

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DO CITRATO DE SILDENAFILA SOBRE A
NEUROPROTEÇÃO NA NEUROPATIA ÓPTICA, EM RATOS
(Lewis/SsNHsd) COM GLAUCOMA AGUDO**

Germana Alegro da Silva

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITOS DO CITRATO DE SILDENAFILA SOBRE A
NEUROPROTEÇÃO NA NEUROPATIA ÓPTICA, EM RATOS
(Lewis/SsNHsd) COM GLAUCOMA AGUDO

Germana Alegro da Silva

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Laus

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

2014

S586e Silva, Germana Alegro da
Efeitos do Citrato de Sildenafil sobre a neuroproteção na
neuropatia óptica, em ratos (Lewis/SsNHsd) com glaucoma agudo /
Germana Alegro da Silva. – – Jaboticabal, 2014
xiv, 71 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: José Luiz Laus
Banca examinadora: Renée Laufer Amorim, Andréia Vitor Couto do
Amaral

Bibliografia

1. Células ganglionares da retina (CGR). 2. Glaucoma agudo. 3.
Neuroproteção. 4. Ratos. 5. Sildenafil. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:599.323

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DO CITRATO DE SILDENAFILA SOBRE A NEUROPROTEÇÃO NA
NEUROPATIA ÓPTICA, EM RATOS (Lewis/SsNHsd) COM GLAUCOMA AGUDO

AUTORA: GERMANA ALEGRO DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE LUIZ LAUS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE LUIZ LAUS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Profa. Dra. ANDRÉIA/VITOR COUTO DO AMARAL

Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Data da realização: 30 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Germana Alegro da Silva nasceu na cidade de Sorocaba, São Paulo, no dia 21 de outubro de 1985. Estudou, o ensino fundamental e médio, no Colégio Objetivo de Sorocaba, onde se formou no ano de 2004. Em conjunto, nos anos 2002 e 2003 cursou Técnico em Nutrição em Dietética, obtendo seu título em 2004, pela Escola Técnica Estadual Rubens de Faria e Souza - Centro Paula Souza. Ingressou na Universidade Federal de Lavras, do estado de Minas Gerais, no ano 2005, instituição que lhe outorgou o título de Médica Veterinária no ano de 2011. Depois, realizou Treinamento Técnico, com bolsa de estudos financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no ano 2011, na Unidade de Oftalmologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP de Jaboticabal) sob a supervisão do Prof. Dr. José Luiz Laus. Em 2012 ingressou à pós-graduação na mesma Instituição desenvolvendo seus estudos de mestrado com participação e desenvolvimento de projetos de pesquisas científicas desenvolvidas pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. José Luiz Laus. Realizou treinamento no Serviço de Oftalmologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Laus, e realizou treinamento e desenvolvimento de pesquisa nos Laboratórios de Histologia e Imuno-histoquímica do Setor de Patologia Veterinária, da FMVZ/UNESP de Botucatu, sob supervisão da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, nos anos de 2013 e 2014.

*“Suba o primeiro degrau com fé, não é necessário que você veja toda a escada,
apenas dê o primeiro passo”*

Martin Luther King

Aos meus pais, ao meu irmão e à toda minha família dedico.

AGRADECIMENTOS

A meus pais e meu irmão, pelo apoio, pela força que sempre deram para nunca desistir, por me acalmar, me distrair, pela paciência e palavras pra me manterem em pé e me sentir grande e capaz. Tudo o que eu sei e sou é graças à educação e carinho que sempre tive. Amo vocês.

Ao Professor Laus pela oportunidade que me deu, por abrir as portas da pós-graduação e do Serviço, pelos conselhos, broncas e amizade, que me deram lições que fizeram com que eu tenha-me amadurecido como pesquisadora, profissional e como pessoa e, principalmente, por concretizar meu sonho em Oftalmologia Veterinária.

À profa. Reneé, primeiramente, por me receber com tanto carinho e me acolher como membro de seu grupo, pela colaboração em meu trabalho, pelos aprendizados em patologia que agregaram muito minha vida acadêmica e profissional.

Ao prof. Ron Ofri e à Rayaa pela colaboração e pela oportunidade de um trabalho conjunto, além da possibilidade de aprofundarmos nossos estudos numa linha de pesquisa promissora.

À Professora Paola e à Marcela que aceitaram o convite para minha qualificação e cujas sugestões contribuíram com a melhoria de meu trabalho.

Ao Miguel, pelo amor, pela paciência, companheirismo e conselhos que me deram forças para chegar aqui.

A toda minha família, em especial minha Madrasta Valéria e minha irmã Isabela, pessoas que se tornaram parte de minha família e essenciais em meu caminho. Além de, minhas tias, Ednéa, Marisa, Marilei, Silvia, meus tios, Edvaldo, Márcio, Mauro, Geraldo, Roberto, meus primos Tamyres e Tássio, Giovani e Milena, Jenifer, Murilo, Matheus e Isabela.

