29, n. 5, p. 699-703, 2009.
- ABURAHMA, M. H.; MAHMOUD, A. A. Biodegradable ocular inserts for sustained delivery of brimonidine tartarate: Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n.1, p. 1335-1347, 2011.
- AGARWAL, R. *et al.* Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 57, n. 4, p. 257-266, 2009.
- AGEPHAPHARMA. Disponível em: <<https://www.agepha.com/blogs/news/age-related-macular-degeneration-the-leading-cause-of-permanent-loss-of-vision>>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- AGOSTINI, R. M. *et al.* *Phoneutria* spider toxins block ischemia-induced glutamate release and neuronal death of cell layers of the retina. *Retina*, v. 19, n. 11, p. 1123-1129, 2011.
- AGYEI, D. *et al.* Protein and Peptide Biopharmaceuticals: An Overview. *Protein & Peptide Letters*, v. 24, n. 2, 2017.
- ALANAZI, F. K. *et al.* Formulation and physicochemical characterisation of buccoadhesive films containing ketorolac. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 17, n. 3, p. 183-192, 2007.
- ALEXANDER, A. *et al.* Polyethylene glycol (PEG)-Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88, n. 3, p. 575-585, 2014.
- ALI, M. S. *et al.* Topical nanoemulsion of turmeric oil for psoriasis: Characterization, *ex vivo* and *in vivo* assessment. *International Journal of Drug Delivery*, v. 4, n. 1, p. 84-197, 2012.
- ALMASIEH, M. *et al.* Structural and functional neuroprotection in glaucoma: Role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death and Disease*, v. 1, n. e27, 2010.
- ALMASIEH, M. *et al.* The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, n. 2, p. 152-181, 2012.
- ALMASIEH, M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 54, n. 5, p. 3171-3183, 2013.
- ALTISSIMO, M. E-beam lithography for micro-/nanofabrication. *Biomicrofluidics*, v. 4, n. 2, p. 026503, 2010.
- ALTMANN, C.; SCHMIDT, M. H. H. The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, p. 110, 2018.
- AMD ALLIANCE INTERNATIONAL: The global economic cost of visual impairment: summary report. Disponível em: www.icoph.org/dynamic/attachments/resources/globalcostofvi_finalreport.pdf. Acesso em 23 nov. 2020.

- AMES, A. Energy requirements of CNS cells as related to their function and to their vulnerability to ischemia: A commentary based on studies on retina. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 70, n. S1, 1992.
- ANAND-APTE, B.; HOLLYFIELD, J. G. Developmental Anatomy of the Retinal and Choroidal Vasculature: *Encyclopedia of the Eye*, Elsevier p. 9-15, 2010.
- ANTUNES, A. *et al.* Eficácia de hipotensores oculares tópicos após capsulotomia posterior, *Arquivos Brasileiros de oftalmologia*, v. 71, n. 5, p. 706-710, 2008.
- ARAÚJO, J. *et al.* Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 72, n. 1, p. 48-56, 2009.
- ARÚJO, D. A. M. *et al.* Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 347, s.n., p. 205-208, 1993.
- AUERBACH, R. *et al.* A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Developmental Biology*, v. 41, n. 2, p. 391-394, 1974.
- BACHU, R. *et al.* Ocular Drug Delivery Barriers—Role of Nanocarriers in the Treatment of Anterior Segment Ocular Diseases. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 1, p. 28, 2018.
- BAE, J. H. *et al.* Intravitreal itraconazole inhibits laser-induced choroidal neovascularization in rats. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. e0180482, 2017.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceutics*, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.
- BALEVIC, S. J.; RABINOVICH, C. E. Profile of adalimumab and its potential in the treatment of uveitis. *Drug Design, Development and Therapy*, v.19, n. 10, p. 2997-3003, 2016.
- BALGURI, S. P. *et al.* Melt-Cast Noninvasive Ocular Inserts for Posterior Segment Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 106, n. 12, p. 3515-3523, 2017.
- BALGURI, S. P.; ADELLI, G. R.; MAJUMDAR, S. Topical ophthalmic lipid nanoparticle formulations (SLN, NLC) of indomethacin for delivery to the posterior segment ocular tissues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 109, s.n., p. 224-235, 2016.
- BALL, S. L.; PETRY, H. M. Noninvasive assessment of retinal function in rats using multifocal electroretinography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 41, n. 2, p. 610-617, 2000.
- BARAR, J.; JAVADZADEH, A. R.; OMIDI, Y.. Ocular novel drug delivery: Impacts of membranes and barriers. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 5, n. 5, p. 567-581, 2008.
- BARKANA, Y.; BELKIN, M. Neuroprotection in ophthalmology: A review, Springer, London, 2004.
- BAYER, A. U. *et al.* Evaluation of different recording parameters to establish a standard for flash electroretinography in rodents. *Vision Research*, v. 41, n. 17, p. 2173-2185, 2001.
- BEHAR-COHEN, F. *et al.* Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 30, n. 4, p. 239-257, 2011.
- BELHASSEN, M. *et al.* Early adherence to anti-glaucoma therapy: An observational study. *Thérapie*, v. 71, n. 5, p. 491-499, 2016.

- BILL, A.; SPERBER, G.; UJIIE, K. Physiology of the choroidal vascular bed. *International Ophthalmology*, v.6, n. 7, p. 101-107, 1983.
- BODDU, S.; GUPTA, H.; PATEL, S. Drug Delivery to the Back of the Eye Following Topical Administration: An Update on Research and Patenting Activity. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v.8, n. 1, p. 27-36, 2014.
- BORDA, E. *et al.* Correlations between neuronal nitric oxide synthase and muscarinic M 3/M1 receptors in the rat retina. *Experimental Eye Research*, v.80, n. 3, p. 391-399, 2005.
- BRAFF, M. H. *et al.* Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infection and Immunity*, v.73, n. 10, p.6771-6781, 2005.
- BRASIL. Formulário Nacional Da Farmacopeia Brasileira / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012.
- BROWN, K. T. The electroretinogram: Its components and their origins. *Vision Research*, v. 8, n. 6, p. 633-646, 1968.
- BYE, L. A.; MODI, N. C.; STANFORD, M. *Basic Sciences for Ophthalmology: Physics and Chemistry*. 1^a ed, Springer Nature, Berlin, 2014.
- CABRAL, T. *et al.* Retinal and choroidal angiogenesis: A review of new targets. *International Journal of Retina and Vitreous*, v. 21, n. 3, p. 31, 2017.
- CAPRIOLI, J.; COLEMAN, A. L. Blood Pressure, Perfusion Pressure, and Glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, v. 149, n. 5, p. 704-712, 2010.
- CARVALHO, I. M. *et al.* Sustained drug release by contact lenses for glaucoma treatment - A review. *Journal of Controlled Release*, v. 28, n. 202, p. 76-82, 2015.
- CAVALCANTE, C. S. P. *et al.* Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *Journal of Antibiotics*, v. 70, n. 3, p. 231-237, 2017.
- CAVET, M. E. *et al.* Nitric Oxide (NO): An emerging target for the treatment of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 55, n. 8, p. 5005-5015, 2014.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.7, n. 6, p. 417-423, 2002.
- CERVIA D.; CATALANI E.; CASINI G. Neuroprotective Peptides in Retinal Disease. *Journal of Clinical Medicine*, n. 8, v. 8, p. 1146, 2019.
- CHAN, W.; WHITE, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* Oxford University Press, Nottingham, 2000.
- CHANG, J. Y. H. *et al.* Role of nitric oxide in murine conventional outflow physiology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 309, n. 5, p. c205-c214, 2015.
- CHEN, S. *et al.* Critical contribution of RIPK1 mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress to compression-induced rat nucleus pulposus cells necroptosis and apoptosis. *Apoptosis*, v. 23, s.n., p. 299-313, 2018.
- CHEN, Z. *et al.* Alterations of sodium and potassium channels of RGCs in RCS rat with the development of retinal degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 51, n. 13, p. 976-985, 2013.

- CHO, K. J. *et al.* Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion. *Brain Research*, v. 27, n. 1403, p- 67-77, 2011.
- CHOLKAR, K. *et al.* Eye: Anatomy, physiology and barriers to drug delivery. *Ocular Transporters and Receptors: Their Role in Drug Delivery*, v. 1, s.n. , p. 1-36, 2013.
- CHOO, A. M. *et al.* NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochemistry International*, v. 60, n. 5, p. 505-516, 2012.
- CHUNG, H. S. *et al.* Progress in measurement of ocular blood flow and relevance to our understanding of glaucoma and age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 18, n. 5, p. 669-687, 1999.
- CONNAUGHTON, V. *et al.* Glutamate and Glutamate Receptors in the Vertebrate Retina. *The Organization of the Retina and Visual System*, Salt Lake, City (UT): University of Utah Health Sciences Center, 1995.
- CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA. Retina e Vítreo. In: MILTON RUIZ ALVES (Org.) 3ª ed. Disponível em: https://issuu.com/computadorseguro/docs/retina_capa 2016. p. 17. Acesso em: Acesso em 26 nov. 2020.
- CORDEIRO, M. do N. *et al.* Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria Nigriventer*. *Toxicon*, v. 31, n. 1, p. 35-42, 1993.
- CORDEIRO, M. do N. *et al.* The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Letters*, v. 310, s.n., p. 1873-3468, 1992.
- COSTANZO, L. S. *Physiology, Fifth Edition*, LWW, S.l: s.n., 2014.
- COURSEY, T. G. *et al.* Dexamethasone nanowafer as an effective therapy for dry eye disease. *Journal of Controlled Release*, v. 213, p. 168-174, 2015.
- CREMER, M. TRAIL: Activation of ERK1/2 Protects Cells Against Apoptosis. *Cancer Investigation*, v. 23, n. 7, p. 651, 2005.
- CROMWELL, M. E. M.; HILARIO, E.; JACOBSON, F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS Journal*, v. 8, n. 3, p. e572-579, 2006.
- CRUYSBERG, L. P. J. *et al.* *In vitro* human scleral permeability of fluorescein, dexamethasone-fluorescein, methotrexate-fluorescein and rhodamine 6g and the use of a coated coil as a new drug delivery system. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, n. 6, p. 559-569, 2002.
- DA COSTA, J. P. *et al.* Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 5, p. 2023-2040, 2015.
- DA SILVA, C. N. *et al.* PnPP-19 Peptide as a Novel Drug Candidate for Topical Glaucoma Therapy Through Nitric Oxide Release. *Translational Vision Science & Technology*, v. 9, n. 8, p. 33, 2020.
- DADAR, M. *et al.* Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*, v. 68, s.n., p. 125–145, 2019.
- DANIEL S. W. *et al.* eNOS, a pressure-dependent regulator of intraocular pressure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2011, v. 52, s.n., p. 9438-9444, 2011.

- DAPHNE L. M. *et al.* ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Documenta Ophthalmologica Ophthalmol*, v. 130, n. 1, p. 1–12, 2015.
- DAVIS, B. M. *et al.* Topical delivery of avastin to the posterior segment of the eye *in vivo* using annexin A5-associated liposomes. *Small*, v. 10, n. 8, p. 1575-1584, 2014.
- DE ALMEIDA, F. P. P. *et al.* *In vivo* release and retinal toxicity of cyclosporine-loaded intravitreal device. *Documenta Ophthalmologica*, v. 131, s.n., p. 207-214, 2015.
- DE BARROS, E. *et al.* Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides. *Frontiers in Pharmacology*, v. 1, s.n., 2019.
- DE FIGUEIREDO, S. G. *et al.* Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones , v. 39, n. 2-3, p. 309-317, 2001.
- DE LIMA, M. E. *et al.* *Phoneutria nigriventer* Venom and Toxins: A Review. *Spider Venoms, Spider Venoms. Toxinology*. Springer, Dordrecht. 2015.
- DE LIMA, M. E. *et al.* The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down NA⁺ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *Journal of Insect Physiology*, 2002.
- DE MARCO ALMEIDA, F. *et al.* Physicochemical Characterization and Skin Permeation of Cationic Transfersomes Containing the Synthetic Peptide PnPP-19. *Current Drug Delivery*, v. 15, n. 7, p. 1064-1071, 2018.
- DE PAULA LE SUEUR, L. *et al.* *In vitro* effect of the *Phoneutria nigriventer* spider venom on cell viability, paracellular barrier function and transcellular transport in cultured cell lines. *Toxicon*, v. 46, n. 2, p. 130-141, 2005.
- DE SOUSA, J. A. *et al.* Texture based on geostatistic for glaucoma diagnosis from fundus eye image. *Multimedia Tools and Applications*, v. 76, s.n., p. 19173-19190, 2017.
- DELAEY, C.; VAN DE VOORDE, J. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Research*. v. 32, n. 6, p. 249-256, 2000.
- DELPLACE, V.; PAYNE, S.; SHOICHET, M. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. *Journal of Controlled Release*, v. 219, n. 10, p. 652-668, 2015.
- DEMERLIS, C. C.; SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*. v.41, n. 3, p. 319-326, 2003.
- DENG, F. *et al.* General Pharmacokinetic Model for Topically Administered Ocular Drug Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, v. 33, n. 11, p. 2680–2690, 2016.
- DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicology in Vitro*, v. 45, s.n., p. 393–396, 2017.
- DETTORAKI, M.; MOSCHOS, M. M. The Role of Multifocal Electroretinography in the Assessment of Drug-Induced Retinopathy: A Review of the Literature. *Ophthalmic Research*, v. 56, n. 4, p. 169–177, 2016.
- DIGIUNI, M.; FOGAGNOLO, P.; ROSSETTI, L. A review of the use of latanoprost for glaucoma since its launch. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 3, n. 5, p. 723-745, 2012.
- DINIZ, C. R. *et al.* The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin

- Tx1 from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Letters*, v. 263, n. 2, p. 251-253, 1990.
- DINIZ, M. R. V. *et al.* Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian “armed” spider, *Phoneutria nigriventer*. *Protein Expression and Purification*, v. 50, n. 1, p. 18-24, 2006.
- DITLEVSEN, D. K. *et al.* Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival. *Journal of Neuroscience Research*, v. 85, n. 4, p. 703-711, 2007.
- DO COUTO, L. *et al.* Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacognosy Magazine*, v. 8, n. 32, p. 292-299, 2012.
- DODDS, E. M. *et al.* Intraocular Inflammation Associated with Ocular Toxoplasmosis: Relationships at Initial Examination. *American Journal of Ophthalmology*, v. 146, n. 6, p. 856-865, 2008.
- DONOVAN, M.; CARMODY, R. J.; COTTER, T. G. Light-induced Photoreceptor Apoptosis *in Vivo* Requires Neuronal Nitric-oxide Synthase and Guanylate Cyclase Activity and Is Caspase-3-independent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 23000-23008, 2001.
- DOOZANDEH, A.; YAZDANI, S. Neuroprotection in glaucoma. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, v. 7, n. 1, p. 91-93, 2016.
- DOURADO, L. F. N. *et al.* Intravitreal ketamine promotes neuroprotection in rat eyes after experimental ischemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, s.n., p. 110948, 2021.
- DOURADO, L. F. N. *et al.* Ischemia-induced retinal injury is attenuated by Neurovespina, a peptide from the venom of the social wasp *Polybia occidentalis*. *Neuropeptides*, v. 85, s.n., p. 102113, 2021.
- DOURADO, L. F. N. *et al.* Intravitreal injection of peptides PnPa11 and PnPa13, derivatives of *Phoneutria nigriventer* spider venom, prevents retinal damage. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, s.n., 2020.
- DRAZEK, M. *et al.* Electroretinography in dogs: A review. *Veterinarni Medicina*. v. 59, n. 11, p. 515-526, 2014.
- DUFFY, D. C. *et al.* Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
- DUNAIEF, J. L. *et al.* The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, v. 120, n. 11, p. 1435-1442, 2002.
- EKATOMATIS, P. Herpes simplex dendritic keratitis after treatment with latanoprost for primary open angle glaucoma [2]. *British Journal of Ophthalmology*, v. 85, n. 8, p. 1008-1009, 2001.
- ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine*. v. 17, n. 11, p. 1391-1401, 2011.
- EMERICH, B. L. *et al.* PnAn13, an antinociceptive synthetic peptide inspired in the *Phoneutria nigriventer* toxin PnTx4(6–1) (δ -Ctenitoxin-Pn1a). *Toxicon: X*, v. 7, s.n., p. 100045, 2020.
- EMERICH, B. L. *et al.* δ -ctenitoxin-pn1a, a peptide from *phoneutria nigriventer* spider venom, shows antinociceptive effect involving opioid and cannabinoid systems, in rats.

Toxins, v. 8, n. 4, p. 206, 2016.

EOUANI, C. *et al.* *In-vitro* comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, n. 1, p. 45-55, 2001.

EPSTEIN, F. H.; MCCORD, J. M. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *New England Journal of Medicine*, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

FALAVIGNA, M. *et al.* Impact of mucin on drug diffusion: Development of a straightforward *in vitro* method for the determination of drug diffusivity in the presence of mucin. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y.M.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*, v. 15, s.n., p. 292-363, 2018.

FARKOUH, A.; FRIGO, P.; CZEJKA, M. Systemic side effects of eye drops: a pharmacokinetic perspective. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, v. 10, s.n., p. 2433-2441, 2016.

FATHALLA, Z. M. A., *et al.* Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine in situ gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.114, s.n., p. 119-134, 2017.

FATIMA, E.; VIVEK, D. Role of Micro Emulsion Based In-Situ Gelling System of Fluoroquinolone for Treatment of Posterior Segment Eye Diseases (PSED). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 10, n. 3, p. 265-272, 2020.

FEDORCHAK, M. V. *et al.* Long Term Glaucoma Drug Delivery Using a Topically Retained Gel/Microsphere Eye Drop. *Scientific Reports*, v. 7, s.n., p. 8639, 2017.