À senhora Madalena e esposo Mario, suas orações e pensamentos cuidaram de mim todos os dias.

À família do Denis, que me recebeu e me adotou em Botucatu, pelos cuidados e carinhos que me confortaram durante momentos difíceis deste caminho e por aceitarem também a Kiki como mais um membro da casa, à Deiva, Aldo, Samuel e as cachorrinhas Kelly e Luli. À Camila e esposo Rafael pela filha Júlia (Juju), que me proporcionou momentos inesquecíveis. Além da companhia e amizade da Sandra, Celso e dona Célia, Ana, Marcos e Gabriela, Leda e Mariana.

Ao pessoal de oftalmo de Jaboticabal e da patologia de Botucatu, por todo apoio recebido. Em especial, na oftalmo, aos companheiros de atendimento Tiago e Camila (Bia), à amizade da Luciana e da Gisele, aos aprendizados com Alexandre (Dedo), Luciano, Ivan e Roberta Renzo, e a trocas de experiências com Alexandre (Antonio), Karina (China), Roberta (Tititi). E da patologia pelos conselhos, amizade e suporte do Luis e da Talita, e pelo companheirismo da Marília, da Érika e da Rosana.

Agradeço infinitamente à Andréia, uma verdadeira mãe, guia e amiga neste mundo de investigação científica e na minha vida pessoal, e ao Diogo por ser meu braço direito em todo experimento, aguentando meu estresse com uma sábia leveza, sem eles eu não teria conseguido.

A todos os técnicos, funcionários e demais professores de ambas Instituições, que de maneira direta ou indireta contribuíram ao sucesso da pesquisa e ao meu crescimento.

À FAPESP pelo auxílio pesquisa e ao CNPq pela bolsa de estudos.

Aos meus pacientes e proprietários, que fazem com que cada dia eu goste mais de meu trabalho, de animais e de pessoas e que sinta orgulho todos os dias de minha escolha como Médica Veterinária e Oftalmologista.

Aos pequenos ratinhos, cujas vidas foram doadas em prol desta pesquisa, sua vida vale mais que a vida de qualquer um de nós.

Meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO COMISSÃO ÉTICA DO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Glaucoma	3
2.2 Apoptose	5
2.3 Neuroproteção	7
2.4 Inibidores da fosfodiesterase e ação vasodilatadora ocular	9
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Considerações quanto à ética	12
4.2 Animais	12
4.3 Grupos e protocolos experimentais	13
4.4 Coleta, armazenamento e preparação das amostras	16
4.5 Morfometria e histologia	16
4.6 Imuno-histoquímica	20
4.7 Teste de <i>TUNEL</i>	22
4.8 Estatística	23
5. RESULTADOS	23
5.1 Morfometria e histologia	23
5.2 Imuno-histoquímica	35
5.3 Teste de <i>TUNEL</i>	46
6. DISCUSSÃO	48

7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS	57

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
Animais (CEUA) da FCAV/UNESP (Protocolo nº 009328-13)**

EFEITOS DO CITRATO DE SILDENAFILA SOBRE A NEUROPROTEÇÃO NA NEUROPATIA ÓPTICA, EM RATOS (*Lewis/SsNHsd*) COM GLAUCOMA AGUDO