FERREIRA, M. F.; ANTUNES-FOSCHINI, R; FURTADO, J. M. Causes of visual functional low vision in a tertiary ophthalmic service in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *ARVO Annual Meeting Abstract*, 2020.

FERREIRA, R. D. *et al.* Hipersensibilidade à fluoresceína – Revisão a propósito de um caso clínico. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, v. 23, n. 4, p. 231-235, 2015.

FIALHO, S. L.; CUNHA JÚNIOR, A. da S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FIGUEIREDO, S. G. *et al.* Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin T \times 4(6-1) from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (keys). *Toxicon*, v. 33, n. 1, p. 83-93, 1995.

FINGER, R. P. *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor in neovascular age-related macular degeneration – a systematic review of the impact of anti-VEGF on patient outcomes and healthcare systems. *BMC Ophthalmology*, v. 20, n. 1, p. 294, 2020.

FISHMAN, G. A. Basic principles of clinical electroretinography. *Retina*, v. 5, n. 2, p. 123-126, 1985.

FLAXMAN, S. R. *et al.* Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, v. 5, n. 2, p. e1221-e1234, 2017.

FLETCHER, E. L. *et al.* Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, v. 420, n. 1, p. 98-112, 2000.

FLEURY, CÉCILE. Ferramentas de Bioinformática dedicadas ao estudo das Relações Estrutura-Função-Antigenicidade em Toxinas Peptídicas Animais. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

FONSECA, D. P. *et al.* A spider derived peptide, pnp-19, induces central antinociception mediated by opioid and cannabinoid systems. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 22, n. 34, 2016.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.

FRAUNFELDER, F. W. Corneal toxicity from topical ocular and systemic medications. *Cornea*, v. 25, n. 10, p. 1133-1138, 2006.

FREEMAN, W. R. *et al.* Nanostructured Porous Silicon Dioxide Microparticles as an Intravitreal Injectable Drug Delivery System for Avastin (Bevacizumab) Lasting Six Months. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 53, n. 465, 2012.

FREITAS, A. C. N. *et al.* The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 64, s.n., p. 31-38, 2017.

FUKUMURA, D. *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 5, p. 2604-2609, 2001.

FULTON, A. B. *et al.* Retinal degenerative and hypoxic ischemic disease, v. 118, n. 1, p. 55-61, 2009.

FUNK, R. H. W. Blood supply of the retina. *Ophthalmic Research*, v. 29, n. 5, p. 320-325, 1997.

FUSCALDI, L. L. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of two peptide LyeTx I derivatives modified with the chelating agent HYNIC for radiolabeling with technetium-99m. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 22, n. 6, 2016.

GANDHI, S.; JAIN, S. The anatomy and physiology of cornea. *Keratoprotheses and Artificial Corneas: Fundamentals and Surgical Applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, p.19-25, 2015.

GARHÖFER, G.; SCHMETTERER, L. Nitric oxide: a drug target for glaucoma revisited. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 8, p. 1614-1620, 2019.

GASPARIN, F. *et al.* Pharmacokinetics, electrophysiological, and morphological effects of the intravitreal injection of mycophenolic acid in rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 36, n. 6, p. 502-511, 2014.

GAUDANA, R. *et al.* Ocular Drug Delivery. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 3, p. 348-360, 2010.

GAUDANA, R. *et al.* Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 5, p. 1197-1206, 2009.

GILLERON, L. *et al.* Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicology in Vitro*, v. 10, n. 4, p. 431-446, 1996.

GOEL, Manik. *et al.* Aqueous humor dynamics: a review. *The open ophthalmology journal*, v. 4, s.n., p. 52-9, 2010.

- GOMEZ, M. V. *et al.* Phoneutria nigriventer venom: A cocktail of toxins that affect ion channels. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 22, s.n., p. 579-588, 2002.
- GOMEZ, R. S. *et al.* The effect of PhTx3 on the release of 3H-acetylcholine induced by tityustoxin and potassium in brain cortical slices and myenteric plexus. *Neuroscience Letters*, v. 196, n. 1-2, p.131-133, 1995.
- GOOCH, Nathan *et al.* Ocular drug delivery for glaucoma management. *Pharmaceutics*. v. 4, n. 1, p. 197-211, 2012.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition. New York, McGraw-Hill Medical, 2005.
- GORDON, W. C. *et al.* DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 43, s.n., p. 3511-3521, 2002.
- GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GRUENHEID, S.; LE MOUAL, H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 330, n. 2, p. 81-89, 2012.
- GRUMETTO, L. *et al.* Pharmacokinetics of cetirizine in tear fluid after a single oral dose. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, n. 7, p. 525-531, 2002.
- GU, Z. *et al.* Neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in an experimental glaucoma model in the rat. *Journal of Japanese Ophthalmological Society*, v. 104, n. 1, p. 11-16, 2000.
- GUIMARÃES JUNIOR, MARIO. Desenvolvimento de Bionanocompósitos Utilizando Nanofibras Celulósicas de Bambu como Agente de Reforço em Matriz de Amido e Álcool Polivinílico. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Ouro Preto, 2015.
- GULSEN, D.; CHAUHAN, A. Ophthalmic drug delivery through contact lenses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 45, n. 7, p. 2342-2347, 2004.
- GUNTHER, J. B.; ALTAWHEEL, M. M. Bevacizumab (Avastin) for the Treatment of Ocular Disease. *Survey of Ophthalmology*, v. 54, n. 3, p. 372-400, 2009.
- GUO, L. *et al.* Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 46, n. 1 p. 175-182, 2005.
- GUO, R. *et al.* Bioadhesive film formed from a novel organic-inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, n. 3, p. 574- 2011.
- GUPTA, A.; BHATNAGAR, S. Vasoregression: A Shared Vascular Pathology Underlying Macrovascular And Microvascular Pathologies? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v. 12, s.n., p. 733-753, 2015.
- GUPTA, H. *et al.* Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, v. 19, n. 6, p. 409-417, 2011.
- HAEFLIGER, I. O. *et al.* Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma, *Survey of Ophthalmology*, v. 43, n. s1, p. s51-s58, 1999.
- HAFEZI, F. *et al.* Light-induced apoptosis: Differential timing in the retina and pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, v. 64, n. 6, p. 963-970, 1997.

- HAYREH, S. S. Blood flow in the optic nerve head and factors that may influence it. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 20, n. 5, p. 595-624, 2001.
- HEYNE, G. W. *et al.* Effect of nitric oxide on anterior segment physiology in monkeys. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 54, n. 7, p. 5103-5110, 2013.
- HOLLYFIELD, J. G. *et al.* Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature Medicine*, v. 14, n. 2, p. 194-198, 2008.
- [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Número anual de publicações contendo os termos de pesquisa “oxidative stress AND retina” ou “inflammation AND retina” de 2000 – 2020. Acesso em: 30 nov. 2020.
- HUANG, W. *et al.* Application of electroretinography (ERG) in early drug development for assessing retinal toxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 289, n. 3, p. 525-533, 2015.
- HUGHES, P. M. *et al.* Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 14, p. 2010-2032, 2005.
- HUGHES, W. F. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Experimental Eye Research*, v. 53, n. 5, p. 573–582, 1991.
- INAN, Ü. Ü. *et al.* Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 48, n. 4, p. 1773-1781, 2007.
- INÊS, CAROLINA MADEIRA. Degenerescência Macular Relacionada com a Idade: a propósito de um caso clínico. Dissertação (Mestre em medicina) - Ciências da Saúde, Universidade da beira interior, 2019.
- INNOCENCIO, PAULO VÍCTOR *et al.* A importância do glaucoma sobre o ponto de vista epidemiológico do tratamento clínico e cirúrgico na região sudeste do Brasil nos últimos 5 anos. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 11, p.85708-85717, 2020.
- JAADANE, I. *et al.* Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs). *Free Radical Biology and Medicine*, v. 84, s.n., p. 373-384, 2015.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P. HANCOCK, R. E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.
- JONAS, J. B.; CHEUNG, C.M. G.; PANDA-JONAS, S. Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, v. 6, n. 6, p. 493-497, 2017.
- JU, W. K. *et al.* Intraocular pressure elevation induces mitochondrial fission and triggers OPA1 release in glaucomatous optic nerve. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 49, n. 11, p. 4903-4911, 2008.
- KALAPOTHAKIS, E. *et al.* Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1843-1850, 1998.
- KALAPOTHAKIS, E. *et al.* Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1971-1980, 1998.
- KANG-MIELER, J. J.; OSSWALD, C. R.; MIELER, W. F. Advances in ocular drug delivery: Emphasis on the posterior segment. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 49, n. 11, p. 2014.
- KANNER, J.; HAREL, S.; RINA, G. Nitric oxide as an antioxidant. *Archives of*

Biochemistry and Biophysics, v. 289, n. 1, p. 130-136, 1991.