RESUMO – Projetam-se que mais de 80 milhões de pessoas no mundo e um número significativo de animais serão atingidos pelo glaucoma até o final desta década. A doença perpetra-se como sem solução, obrigando a que se desenvolvam alternativas terapêuticas mais eficazes. A perda de visão decorre da morte de células ganglionares da retina (CGR) e de seus axônios, que compõem as fibras do nervo óptico. Avanços na compreensão da fisiopatologia evidenciam que isquemia local e que anormalidades de perfusão são condições decisivas na patogênese da neuropatia. Mostrou-se que o Sildenafil, fármaco vasodilatador, inibe a fosfodiesterase do tipo 5 (PDE-5), aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclica, prolonga efeitos do óxido nítrico (ON) e aumenta a sobrevivência celular em modelos de lesão isquêmica. Objetivou-se avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento citrato de sildenafil em ratos com hipertensão ocular aguda induzida, à histopatologia e à morfometria da retina e quanto à avaliação da expressão de marcadores relacionados à sobrevivência das CGR, empregando-se a imunohistoquímica (IHC) e a marcação *TUNEL*. Os Parâmetros histológicos observados foram: alterações celulares, vasculares e teciduais e os morfométricos foram: espessura das camadas da retina e contagem de células ganglionares. À IHC, observou-se a marcação da caspase-9, da caspase-3, do Bcl-2, da NOS-2, da PDE-5, e da PDE-6. Foram avaliados olhos de 27 ratos, machos, adultos (*Lewis/SsNHsd*). Compuseram-se cinco grupos, um grupo controle composto por 3 animais, sem glaucoma e sem tratamento, e quatro grupos tratados compostos, cada um, por 6 animais com glaucoma agudo unilateral induzido, dos quais 3 foram tratados com Sildenafil e 3 tratados com placebo. Esses grupos foram separados conforme dia de indução do glaucoma até a eutanásia, em 1, 13, 14 e 20 dias, e receberam diferentes doses e períodos de tratamento. A indução do glaucoma agudo deu-se por paracentese da câmara anterior com agulha 30G acoplada a um frasco de solução fisiológica 0,9%, disposto à altura de 150 cm do olho, a PIO foi avaliada com tonometria de rebote e mantida próxima à 70 mmHg, durante 60 minutos. Resultados histopatológicos foram avaliados de forma descritiva, enquanto que os estudos morfométricos foram comparados por meio de ANOVA e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). As avaliações, relativamente à IHC e à marcação pelo teste de *TUNEL* foram descritivas. A maioria das alterações histológicas foi encontrada em olhos hipertensos, comparados com normotensos, especialmente nos animais tratados com placebo. Na camada de células ganglionares, picnose, hipoplasia celular, congestão vascular e infiltrado inflamatório foram observados. Além disso, houve degeneração de todas as camadas da retina. A morfometria revelou uma diminuição significativa na espessura de todas as camadas da retina, exceto a camada de fotorreceptores, em olhos de todos os grupos de hipertensos. Uma diminuição no número de células ganglionares de animais tratados com placebo, em comparação com os animais tratados com sildenafil ($P < 0,05$), também foi notada. À IHC a caspase-9 foi maior no grupo 13 dias, sem diferença entre os grupos sildenafil e placebo. A caspase-3 foi menos expressa nos tratados com sildenafil. O Bcl-2 apresentou maior marcação em olhos glaucomatosos, sendo mais intensa em animais dos grupos sildenafil. A NOS-2 diminuiu em expressão e em

intensidade, em olhos com glaucoma, comparativamente aos controles, sem diferença entre placebo e sildenafil. A PDE-5 diminui a sua expressão em animais tratados com sildenafil. A PDE-6 não apresentou constância no padrão de expressão nos diferentes grupos. A expressão das caspases foi maior nos olhos glaucomatosos. À marcação *TUNEL*, observou-se maior número de células apoptóticas em olhos com glaucoma de animais tratados com placebo. Levando-se em conta as injunções do meio e as condições impostas aos protocolos da pesquisa, é possível admitir que a sobrevivência de células ganglionares da retina em olhos de animais tratados com o fármaco foi maior, comparativamente a indivíduos que receberam somente solução fisiológica como tratamento.

Palavras-chave: ratos, células ganglionares da retina (CGR), glaucoma agudo, neuroproteção, ratos, Sildenafil

EFFECTS OF SILDENAFIL CITRATE ON NEUROPROTECTION IN OPTIC NEUROPATHY IN RATS (Lewis/SsNHsd) WITH ACUTE GLAUCOMA

ABSTRACT - Protrude more than 80 million people worldwide and a significant number of animals are affected by glaucoma by the end of this decade. The disease perpetrates as unresolved, forcing them to develop more effective therapeutic alternatives. Vision loss results from the death of retinal ganglion cells (RGCs) and their axons, the fibers that make up the optic nerve. Advances in understanding the pathophysiology show that local ischemia and perfusion abnormalities are critical in the pathogenesis of neuropathy conditions. It has been shown that sildenafil drug vasodilator, inhibits phosphodiesterase type 5 (PDE -5) increases the levels of cyclic guanosine monophosphate extends effects of nitric oxide (NO) and increases cell survival in models of ischemic injury. Aimed to evaluate the neuroprotective effect of sildenafil citrate treatment in rats with induced acute ocular hypertension, by histopathological and morphometric examination of the retina and the evaluation of the expression of markers related to RGC survival , using immunohistochemistry (IHC) and TUNEL labeling. The observed histological parameters: cellular , tissue and vascular and morphometric changes were: thickness of the layers of the retina and ganglion cell count , IHC, there was labeling of caspase-9, caspase-3, Bcl-2, NOS-2, PDE-5, and PDE-6. Eyes of 27 rats, adult (Lewis/ SsNHsd) were evaluated after acute unilateral elevation of intraocular pressure (IOP). Composed by five groups , a control group of 3 animals without glaucoma and untreated and four treated groups consisting of 6 animals with induced unilateral acute glaucoma, of which 3 were treated with Sildenafil and 3 with placebo, these groups were separated by days of glaucoma's induction to euthanasia, and they received districts dose and period of treatment. The induction of glaucoma was made by anterior chamber paracentesis needle attached to a bottle of saline solution 0.9 %, provided the height of 150 cm from the eye, 30G IOP was assessed with rebound tonometry and maintained close to 70 mmHg for 60 minutes. Histopathological findings were evaluated descriptively, while morphometric studies were compared by ANOVA and Bonferroni post-test ($p<0,05$). The relatively HCI and reviews have descriptive TUNEL labeling. Most histological changes were found in hypertensive eyes compared with normotensive, especially in untreated animals. In ganglion cells, pyknosis, cell hypoplasia, vascular layer congestion and inflammatory infiltrate were observed. Furthermore, there was degeneration of all retinal layers. The morphometry revealed a significant decrease in the thickness of all retinal layers except the photoreceptor layer in eyes of all groups of hypertensive patients. A decrease in the number of ganglion cells in untreated animals compared to animals treated with sildenafil ($p<0,05$) was also observed. IHC for Caspase-9 was higher in the 13 days, with no difference between treated and untreated. Caspase-3 was less expressed in the treaties. The Bcl-2 showed stronger staining in glaucomatous eyes, being more intense in treated animals. NOS-2 expression and decreased in intensity in eyes with glaucoma compared to controls, with no difference between treated and untreated. PDE-5 decrease its expression in treated animals. The PDE-6 showed no consistency in the pattern of expression in the different groups. The expression of caspases was higher in glaucomatous eyes. For TUNEL labeling, we observed a higher number of apoptotic cells in eyes with glaucoma untreated animals. With the

injunctions of the medium and the conditions imposed on the research protocols, it is possible to admit that the survival of retinal ganglion cells in eyes of sildenafil treated animals was higher compared to individuals treated with placebo.

Keywords: retinal ganglionar cels, acute glaucoma, neuroprotection, rats, Sildenafil

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
ARVO	<i>National Institutes of Health Publications</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ⁺	cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGR	células ganglionares da retina
DNA	ácido desoxirribonucleico
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	Gauss
GMPc	monofosfato de guanosina cíclica
HE	técnica de coloração em hematoxilina e eosina
I/R	isquemia/reperfusão
IHC	imuno-histoquímica
NMDA	n-methyl-d-aspartato
NOS-2	óxido nítrico sintase 2
OCT	tomografia de coerência óptica
ON	óxido nítrico
PACG	glaucoma primário de ângulo fechado
PCG	glaucoma primário congênito
PDE-5	fosfodiesterase do tipo 5
PDE-6	fosfodiesterase do tipo 6
PIO	pressão intra-ocular
POAG	glaucoma primário de ângulo aberto
TNFr	receptor de fator de necrose tumoral
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VDF	velocidade diastólica final
VSM	velocidade sistólica máxima

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Protocolo de Tratamento: discriminação quanto à denominação do grupo, quanto à dose de sildenafil administrada e quanto ao período de tratamento. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	14
Tabela 2.	Descrição da numeração dos ratos utilizados, do olho escolhido em sorteio aleatório para a indução do glaucoma, do tempo de manutenção da PIO elevada, dos valores de PIO avaliados logo após indução do glaucoma e da manutenção dos indivíduos após a indução até a eutanásia. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	15
Tabela 3.	Imunomarcção dos anticorpos Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, NOS-1, NOS-2, PDE-5, e PDE-6, em retina. Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) da linhagem <i>Lewis/SsNHsd</i> , machos, adultos, hípidos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	21
Tabela 4.	Classificação da imunomarcção e da marcação TUNEL, por índice semi-quantitativo em retina. Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>), da linhagem <i>Lewis/SsNHsd</i> , machos, adultos, hípidos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	22
Tabela 5.	Valores médios (média e desvio padrão) do quantitativo de células da camada de célula ganglionares da retina, das espessuras das camadas de células ganglionares da retina, da plexiforme interna, da nuclear interna, da plexiforme externa, da nuclear externa, de fotorreceptores, e de toda retina, em μm . Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>), da linhagem <i>Lewis/SsNHsd</i> , adultos, machos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	32
Tabela 6.	Número de casos (parcial/total de olhos avaliados) da distribuição do escore de marcação para imuno-histoquímica, por grupo estudado, relativamente às células positivas para Caspase 9, Caspase 3 e Bcl 2, NOS-2, PDE-5 e PDE-6 na camada de células ganglionares da retina. Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>), da linhagem <i>Lewis/SsNHsd</i> , adultos, machos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.	37