KARIM, M. Z. *et al.* Neuroprotective effect of nipradilol [3,4-dihydro-8-(2-hydroxy-3-isopropylamino)-propoxy-3-nitroxy-2H-1-benzopyran] in a rat model of optic nerve degeneration. *Journal of Glaucoma*, v. 18, n. 1, p. 26-31, 2009.

KAUR, C. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clinical Ophthalmology*, v. 2, n. 4, p. 879-889, 2008.

KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; FOULDS, W. S. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 47, n. 3, p. 1126-1141, 2006.

KELTNER, J. L. Photoreceptor Degeneration Possible Autoimmune Disorder. *Archives of Ophthalmology*, v. 101, n. 4, p. 564, 1983.

KILIC, Ü. *et al.* Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells *in vivo* by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 48, p. 12439-12446, 2006.

KIM, B. J. *et al.* Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Molecular Neurodegeneration*, v. 8, n. 21, 2013.

KIRCHHOF, S. *et al.* Diels-Alder hydrogels with enhanced stability: First step toward controlled release of bevacizumab. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 96, p. 217-225, 2015.

KIUCHI, K. *et al.* Mecamylamine suppresses basal and nicotine-stimulated choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 49, n.4, p. 1705-1711, 2008.

KOMPELLA, U. B; KADAM, R. S; LEE, V. H L. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Therapeutic delivery*, v. 1, n. 3, p. 435-456, 2010.

KRAPIVINSKY, G. *et al.* The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, v. 40, n. 4, p. 775-784, 2003.

KRIGEL, A. *et al.* Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience*, v. 339, p. 296–307, 2016.

KUR, J.; NEWMAN, E. A.; CHAN-LING, T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, n. 5, p. 377-406, 2012.

KURENNY, D. E. *et al.* Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron*, v. 13, n. 2, p. 315-324, 1994.

KUSE, Y. *et al.* Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Scientific Reports*, v. 4, s.n., p. 5223, 2014.

KUSHMERICK, C. *et al.* *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 72, n. 4, p. 1472-1481, 1999.

LAI, T. Y.Y. *et al.* The Clinical Applications of Multifocal Electretinography: A Systematic Review. *Survey of Ophthalmology*, v. 52, n. 1, p. 61-96, 2007.

LAM, Tim T. *et al.* N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 40, s.n., p. 2391-2397, 1999.

- LANCE, K. D. *et al.* *In vivo* and *in vitro* sustained release of ranibizumab from a nanoporous thin-film device. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 6, n. 6, p. 771-780, 2016.
- LASPAS, P. *et al.* The M 1 muscarinic acetylcholine receptor subtype is important for retinal neuron survival in aging mice. *Scientific Reports*, v. 9, s.n., p. 5522, 2019.
- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 1, p. 2700-2707, 2018.
- LEÃO, R. M. *et al.* Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the ω -Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, v. 39, n. 10, p. 1756-1767, 2000.
- LEE, V.H L; ROBINSON, J. R. Review : Topical Ocular Drug Delivery : Recent Developments and Future Challenges. *Ocular Pharmacology*, v. 2, n. 1, p. 67-108, 1986.
- LI, F. Controlled Release of Bevacizumab Through Nanospheres for Extended Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *The Open Ophthalmology Journal*, v. 6, s.n., p. 54-58, 2012.
- LI, J. *et al.* A more efficient ocular delivery system of triamcinolone acetonide as eye drop to the posterior segment of the eye. *Drug Delivery*, v. 26, n. 1, p. 188-198, 2019.
- LIM, L. S. *et al.* Age-related macular degeneration. *The Lancet*, v. 379, n. 9827, p. 1728-1738, 2012.
- LIU, J. H.K. Circadian rhythm of intraocular pressure. *Journal of Glaucoma*. v. 7, n. 2, p. 141-147, 1998.
- LIU, Z.; YU, X; SHAIKH, Z. A. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 228, n. 3, p. 286-294, 2008.
- LOFTSSON, T.; HREINSDÓTTIR, D.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrin microparticles for drug delivery to the posterior segment of the eye: aqueous dexamethasone eye drops. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, n. 5, p. 629-635, 2007.
- LOFTSSON, T. *et al.* Topical drug delivery to the posterior segment of the eye: Anatomical and physiological considerations. *Pharmazie*. v. 63, n. 3, p. 171-179, 2008.
- LÓPEZ-GARCÍA, B. *et al.* Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, n. 1, p. 108-115, 2005.
- LOUREIRO, F. L. B.; FÉLIX, Kevin A. da C. Clinical and epidemiological profile of patients with glaucoma attended at a clinic in the interior of the Amazon. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 79, n. 1, p. 12-20, 2020.
- LOUZADA-JUNIOR, P. *et al.* Glutamate Release in Experimental Ischaemia of the Retina: An Approach Using Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 1, p. 358-363, 1992.
- LOVETT, M. L. *et al.* Silk hydrogels for sustained ocular delivery of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, s.n., 2015.
- LOZANO, D. C.; HARTWICK, A.T.E.; TWA, M. D. Circadian rhythm of intraocular pressure in the adult rat. *Chronobiology International*, v. 32, n. 4, p. 513-523, 2015.

- LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 24, n. 6-74, p. 495-496, 1986.
- LUNDBERG, J. O. *et al.* Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics, *Nature* v. 32, n. 4, p. 865-869, 2009.
- LYNCH, D. R.; DAWSON, T. M. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Current Opinion in Neurology*. v.7 n. 6, p. 510-516.
- MA, Q. *et al.* Design, Characterization, and Application of a pH-Triggered In Situ Gel for Ocular Delivery of Vinpocetine. *AAPS PharmSciTech*, v.21, n. 7, p. 253, 2020.
- MA, W. *et al.* Swelling Resistance and Mechanical Performance of Physical Crosslink-Based Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Film with Various Molecular Weight. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, v. 57, n. 24, p. 1673-1683, 2019.
- MADSEN-BOUTERSE, S. A.; KOWLURU, R. A. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. v. 9, s.n., p. 315-327, 2008.
- MAHAJAN, H. S.; DESHMUKH, S. R. Development and evaluation of gel-forming ocular films based on xyloglucan. *Carbohydrate Polymers*, v. 122, s.n., p. 243-247, 2015.
- MANDAL, A. *et al.* Ocular delivery of proteins and peptides: Challenges and novel formulation approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 126, s.n., p. 67-95, 2018.
- MANNERMAA, E.; VELLONEN, K. S.; URTTI, A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 58, n. 11, p. 1136-1163, 2006.
- MANSUR, H. S. *et al.* FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, n. 4, p. 539-548, 2008.
- MARCANO, D. C. *et al.* Synergistic Cysteamine Delivery Nanowafer as an Efficacious Treatment Modality for Corneal Cystinosis. *Molecular Pharmaceutics*, v. 13, n. 10, p. 3468–3477, 2016.
- MARTIN-MOUTOT, N. *et al.* *Phoneutria nigriventer* toxin 1: A novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with μ conotoxin binding sites. *Molecular Pharmacology*, v. 69, n. 6, p. 1931-1967, 2006.
- MATAVEL, A. *et al.* Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-61. *FEBS Letters*, 2002.
- MATAVEL, A. *et al.* Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry*, v. 48, n. 14, p. 3078-3088, 2009.
- MATAVEL, A.; ESTRADA, G.; DE MARCO ALMEIDA, F. Spider Venom and Drug Discovery: A Review. In: Gopalakrishnakone P., Corzo G., de Lima M., Diego-García E. Spider Venoms. Toxinology. Springer, Dordrecht, 2016.
- MATHUR, D. *et al.* TopicalPdb: A database of topically delivered peptides. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. e0190134, 2018.
- MCCULLOCH, D. L. *et al.* ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Documenta Ophthalmologica*, v. 130, n. 1, p. 1-12, 2015.
- MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 7, p. 491-

499, 2002.

MELO, G. B. *et al.* Critical analysis of techniques and materials used in devices, syringes, and needles used for intravitreal injections. *Progress in Retinal and Eye Research.*, v. 80, n. 1, p.100862, 2021.

MINHAS, G.; SHARMA, J.; KHAN, N. Cellular stress response and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Immunology.* v. 7, s.n., p. 774, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/ministerio-da-saude>. Acesso em: 23 nov. 2020.

MISHRA, O. P. *et al.* Nuclear Ca⁺⁺-influx, Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV activity and CREB protein phosphorylation during post-hypoxic reoxygenation in neuronal nuclei of newborn piglets: The role of nitric oxide. *Neurochemical Research*, v. 31, s.n., p. 1463-1471, 2006.

MITCHELL, P. *et al.* Age-related macular degeneration. *The Lancet*, v. 392, n. 10153, p.1147-1159, 2018.

MO, M.-S. *et al.* PI3K/Akt and NF- κ B activation following intravitreal administration of 17 β -estradiol: Neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis. *Neuroscience*, v. 228, s.n., p. 1-12, 2013.

MOHAMMADI, G. *et al.* Preparation and evaluation of Eudragit® L100 nanoparticles loaded impregnated with kt tromethamine loaded PVA-HEC insertions for ophthalmic drug delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v.9, n. 4, p. 593-600, 2019.