- Tabela 7. Número de casos (parcial/total de olhos avaliados) da distribuição do escore de marcação para imunohistoquímica, por grupo estudado, com relação à intensidade de marcação para Caspase 9, Caspase 3 e Bcl 2, NOS-2, PDE-5 e PDE-6 na camada de células ganglionares da retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 38
- Tabela 8. Número de casos da distribuição do escore de marcação pelo teste de *TUNEL*, por grupo estudado, na camada de células ganglionares da retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da ação do óxido nítrico (ON) sobre a musculatura lisa arterial e ação de inibidores da *fosfodiesterase*-5 (PDE-5), mediada pelo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (SHEKERDEMIAN; RARN, 2002). 8
- Figura 2. Fotomicrografia de retina ilustrando a ora serrata (seta preta). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido, (HE, 40x). Laboratório de Histopatologia FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013. 17
- Figura 3. Imagem representativa das cinco avaliações realizadas por campo, para avaliação da espessura total da retina (linhas vermelhas). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 18
- Figura 4. Imagem representativa da contagem de células na camada de células ganglionares da retina (+ vermelhos). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 18
- Figura 5. Imagem representativa das cinco avaliações realizadas por campo, respectivamente à espessura de cada camada da retina (linhas vermelhas). Em A, camada de células ganglionares; em B, camada plexiforme interna; em C, camada nuclear interna; em D, camada plexiforme externa; em E, camada nuclear externa e em F, camada de fotorreceptores. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 19
- Figura 6. Média e desvio padrão da espessura total da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 24

- Figura 7. Média e desvio padrão da espessura da camada de células ganglionares da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 25
- Figura 8. Média e desvio padrão da espessura da camada plexiforme interna da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 26
- Figura 9. Média e desvio padrão da espessura da camada nuclear interna da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 27
- Figura 10. Média e desvio padrão da espessura da camada plexiforme externa da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 28
- Figura 11. Média e desvio padrão da espessura da camada nuclear externa da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 29
- Figura 12. Média e desvio padrão da espessura da camada de fotorreceptores da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 30
- Figura 13. Média e desvio padrão da contagem global de CGR, na camada de células ganglionares da retina, nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013. 31

- Figura 14. Fotomicrografias de retinas, ilustrando as alterações histopatológicas observadas. Em (A) e (B), retinas animais com glaucoma placebo, notar, em A, atrofia da retina com desorganização das camadas internas (camada de CGR, camada plexiforme interna, camada nuclear interna) e, em (B), condensação cromatínica nas CGR. Em (C) e (D), retinas de animais com glaucoma e tratados com sildenafil, notar atrofia da retina e presença de células picnóticas. Em (E) retina de olho contralateral de animal placebo, notar congestão vascular. Em (F), retina de animal do grupo controle, notar ausência de alterações à histopatologia. (setas verdes). Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos (HE, 40x). Laboratório de Histopatologia FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013. 34
- Figura 15. Fotomicrografias de imunomarcação da caspase-9 (1:100). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013. 39
- Figura 16. Fotomicrografias de imunomarcação da caspase-3 (1:250). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013. 40
- Figura 18. Fotomicrografias de imunomarcação da NOS-2 (1:500). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (setas verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013. 42

- Figura 19. Fotomicrografias de imunomarcação da PDE-5 (1:500). 43
Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.
- Figura 20. Fotomicrografias de imunomarcação da PDE-6 (1:1000). 44
Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (setas pretas) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.
- Figura 21. Fotomicrografias de imunomarcação para caspase-9 45
(1:100) em (A), caspase-3 (1:250) em (B), Bcl-2 (1:1000) em (C), NOS-2 (1:500) em (D), PDE-5 (1:500) em E e PDE-6 (1:1000) em (F), no Grupo Controle. Notar marcação no citoplasma em células da camada de células ganglionares da retina (setas verdes) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Rato (*Rattus norvegicus*), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.
- Figura 22. Fotomicrografias da marcação pelo teste de *TUNEL*, de 47
células positivas, com marcação nuclear, na camada de células ganglionares da retina (setas verde - células positivas para apoptose)(40x). Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hípidos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013.

1. INTRODUÇÃO

O glaucoma é causa comum de perda da visão em seres humanos, levando à condição em até 4% dos indivíduos com mais de 40 anos de idade (LESKE, 2007). Em alguns grupos étnicos, inclusive, os números superam a 20% (DUGGAL et al., 2005). A prevalência da doença é de 2% na população geral, de 3% em pessoas acima de 50 anos, 5,7% entre 73 e 74 anos, e de 23,2% em indivíduos acima de 75 anos, o que coloca a condição como segunda causa de cegueira irreversível no mundo, pela Organização Mundial da Saúde (LAN et al., 2007; HONRUBIA et al., 2009).

Projetam-se que mais de 80 milhões de pessoas serão atingidas até o final desta década e que 8,4 milhões delas tornar-se-ão cegas (QUIGLEY; BROMAN, 2006; SCHMIER; HALPERN; JONES, 2007; BALTMER et al., 2010).

A doença induz a impacto econômico significativo, com bilhões de dólares em custos médicos diretos e em indiretos. Perpetra-se como doença sem solução definitiva, evidenciada pelo número crescente de pacientes acometidos (COYLE; DRUMMOND, 1995; STILLITANO et al., 2005; BURR et al., 2007). A implicação da assertiva aponta para a certificação de que as terapias médica e cirúrgica atuais, visando à redução da pressão intraocular (PIO), são de sucesso limitado, obrigando a que se estudem e a que se desenvolvam perspectivas terapêuticas mais eficazes (LEVIN, 2005; WEINREB, 2007).