MONTEIRO, M. C. *et al.* Neuroprotection in Neurodegenerative Disease: From Basic Science to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* s.n., 2017.

MOORE, C. G.; JOHNSON, E. C.; MORRISON, J. C. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Current Eye Research*, v.15, n. 2, p.185-191, 1996.

MORALES, J. *et al.* Herpes simplex virus dermatitis in patients using latanoprost. *American Journal of Ophthalmology*, v.132, n. 1, p. 144-116, 2001.

MOREAU, V. *et al.* PEPOP: Computational design of immunogenic peptides. *BMC Bioinformatics*, s.n., 2008.

MOREIRA-NETO, C. A. *et al.* Choriocapillaris loss in advanced age-related macular degeneration. *Journal of Ophthalmology*, 8125267, 2018.

MORTARI, Márcia Renata. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. 2007. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MOSS, S. E. *et al.* Comparison Between Ophthalmoscopy and Fundus Photography in Determining Severity of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*, v. 92, n. 1, p. 62-67, 1985.

MOTHET, J. P. *et al.* D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 9, p. 4926-4931, 2002.

MOURA, J. R. *et al.* Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. *Toxicon*, v. 36, n. 8, p. 1189-1192, 1998.

MUKAIDA, Y. *et al.* Correlation of retinal function with retinal histopathology following

- ischemia-reperfusion in rat eyes. *Current Eye Research*, v. 28, n. 6, p. 381-389, 2004.
- NAKAMURA, M. *et al.* Exposure to excessive blue LED light damages retinal pigment epithelium and photoreceptors of pigmented mice. *Experimental Eye Research*, v. 177, s.n., p. 1-11, 2018.
- NAKAZAWA, T. *et al.* ERK1 plays a critical protective role against N-methyl-D-aspartate-induced retinal injury. *Journal of Neuroscience Research*, v. 86, n. 1, p. 136-144, 2008.
- NATHANS, J; THOMAS, D; HOGNESS, D S. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science*, v. 232, n. 4747, p. 193–202, 1986.
- NAYAK, K.; MISRA, M. PEGylated microemulsion for dexamethasone delivery to posterior segment of eye. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 31, n. 8, p.1071-1090, 2020.
- NI, Y. Q. *et al.* Neuroprotective effects of naloxone against light-induced photoreceptor degeneration through inhibiting retinal microglial activation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 49, n.6, p. 2589-2598, 2008.
- NICKLA, D.L.; WALLMAN, J. The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research*. v. 29, n. 2, p. 144-168, 2010.
- NOGUEIRA, MARIA INÊS. Sistema serotoninérgico: Relações com o sistema de temporização circadiano. Tese (Doutorado em Ciências morfofuncionais). Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.
- NOMOTO, H. *et al.* Pharmacokinetics of bevacizumab after topical, subconjunctival, and intravitreal administration in rabbits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 50, n. 10, p. 4807-4813, 2009.
- NUCCI, C. *et al.* Neuroprotective agents in the management of glaucoma. *Eye (Basingstoke)*, v. 32 , s.n., p. 938-945, 2018.
- NUNES DA SILVA, C. *et al.* PnPP-19 Peptide Restores Erectile Function in Hypertensive and Diabetic Animals Through Intravenous and Topical Administration. *Journal of Sexual Medicine*, v. 16, n. 3, p. 365-374, 2019.
- NUNES, K. P. *et al.* Increased cavernosal relaxation by *Phoneutria nigriventer* toxin, PnTx2-6, via activation at NO/cGMP signaling. *International Journal of Impotence Research*, v. 24, s.n., p. 69-76, 2012.
- NUNES, K. P. *et al.* Nitric oxide-induced vasorelaxation in response to pntx2-6 toxin from *phoneutria nigriventer* spider in rat cavernosal tissue. *Journal of Sexual Medicine*, v. 7, n. 12, p. 3879-3888, 2010.
- NUNES, K. P. *et al.* Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*, v. 51 , n. 7, p. 1197-1206, 2008.
- NUNES, R. P. *et al.* Cost-effectiveness of Anti-VEGF treatments for age-related macular degeneration: A Brazilian perspective. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 83, n. 1, p. 48-54, 2020.
- OLIVEIRA, C. F. B. *et al.* Antinociceptive effect of PnTx4(5-5), a peptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom, in rat models and the involvement of glutamatergic system. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 25, s.n., p. e20190022, 2019.
- OLIVEIRA, L. C. *et al.* PnTx4-3, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom

elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. *Toxicon*, v. 42, n. 3, p. 793-800, 2003.

OLIVEIRA, S. M. *et al.* Antinociceptive effect of a novel armed spider peptide Tx3-5 in pathological pain models in mice. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, v. 468, n. 5, p. 881-94, 2016.

OLSEN, T. W. *et al.* Human scleral permeability: Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 3, n. 4, p. 297-307, 1995.

ORGANISCIAK, D.T.; VAUGHAN, D. K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 29, n. 2, p. 113-134, 2010.

OSADA, H. *et al.* Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, 2017.

OSBORNE, N. N. *et al.* Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. v. 43, n. 1s, p. s102-s128, 1999.

OSBORNE, N. N. *et al.* Retinal ischemia: Mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 23, n. 1, 2004.

OSBORNE, N. N. Retinal Ischemia in relation to glaucoma and neuroprotection. *Ocular Blood Flow*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012.

OSSWALD, C. R.; KANG-MIELER, J. J. Controlled and extended *in vitro* release of bioactive anti-vascular endothelial growth factors from a microsphere-hydrogel drug delivery system. *Current Eye Research*, v. 41, n. 9, p. 1216-1222, 2016.

OTT, M. *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. v. 12, s.n., p. 913-922, 2007.

PALMHOF, M. *et al.* Fewer functional deficits and reduced cell death after ranibizumab treatment in a retinal ischemia model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. 1636, 2018.

PALMHOF, M. *et al.* From Ganglion Cell to Photoreceptor Layer: Timeline of Deterioration in a Rat Ischemia/Reperfusion Model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, n. 174, 2019.

PARDUE, M. T.; ALLEN, R. S. Neuroprotective strategies for retinal disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. v. 65, s.n., p. 50-76, 2018.

PARVER, L. M.; AUKER, C. R.; FINE, B. S. Observations on Monkey Eyes Exposed to Light from an Operating Microscope. *Ophthalmology*, v. 90, n. 8, p. 964-972, 1983.

PAULA, J. S.; *et al.* Bevacizumab-loaded Polyurethane Subconjunctival Implants: Effects on Experimental Glaucoma Filtration Surgery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 14, 2011.

PAWAR, P.; KHURANA, G.; ARORA, S. Ocular insert for sustained delivery of gatifloxacin sesquihydrate: Preparation and evaluations. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 2, n. 2, p. 70-77, 2012.

PEIGNEUR, S.; DE LIMA, M. E.; TYTGAT, J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. *Toxicon*, v. 51, s.n., p. 96-110, 2018.

PENNINGTON, K. L.; DEANGELIS, M. M. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye and Vision*, v. 3, n. 1, p. 34, 2016.

- PEREIRA, S. P. F.; ARAUJO, E. G. Veratridine increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 12, p. 1476-1470, 1997.
- PERSSON, J.; EKELUND, U.; GRÄNDE, P. O. Endogenous Nitric Oxide Reduces Microvascular Permeability and Tissue Oedema during Exercise in Cat Skeletal Muscle. *Journal of Vascular Research*, v. 40, n. 6, p. 538-546, 2003.
- PESCINA, S. *et al.* Cell penetrating peptides in ocular drug delivery: State of the art. *Journal of Controlled Release*, v. 284, s.n., p. 84-102, 2018.
- PIERSCIONEK, B. *et al.* The eye lens: age-related trends and individual variations in refractive index and shape parameters. *Oncotarget*, v. 6, n. 31, p. 30532-30544, 2015.
- PITKÄNEN, L. *et al.* Permeability of retinal pigment epithelium: Effects of permeant molecular weight and lipophilicity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 46, n. 2, p. 641-646, 2005.
- POURNARAS, C. J. *et al.* Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 23, n. 7, p. 284-330, 2008.
- PRADO, M. A. M. *et al.* A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: The toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochemical Journal*, v. 314, s.n., p. 145-150, 1996.
- PRESLAND, A.; PRICE, J. Ocular anatomy and physiology relevant to anaesthesia. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 18, n. 1, p. 27-32, 2017.
- PRINSEN, M. K. *et al.* The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 85, s.n., p. 132-184, 2017.
- RADHAKRISHNAN, K. *et al.* Protein delivery to the back of the eye: barriers, carriers and stability of anti-VEGF proteins. *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 2, p. 416-423, 2017.
- RAMSAY, E. *et al.* Role of retinal pigment epithelium permeability in drug transfer between posterior eye segment and systemic blood circulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 143, s.n., p.18-23, 2019.
- RANTA, V. P. *et al.* Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment. *Journal of Controlled Release*, v. 148, n. 1, p. 42-48, 2010.
- RAUCK, B. M. *et al.* Biocompatible reverse thermal gel sustains the release of intravitreal bevacizumab *in vivo*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 55, s.n., p. 469-476, 2014.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.
- REIS, P. V. M. *et al.* LyeTxI-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, shows potent antibiotic activity *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, v.9, s.n. , p. 667, 2018.
- REZENDE, L. *et al.* Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*, v. 29 , n. 10, p.1225-1233, 1991.
- RIBATTI, D. Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 210, s.n. , p. 181-224, 2008.
- RIBATTI, D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. In: Peng X.,