Nos animais domésticos, o glaucoma é mais prevalente em cães, acometendo também felinos, equinos, bovinos e outras espécies, incluindo animais selvagens (OFRI; NARFSTROM, 2007).

A perda de visão no glaucoma decorre da morte de células ganglionares da retina (CGR) e de seus axônios, que compõem as fibras do nervo óptico (HAYREH; PE'ER; ZIMMERMAN, 1999; NICKELLS, 2007). Durante anos, aceitou-se que o aumento da PIO era causa da doença (SOMMER, 1989). No entanto, reconhece-se hoje que a elevação da PIO é um dos fatores de risco (QUIGLEY, 2011). Evidências crescentes sugerem que a isquemia local, levando à redução na perfusão, é evento *major* na patogênese da neuropatia glaucomatosa (FLAMMER; MOZAFFARIEH, 2007). Níveis reduzidos de óxido nítrico (ON), um potente vasodilatador, foram

demonstrados em pacientes com glaucoma e em modelos animais da doença, bem como em outras doenças neurodegenerativas, estando implicados na diminuição do fluxo sanguíneo ocular e na morte neuronal, com perda de visão (GRUNWALD et al., 1999; GALASSI et al., 2000; DOGANAY; EVEREKLIOGLU; TURKOZ, 2002).

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas responsáveis pela hidrólise do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), mensageiros intracelulares responsáveis por mediar respostas a vários hormônios e neurotransmissores. A família das fosfodiesterases é composta por 11 isoenzimas distribuídas em órgãos e sistemas dos mamíferos (MANALLACK et al., 2005, GHOSH et al., 2009; FRANCIS et al., 2011). De acordo com Francis et al. (2011) os 11 tipos de PDEs diferem entre si quanto a distribuição tecidual, estrutura molecular e especificidade em hidrolisar somente AMPc (PDEs 4, 7 e 8), GMPc (PDEs 5, 6 e 9) ou ambos (PDEs 1, 2, 3, 10 e 11). Ao hidrolisar os monofosfatos cíclicos as PDEs regulam vários processos fisiológicos, incluindo resistência vascular, débito cardíaco, motilidade visceral, resposta imune, inflamação, neuroplasticidade, visão e reprodução (GHOSH et al., 2009).

O sildenafil, além de aprovado para o tratamento da disfunção erétil, o é, também, para o tratamento da hipertensão arterial, uma vez que atua como inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE-5). A localização das PDE-5 não se restringe ao corpo cavernoso peniano, sendo encontrada nas células do músculo liso de artérias e de veias periféricas, bem como na circulação coronariana, pulmonar, em plaquetas e em células endoteliais de vasos sanguíneos (REFFELMANN; KLONER, 2009). Admite-se que o fármaco seja capaz de ensejar alterações hemodinâmicas em sítios em que a PDE-5 encontra-se presente, ocasionando alterações circulatórias sistêmicas (KERR; DANESH-MEYER, 2009). Estudos mostraram ação neuroprotetora em modelos de doenças neurodegenerativas, mantendo níveis aumentados de GMPc, prolongando o efeito do ON ao induzir à vasodilatação e melhorando a circulação (DEVAN et al., 2004; ERCEG et al., 2005; JOHNSTON, 2005; FAROOQ et al., 2008; ZHANG et al., 2001; OREJANA et al., 2012).

Com a pesquisa, objetivou-se investigar se o sildenafil, prolongando os efeitos do ON, poderia atuar na neuroproteção retiniana em ratos com glaucoma induzido.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glaucoma

O glaucoma é um grupo de doenças caracterizadas por degeneração progressiva do nervo óptico, resultando na perda de campo visual e da visão, irreversivelmente (SANDALON et al., 2013).

Em seres humanos, o glaucoma é classificado em três tipos principais: glaucoma primário de ângulo aberto (POAG), glaucoma primário de ângulo fechado e glaucoma primário congênito. O POAG é o tipo mais comum em seres humanos (BOUHENNI et al., 2012). Em cães, principais protagonistas do glaucoma em animais, ele pode ser classificado, com base na causa ensejante, em primário, secundário ou em congênito. Com base na aparência gonioscópica do ângulo de drenagem, em aberto, estreito ou em fechado. De acordo com a duração ou com o estágio de evolução, em crônico ou em agudo. O glaucoma crônico revela-se com a elevação progressiva da PIO. Em contrapartida, o agudo caracteriza-se por elevação súbita da PIO (PLUMMER; REGNIER; GELATT, 2013). De modo geral, o glaucoma, tem sido investigado há cerca de 50 anos, na espécie canina, alta incidência têm sido relatada em Beagles, Welsh Springer Spaniel, e em muitas outras raças. A uveíte e as neoplasias são as doenças oculares mais comumente relacionadas ao glaucoma secundário (BLOCKER; VAN DER WOERDT, 2001). Estudos de POAG em cães mostraram que as raças Shiba-Inu e a Shih-Tzu são as mais acometidas (KANEMAKI et al., 2013), entretanto, relata-se que o tipo primário de ângulo fechado é o mais comum nesta espécie (SCOTT et al., 2013).

Fatores como a idade, o estresse oxidativo, alterações na perfusão tecidual, alterações estruturais, autoimunidade e outros, além do aumento da PIO, aliados à predisposição genética, induzem ao glaucoma (WIGGS, 2007; WAX; TEZEL, 2009).

A neurotoxicidade no glaucoma decorre de lesão excitotóxica. Como hipótese, tem-se que o excesso de glutamato, neurotransmissor excitatório que se encontra nas sinapse das células da retina, induz ao aumento na entrada de Ca^{+} na célula, ativando a cascata pró-apoptótica vias caspases. Dentre causas de lesões excitotóxica destacam-se o estresse oxidativo, quando há a desequilíbrio entre a

produção de radicais livres e a sua eliminação, a hipertrofia e alteração na expressão gênica de astrócitos, aumentando a ação de metaloproteinases com consequente remodelação da retina e do nervo óptico, e a ativação das células da micróglia, que produzem enzimas pró-inflamatórias e fatores neurotóxicos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina 6 (IL-6), ON e endotelinas (ALMASIEH et al., 2012).

A perda da visão em pacientes com glaucoma decorre da morte progressiva das CGR e de seus axônios. Enquanto a morte neuronal e de axônios é atribuída ao aumento da PIO, reconhece-se que contingente significativo de casos cursam com PIO normal ou baixa (CRISH; CALKINS, 2011). Cada vez mais, admite-se que a elevação dessa variável é um dos muitos eventos que corroboram com a evolução da doença (SCHWARTZ, 2005). Evidências crescentes sugerem que na neuropatia glaucomatosa, a redução do fluxo sanguíneo na retina interna e no nervo óptico é de significativa importância e precede a neuropatia óptica (YAMAZAKI; DRANCE, 1997; YIN et al., 1997; MICHELSON et al., 1998; HARJU; VESTI, 2001). Ela não se limita ao olho, o que indica que pelo menos um componente na redução do fluxo sanguíneo no glaucoma é de natureza primária. Pacientes sofrem de baixa pressão de perfusão ocular e de pouca capacidade de auto regulação, prejudicando condições de adaptação, frente ao aumento da pressão intraocular ou à diminuição da pressão arterial (FLAMMER et al., 2002; FLAMMER; MOZAFFARIEH, 2007). Resultam morte das CGR e atrofia do nervo óptico (GARCIA-VALENZUELA et al., 1995; MURAKAMI; OKISAKA, 1998; HERNANDEZ, 2000), bem como lesões de reperfusão e de remodelação do nervo óptico (CIOFFI; SULLIVAN, 1999; KATAI; YOSHIMURA, 1999; FLAMMER, 2001).

As CGR são nutridas, e mantêm-se viáveis, pela ação das neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Alterações nos fluxos retrógrado e anterógrado das neurotrofinas estão envolvidas no aparecimento das lesões retinianas no glaucoma (ALMASIEH et al., 2012). Evidências revelam que, no glaucoma, com o aumento da PIO há compressão dos axônios do nervo óptico na lamina crivosa, tornando deficiente o transporte de proteínas, via axonal, entre o nervo óptico e as CGR (TATTON et al., 2003). Substâncias que atuam sobre a

manutenção deste tipo celular foram reconhecidas como benéficas para a preservação da visão (ALMASIEH et al., 2012).

2.2 Apoptose

Investigações sobre a patogênese do glaucoma têm sido beneficiadas com a aplicação, em modelos animais, de apoptose e morte das CGR (REICHSTEIN et al., 2007).

A apoptose configura-se como processo biológico complexo para a eliminação de células (PORTER; JANICKE, 1999; GALLUZZI et al., 2012), podendo ser induzida por ampla variedade de condições fisiológicas e farmacológicas que culminam com a condensação e a marginalização cromatínica. Tem-se a fragmentação do DNA, a vacuolização citoplasmática e morte celular. Sua identificação pode se dar segundo diferentes parâmetros (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; QU; WANG; GROSSKREUTZ, 2010).