- Antonyak M. Cardiovascular Development. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 843. Humana Press, Totowa, 2012.
- RIBATTI, D. *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *Anatomical Record*, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001.
- RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*, v. 46, s.n. p. 23-45, 2010.
- RIMPELÄ, A. K. *et al.* Implications of melanin binding in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 126, p. 23-43, 2017.
- RIVERA, J. C. *et al.* Ischemic retinopathies: Oxidative stress and inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2017, s.n., p. 3940241, 2017.
- RODRIGUES, G. A. *et al.* Topical Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye: Addressing the Challenge of Preclinical to Clinical Translation. *Pharmaceutical Research*. v. 29, n. 35, p. 245, 2018.
- ROGERS, K. The Eye: The Physiology of Human Perception Britannica Educational Publishing, 2014.
- RUAN, Y. *et al.* Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies. *Antioxidants*, v. 9, n. 8, p. 761, 2020.
- RUSSELL W. M. S; Burch K. I. The principles of humane experimental technique. UFAW, London, p. 238, 1992.
- RYLANDER, N. R.; VOLD, S. D. Cost Analysis of Glaucoma Medications. *American Journal of Ophthalmology*, v. 145, n. 1, p. 106-113, 2008.
- SAKATA, K. *et al.* Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 48, n. 11, p. 4974-4979, 2007.
- SAMARDZIJA, M. *et al.* Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. *The FASEB Journal*, v. 664, s.n., p. 601-607, 2006.
- SANTAELLA, R. M.; FRAUNFELDER, F. W. Ocular adverse effects associated with systemic medications: Recognition and management. *Drugs*, v. 67, n. 1, p. 75-93, 2007.
- SASAKI, H. *et al.* Delivery of drugs to the eye by topical application. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 15, n. 2, p. 583-620, 1996.
- SATO, M.; OHTSUKA, T. Opposite effects of nitric oxide on rod and cone photoreceptors of rat retina *in situ*. *Neuroscience Letters*, v. 473, n. 1, p. 62-66, 2010.
- SAUDE, T. Ocular anatomy and physiology. *Optometry and Vision Science*, v.71, n. 7, p. 426, 1994.
- SCHMETTERER, L.; POLAK, K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 20, n. 6, p. 823-847, 2001.
- SCHMIDT, K.-G.; BERGERT, H.; FUNK, R. Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for Protection and Recovery. *Current Neuropharmacology*, v. 6, n. 2, p. 164-178, 2008.
- SCHNEEMANN, A. *et al.* Elevation of nitric oxide production in human trabecular meshwork by increased pressure. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental*

Ophthalmology, 2003.

SCHNEEMANN, A. *et al.* Nitric oxide/guanylate cyclase pathways and flow in anterior segment perfusion. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 241, n. 4, p. 321-326, 2002.

SCHOPF, L. R. *et al.* Topical ocular drug delivery to the back of the eye by mucus-penetrating particles. *Translational Vision Science and Technology*, v. 4, n. 3, p. 11, 2015.

SCHUMAN, S. G. *et al.* Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-Related Macular Degeneration Imaged *In Vivo* with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*, v. 116, n. 3, p. 488- 496. 2009.

SCHUR, R. M. *et al.* New GABA modulators protect photoreceptor cells from light-induced degeneration in mouse models. *FASEB Journal*, v. 32, n. 6, p. 3289-3030, 2018.

SEMERARO, F. *et al.* Aflibercept in wet AMD: Specific role and optimal use. *Drug Design, Development and Therapy*.v. 7, s.n, p. 711-722, 2013.

SENNLAUB, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 6, s.n., p. 717-725, 2001.

SHA, O.; KWONG, W. H. Postnatal developmental changes of vitreous and lens volumes in Sprague-Dawley rats. *Neuroembryology and Aging*, v. 4,n. 4, p. 183-188, 2006.

SHALABY, W. S. *et al.* Current and new pharmacotherapeutic approaches for glaucoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 21, n. 16, p. 2027-2040, 2020.

SHANG, Y. M. *et al.* Light-emitting-diode induced retinal damage and its wavelength dependency *in vivo*. *International Journal of Ophthalmology*, v.10 ,n. 2, p. 191-202, 2017.

SHANG, Y. M. *et al.* White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environmental Health Perspectives*, v. 122, n. 3, p. 269-276, 2014.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. v. 122,n. 3, p. 269-273, 2007.

SHEN, H. *et al.* The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides against NMDA-induced cell apoptosis in cultured hippocampal neurons through differential modulation of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Brain Research Bulletin*, v. 7,n. 55, p. 274-281, 2008.

SHEN, J. K. *et al.* Oxidative damage in age-related macular degeneration. *Histology and Histopathology*, v. 22, n. 12, p. 1301-1308, 2007.

SHI, Z. *et al.* Neuroprotective mechanisms of *Lycium barbarum* polysaccharides against ischemic insults by regulating NR2B and NR2A containing NMDA receptor signaling pathways. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, n. 288, 2017.

SHINDE, A.; GARALA, K.; MORE, H. N. Development and characterization of transdermal therapeutics system of tramadol hydrochloride. *Asian Journal of Pharmaceutics*, v. 2, s.n., p. 265, 2008.

SHOJAEI, F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: Current challenges and future perspectives. *Cancer Letters*. v. 320, n. 2, p. 130-137, 2012.

- SIGURDSSON, H. H. *et al.* Topical and systemic absorption in delivery of dexamethasone to the anterior and posterior segments of the eye. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, v. 85, n. 6, p. 598-602, 2007.
- SILIPRANDI, R. *et al.* N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Visual Neuroscience*, v. 8, n. 6, p. 567-573, 1992.
- SILVA, C. N. da *et al.* A new topical eye drop containing lyetxi-b, a synthetic peptide designed from a *lycosa erithrognata* venom toxin, was effective to treat resistant bacterial keratitis. *Toxins*, v. 11, n. 4, p. 203, 2019.
- SILVA, CAROLINA NUNES DA. PnPP-19, um peptídeo desenhado a partir de uma toxina da aranha armadeira, potencializa a função erétil via NO/GMPc em animais normotensos, hipertensos e diabéticos. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- SILVA, F. R. da *et al.* Intravitreal injection of the synthetic peptide LyeTx i b, derived from a spider toxin, into the rabbit eye is safe and prevents neovascularization in a chorio-allantoic membrane model. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 24, n. 31, 2018.
- SILVA, F. R. *et al.* N-type Ca²⁺ channels are affected by full-length mutant huntingtin expression in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 50, s.n., p. 1-10, 2017.
- SILVA, F. R. *et al.* The *Phoneutria nigriventer* spider toxin, PnTx4-5-5, promotes neuronal survival by blocking NMDA receptors. *Toxicon*, v. 112, s.n., p. 16-21, 2016.
- SINGANAYAGAM, A. *et al.* Inhaled corticosteroid suppression of cathelicidin drives dysbiosis and bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Science Translational Medicine*, v. 11, n. 507, p. eaav3879, 2019.
- SINGH, B.; PAL, L. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 9, s.n., p. 9-21, 2012.
- SIVAPATHASUNTHARAM, C. *et al.* Improving mitochondrial function significantly reduces the rate of age related photoreceptor loss. *Experimental Eye Research*, v. 185, 2019.
- SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 3, p. 1107-1112, 1990.
- SPARROW, J. R. *et al.* Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-Induced damage to A2e-laden RPE. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 43, s.n., p. 1212-1227, 2002.
- STARK, W. S.; WALKER, K. D.; EIDEL, J. M. Ultraviolet and blue light induced damage to the drosophila retina: Microspectrophotometry and electrophysiology. *Current Eye Research*, v. 4, n. 10, p. 1059-1075, 1985.
- STEILING, W. *et al.* The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in Vitro*, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.
- STOCKTON, R; SLAUGHTER, M. M. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *The Journal of General Physiology*, v. 93, n. 1, p. 101-122, 1989.

- STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *European Journal of Pharmacology*, v. 447, n. 2-3, p. 285-296, 2002.
- SUGIMOTO, M. A. A. *et al.* Quality of bevacizumab (Avastin®) repacked in single-use glass vials for intravitreal administration. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 80, n. 2, p. 108-113, 2017.
- SUN, Y. *et al.* Pre-exposure to low-power diode laser irradiation promotes cytoprotection in the rat retina. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 1, p. 127-133, 2014.
- SUPURAN, C. T. The management of glaucoma and macular degeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 29, n. 10, p. 745-747, 2019.
- SUTTER, E. E.; TRAN, D. The field topography of ERG components in man-I. The photopic luminance response. *Vision Research*, v. 32, n. 3, p. 443-446, 1992.
- SZABO, M. E. *et al.* Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina: Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 32, n. 5, p. 1471-1478, 1991.
- TELEGINA, D. V.; KOZHEVNIKOVA, O. S.; KOLOSOVA, N. G. Changes in Retinal Glial Cells with Age and during Development of Age-Related Macular Degeneration. *Biochemistry (Moscow)*. v. 83, n. 9, p. 1009-1017, 2018.
- THAM, Y. C. *et al.* Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, v. 121, n. 11, p. 2081-2090, 2014.
- THORESON, W. B.; WITKOVSKY, P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research* v. 18, n. 6, p. 765-810, 1999.
- THRIMAWITHANA, T. R. *et al.* Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today*. v. 16, n. 5-6, p. 270-277, 2011.
- TODA, N.; NAKANISHI-TODA, M. Nitric oxide: Ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*. v. 26, n. 3, p. 205-238, 2007.
- TOLEDO, C. R. *et al.* Corosolic acid: antiangiogenic activity and safety of intravitreal injection in rats eyes. *Documenta Ophthalmologica*, v. 138, n. 3, p. 181-194, 2019.
- TORTORA, G. J. *Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. 10 ed. Artmed Editora, 2003.
- TRAYNELIS, S. F. *et al.* Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*. v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010.
- TSAI, J.; GRAY, M.J.;CAVALLERANO, T. Nitric oxide in glaucoma : What Clinicians Need to Know. Candeo Clinical/Science Communications, LLC, , White Plains, NY , 2017.
- TUFAN, A. C.; SATIROGLU-TUFAN, N. L. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Current cancer drug targets*, v. 5, n. 4, p. 249-66, 2005.
- URTTI, A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 58, n. 11, p. 1131-1135, 2006.

- URTTI, A.; SALMINEN, L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Survey of Ophthalmology*. v. 37, n. 6, p. 435-456, 1993.
- URTTI, A.; SALMINEN, L.; MIINALAINEN, O. Systemic absorption of ocular pilocarpine is modified by polymer matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 23, n. 2, p. 147-161, 1985.
- VAJDA, F. J. E. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Neuroscience*. v. 9, n. 1, p. 408, 2002.
- VARELA-FERNÁNDEZ, R. *et al.* Drug delivery to the posterior segment of the eye: Biopharmaceutic and pharmacokinetic considerations. *Pharmaceutics*. v. 12, n. 3, p. 269, 2020.
- VARSHOCHIAN, R. *et al.* Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 103, n. 10, p. 3148-3156, 2015.
- VARSHOCHIAN, R. *et al.* The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 3-4, p. 341-352, 2013.
- VARUM, F. O. *et al.* Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.
- VASUDEVAN, S. K.; GUPTA, V.; CROWSTON, J. G. Neuroprotection in glaucoma. 2011, v. 59, n.s1, p. s102-s113, 2011.
- VECCHI, C. F.; DOS SANTOS, R. a S.; BRUSCHI, M. L. Technological development of mucoadhesive film containing poloxamer 407, polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone for buccal metronidazole delivery. *Therapeutic Delivery*, v. 7, n. 11, 2020.
- VELLONEN, K. S. *et al.* Expression, activity and pharmacokinetic impact of ocular transporters. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 126, p. 3-22, 2018.
- VIEIRA, L. B. *et al.* Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 304, n. 3, p. 1370-1377, 2005.
- VILLANOVA, F. E. *et al.* Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon*, v. 54, n. 6, p. 793-801, 2009.
- VINORES, S. A. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *International Journal of Nanomedicine*. v. 1, n. 3, p. 263-268, 2006.
- WADHWA, A.; MATHURA, V.; LEWIS, S. A. Emerging Novel Nanopharmaceuticals for Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 11, n. 7, p. 35, 2018.
- WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 100, n. s1, p. 5-9, 2005.
- WANG, C. H. *et al.* Extended release of bevacizumab by thermosensitive biodegradable and biocompatible hydrogel. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 1, p. 40-48, 2012.

- WANG, J. Q.; FIBUCH, E. E.; MAO, L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*. v. 100, n. 1, p. 1-11, 2007.
- WANG, X. *et al.* Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*, v. 31, n. 6, p. 1025-1035, 2010.
- WANG, Y. *et al.* IGF-1 Alleviates NMDA-Induced Excitotoxicity in Cultured Hippocampal Neurons Against Autophagy via the NR2B/PI3K-AKT-mTOR Pathway. *Journal of Cellular Physiology*, v. 229, n. 11, p. 1618-1629, 2014.
- WANG, Y. *et al.* Multifunctional carboxymethyl chitosan derivatives-layered double hydroxide hybrid nanocomposites for efficient drug delivery to the posterior segment of the eye. *Acta Biomaterialia*, v. 104, s.n., p. 104-114, 2020.
- WANG, Y. *et al.* Recent advance of nanoparticle-based topical drug delivery to the posterior segment of the eye. *Expert Opinion on Drug Delivery*. v. 15, n. 7, p. 687-701, 2018.
- WANG, Y. *et al.* Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE*, v. 3, n. 9, p. e3217, 2008.
- WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Die Naturwissenschaften*, v. 29, s.n., p. 589-590, 1941.
- WAREHAM, L. K. *et al.* Increased bioavailability of cyclic guanylate monophosphate prevents retinal ganglion cell degeneration. *Neurobiology of Disease*, v. 121, s.n., p. 65-75, 2019.
- WEINREB, R. N.; AUNG, T.; MEDEIROS, F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. v. 311, n. 18, p. 1901-1911, 2014.
- WETZEL, W. Ocular aqueous humor dynamics after photodisruptive laser surgery procedures. *Ophthalmic surgery*, v. 25, n. 5, p. 298-302, 1994.
- WIEDERHOLT, M.; STURM, A.; LEPPLE-WIENHUES, A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 19, n. 3, p. 271-295, 1994.
- WIELGUS, A. R. *et al.* Blue light induced A2E oxidation in rat eyes - Experimental animal model of dry AMD. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 9, n. 11, p. 1505-1512, 2010.
- WILHELMUS, K. R. The Draize eye test. *Survey of ophthalmology*. v. 45, n. 6, p. 493-515, 2001.
- WINK, D. A. *et al.* Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants and Redox Signaling*. v. 3, n. 2, p. 203-213, 2001.
- WITTING, M. *et al.* Recent advances in topical delivery of proteins and peptides mediated by soft matter nanocarriers. *Biotechnology Advances* v. 33, n. 6, p. 1355-1369, 2015.
- WONG, W. L. *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, v. 2, n. 2, p. e106-116, 2014.
- WORAKUL, N.; ROBINSON, J. R. Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics. v. 44, n. 1627, p. 71-83, 1997.
- WU, J. *et al.* Blue light induced apoptosis in rat retina. *Eye*, 1999.

- WU, J.; SEREGARD, S.; ALGVERE, P. V. Photochemical Damage of the Retina. *Survey of Ophthalmology*. v. Pt4, s.n., p. 583, 2006.
- XU, J *et al.* Permeability and diffusion in vitreous humour: implications for drug delivery. *Pharm. Res.*, v. 17, n. 6, p. 664-669, 2000.
- XU, K; J., Y; QU, X. Purification and characterization of an antibacterial peptide from venom of *lycosa singoriensis*. *Acta Zoologica Sinica*, s.n., 1989.
- XU, L. *et al.* Pharmacokinetics of ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration: A population approach. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 54, n. 3, p. 1616-1624, 2013.
- YAMAMOTO, N. *et al.* VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Scientific Reports*, v. 10, n. 2744, 2020.
- YAMAMOTO, R. *et al.* The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience*, v.10, n. 2744, 1993.
- YAMAMURA, K. *et al.* Characterization of ocular pharmacokinetics of beta-blockers using a diffusion model after instillation. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 10, p. 1596–1601, 1999.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998.
- YANDRAPU, S. K. *et al.* Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, n. 12, p. 4676-4686, 2013.
- YANG, X. *et al.* IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways. *Molecular Vision*, v. 19, s.n., p. 1901-1912, 2013.
- YE, Z. *et al.* Pharmacokinetics and distributions of bevacizumab by intravitreal injection of bevacizumab- PLGA microspheres in rabbits. *International Journal of Ophthalmology*, v. 8, n. 4, p. 653-658, 2015.
- YELLEPEDDI, V. K.; PALAKURTHI, S. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. v. 32, n. 2, p. 62-87, 2016.
- YONAMINE, C. M.; TRONCONE, L. R. P.; CAMILLO, M. A. P. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon*, v. 44, n. 2, p. 169-172, 2004.
- YU, Y. *et al.* Injectable Chemically Crosslinked Hydrogel for the Controlled Release of Bevacizumab in Vitreous: A 6-Month *In Vivo* Study. *Translational Vision Science & Technology*, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2015.
- YUAN, X. *et al.* Ocular drug delivery nanowafer with enhanced therapeutic efficacy. *ACS Nano*, v. 9, n. 2, p. 1749-1758, 2015.
- ZARBIN, M. A. Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology*, v. 122, s.n., p. 598-614, 2004.
- ZELIKIN, A. N.; EHRHARDT, C.; HEALY, A. M. Materials and methods for delivery of biological drugs. *Nature Chemistry*, v. 8, n. 11, p. 997-1007, 2016.

ZHANG, W.; PRAUSNITZ, M. R.; EDWARDS, A. Model of transient drug diffusion across cornea. *Journal of Controlled Release*, v. 99, n. 2, p. 241-258, 2004.

Anexo 1: Comprovante de cadastro do projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (nº AF2229D)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AF2229D

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AF2229D**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Phoneutria nigriventer

Título da Atividade: **Efeito neuroprotetor do peptídeo sintético PnPa11 em doenças da retina**

Equipe

Armando da Silva Cunha Junior 45256683691 M2606: Universidade Federal de Minas Gerais
Carolina Nunes da Silva Universidade Federal de Minas Gerais
Lays Fernanda Nunes Dourado Universidade Federal de Minas Gerais
Maria Elena de Lima Perez Garcia Santa Casa de Belo Horizonte: Ensino e Pesquisa

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Tese de Doutorado - Lays Fernanda Nunes Dou**

Data do Cadastro: **24/03/2021 12:30:03**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:31** de **24/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 2: Comprovante de cadastro do projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (n° AB43F20)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº AB43F20

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AB43F20**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Phoneutria nigriventer

Título da Atividade: **Efeito neuroprotetor do peptídeo sintético PnPa13 em doenças da retina**

Equipe

Armando da Silva Cunha Junior 45256683691 M2606: Universidade Federal de Minas Gerais
Carolina Nunes da Silva Universidade Federal de Minas Gerais
Lays Fernanda Nunes Dourado Universidade Federal de Minas Gerais
Maria Elena de Lima Perez Garcia Santa Casa de Belo Horizonte: Ensino e Pesquisa

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Tese de Doutorado - Lays Fernanda Nunes Dou**

Data do Cadastro: **24/03/2021 12:40:19**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:40** de **24/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 3: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 325/2017)

 UFMG	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p style="text-align: center;">CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Prezado(a):</p>	
<p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p>	
<p>Protocolo CEUA: 325/2017</p>	
<p>Título do projeto: Avaliação da segurança da administração intravítrea das toxinas PnTx4(5-5) e PnTx4(6.1) provenientes do veneno da aranha armadeira Phoneutria Nigriventer em olhos de ratos.</p>	
<p>Finalidade: Pesquisa</p>	
<p>Pesquisador responsável: Armando da Silva Cunha Junior</p>	
<p>Unidade: Faculdade de Farmacia</p>	
<p>Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos</p>	
<p>Situação atual: Decisão Final - Aprovado</p>	
<p>Aprovado na reunião do dia 27/11/2017. Validade: 27/11/2017 à 26/11/2022</p>	
<p>Belo Horizonte, 27/11/2017.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>	
<p>Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</p>	
<p style="text-align: center;">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) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br</p>	

Anexo 4: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 107/2018)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade neuroprotetora de peptídeos derivados das toxinas PnTx4(5-5) e PnTx4(5.1) provenientes do veneno da aranha armadeira Phoneutria Nigriventer em olhos de ratos", protocolo do CEUA: 107/2018 sob a responsabilidade de Armando da Silva Cunha Junior que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	8
Peso/Idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	8
Peso/Idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	8
Peso/Idade	200g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023
------------	--

Belo Horizonte, 01/03/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Anexo 5: Comprovante de cadastro do projeto no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (n° A9C5260)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A9C5260

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A9C5260**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Phoneutria nigriventer

Título da Atividade: **Efeito neuroprotetor do peptídeo sintético PnPP19 em doenças da retina**

Equipe

Armando da Silva Cunha Junior 45256683691 M2606: Universidade Federal de Minas Gerais
Carolina Nunes da Silva Universidade Federal de Minas Gerais
Lays Fernanda Nunes Dourado Universidade Federal de Minas Gerais
Maria Elena de Lima Perez Garcia Santa Casa de Belo Horizonte: Ensino e Pesquisa

Parceiras Nacionais

16.828.860/0001-58 / Biozeus Biopharmaceuticals SA

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Anexo 6: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 203/2018)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 203/2018

Título do projeto: Avaliação da atividade antiglaucomatosa e neuroprotetora de peptídeos derivados da toxina PnTx2-6 provenientes do veneno da aranha armadeira Phoneutria nigriventer em olhos de ratos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Armando da Silva Cunha Junior

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 09/07/2018. Validade: 09/07/2018 à 08/07/2023

Belo Horizonte, 09/07/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 7: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 171/2019)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UFMG	CEUA
	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 171/2019	
Título do projeto: Avaliação da toxicidade atividade antiglaucomatosa de peptídeos derivados da toxina PnTx2-6 provenientes do veneno da aranha armadeira Phoneutria nigriventer em olhos de ratos	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Armando da Silva Cunha Junior	
Unidade: Faculdade de Farmacia	
Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 19/08/2019. Validade: 19/08/2019 à 18/08/2024	
Belo Horizonte, 19/08/2019.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG	
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
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) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	

Anexo 8: Certificado de aprovação do protocolo do estudo *in vivo* pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (n° 198/2020)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 198/2020

Título do projeto: O uso de um dispositivo de liberação controlada para potencializar a atividade antiglaucomatosa e neuroprotetora de peptídeos derivados da toxina PnTx2-6 provenientes do veneno da aranha armadeira Phoneutria nigriventer em olhos de ratos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Armando da Silva Cunha Junior

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Produtos Farmaceuticos

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião on-line do dia 09/11/2020. Validade: 09/11/2020 à 08/11/2025
Belo Horizonte, 09/11/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 9: Publicação relacionada ao trabalho

RESEARCH

OPEN ACCESS



Journal of
Venomous Animals and Toxins
including Tropical Diseases

ISSN 1678-9199

www.jvat.org

Intravitreal injection of peptides PnPa11 and PnPa13, derivatives of *Phoneutria nigriventer* spider venom, prevents retinal damage

Lays Fernanda Nunes Dourado^{1,*}, Flavia Rodrigues da Silva^{1,2}, Cibele Rodrigues Toledo¹,
Carolina Nunes da Silva¹, Cleildo Pereira Santana¹, Bruna Lopes da Costa¹, Maria Elena de Lima³,
Armando da Silva Cunha Junior¹

¹School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

²National Institute of Science and Technology in Pharmaceutical Nanotechnology, São Paulo, SP, Brazil.

³Graduate Program in Health Sciences: Medicine and Biomedicine, Institute of Education and Research, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Keywords:

Phoneutria nigriventer
Neuroprotection
Retinal diseases
Toxicity
Blue LED
Synthetic peptides

Abstract

Background: PnPa11 and PnPa13 are synthetic peptides derived from *Phoneutria nigriventer* spider venom, which display antinociceptive and neuroprotective properties. In this work, we evaluated the safety of intravitreal use and the neuroprotective effect of these peptides.

Methods: The cytotoxicity and the antiangiogenic activity of these peptides were evaluated by the sulforhodamine-B method and chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay, respectively. The *in vivo* safety was analyzed in Wistar rats that were intravitreally injected with different doses (0.50; 1.25; 2.50; 3.75 and 5.00 µg/mL) of these peptides (right eye, n = 6). The retinal function was assessed by electroretinography exams (ERG), intraocular pressure (IOP), and histological analyzes. In order to investigate the neuroprotective effect, Wistar rats received intravitreal injections (right eye, n = 6) of peptides at 1.25 µg/mL and then were exposed to blue LED light. In addition, the visual function and the retinal microstructure were verified.

Results: Cytotoxicity analyses demonstrated that the peptides did not present any toxicity over ARPE-19 (adult retinal pigmented epithelial) cell line and the antiangiogenic study highlighted that the peptides promoted the reduction of blood vessels. The intravitreal injection did not cause major changes, neither induced any irreversible damage. In the retinal degeneration assay, the ERG records demonstrated that the prior treatment with PnPa11 and PnPa13 protected the retina from damage. Morphological analyses confirmed the ERG findings. Immunoblotting analyses revealed that PnPa11 increased Erk1/2, NR2A, and NR2B retinal expression after the light stress model, but did not cause Akt1 activation, while PnPa13 prevented Erk1/2 and Akt1 dephosphorylation.

Conclusions: The intraocular administration of these peptides was well tolerated and presented protective activity against retinal degeneration, suggesting the potential use of these peptides as neuroprotectors in the ophthalmological field.

* Correspondence: laysndourado@gmail.com

<https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0031>

Received: 07 March 2020; Accepted: 18 August 2020; Published online: 23 September 2020



On-line ISSN 1678-9199 © The Author(s). 2020 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.