A incidência de apoptose é elevada em eventos isquêmicos (ROSA; BARONI; PORTAL, 2008). Decorrentes do aumento da PIO, têm-se a constrição de vasos da retina e danos celulares subsequentes (BORUTAITE et al., 2003), como ativação das caspases, enzimas efetoras pró-apoptóticas (PETITO et al., 1998; MARIGO; CRONEMBERGE; CALIXTO et al., 2001). A apoptose, portanto, é uma forma geneticamente controlada de morte celular porque passam as células ganglionares durante o desenvolvimento normal da retina e nas doenças que afetam o nervo óptico, tal como o glaucoma. Trata-se de mecanismo controlado por genes específicos e pelos produtos gerados da morte celular. Na apoptose de células ganglionares, reconhece-se que uma das etapas reguladoras primárias é a ativação da proteína supressora tumoral p53, que atua como fator de transcrição, que pode super-expressar o gene pró-apoptótico Bax e sub-expressar o gene anti-apoptótico Bcl-2. Alterações de tal ordem podem estimular eventos apoptóticos, incluindo mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, com liberação do citocromo C, que ativa as caspases (VIGNESWARA et al., 2012).

Capases são enzimas partícipes da cascata em resposta a sinais pró-apoptóticos que culminam com a morte celular (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

A ativação da apoptose pode ser iniciada por via extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; PETER, 2011). A ativação da caspase-8, com consequente ativação da caspase-3 e a clivagem das proteínas pró-apoptóticas da família do gene *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2), que se ligam aos receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFr), dentre eles destacam-se o receptor FAS, o TNFr-1, e o TRAIL, induzem à apoptose pela via extrínseca (LUCHS; PANTALEÃO, 2010). A via intrínseca é mediada por estímulos internos de estresse intracelular, bem como por alteração do DNA, pela interrupção do ciclo celular ou pelas vias metabólicas (PAROLIN; REASON, 2001). Decorre a ativação de caspases, que corroboram com a morte celular. Ativadas, elas catalisam a cascata pró-apoptótica, intensificando a ação proteolítica (LUCHS; PANTALEÃO, 2010).

Existem caspases iniciadoras (caspase-2, 8, 9 e 10) e executoras (caspase-3, 6 e 7). As iniciadoras promovem, direta ou indiretamente, a ativação das executoras (RIEDL; SALVESEN, 2007). Células *death* fazem parte do desenvolvimento e do ciclo de maturação celulares, sendo componentes de resposta tecidual a agentes xenobióticos (por exemplo, micro-organismos e produtos químicos) e na remodelação tecidual (CLAVIEN; RUDIGER; SELZNER, 2001).

No glaucoma, o aumento da pressão intraocular ativa as caspases 2, 8, 9 e 10 e, posteriormente, a caspase 3 que induz à clivagem de substratos, com consequente desorganização celular (ALMASIEH et al., 2012).

O grupo Bcl (*B-cell lymphoma-2*), da família de genes da leucemia de células B/ linfoma-2, é composto tanto por proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, quanto por anti-apoptóticas, como a Bcl-Xl e a Bcl-2. A Bcl-2, durante a apoptose, representa proteínas que se ancoram na membrana mitocondrial, encarregadas de inibir a apoptose (proto-oncogene antiapoptótico) (PINAZO-DURAN et al., 2013). Tais proteínas expressam-se, preponderantemente, em condições homeostáticas. Quando a homeostase é quebrada, células ganglionares morrem. Quatro fatores podem induzir à quebra de homeostasia: aumento da PIO, estresse oxidativo, diminuição da neurotrofina BDNF e liberação de citocinas pro-inflamatórias (TATTON et al., 2003). Estudos em ratos revelam que olhos glaucomatosos com altos níveis de expressão de Bcl-2 (anti-apoptótico), mostraram concentrações

elevadas de CGR, mesmo nas fases de morte celular programada (ALMASIEH et al., 2012).

São evidenciadas, na isquemia, células com marcação positiva *in situ* TUNEL, método de detecção de áreas de DNA fragmentado, eliminadas durante o processo de apoptose (BORUTAITE et al., 2003).

2.3 Neuroproteção

Ainda que a terapia para o glaucoma esteja focada na redução da PIO, muito tem sido dedicado ao desenvolvimento de fármacos que ofereçam proteção neural. Substâncias foram sugeridas como candidatas à terapia neuroprotectora, baseada em mecanismos de inibição da degeneração e da apoptose de CGR, visando à promover a sua sobrevivência (SANDALON et al., 2013).

O óxido nítrico (ON) é uma molécula lábil gasosa liberada a partir de células endoteliais. Ele induz à vasodilatação, ao aumento do fluxo de sangue e à diminuição da resistência vascular (SUGIYAMA et al., 2000; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007). A sua inibição leva à redução de perfusão (BUERK; RIVA; CRANSTOUN, 1996). Não é, portanto, surpreendente que a disfunção endotelial vascular, resultando na redução dos níveis de ON, seja encontrada em pacientes com glaucoma, desenvolvendo aumento na resistência vascular da retina (GRUNWALD et al., 1999; GALASSI et al., 2000; DOGANAY; EVEREKLIOGLU; TURKOZ, 2002). A deficiência na produção do ON é, por conseguinte, partícipe da patogênese do glaucoma, enquanto a síntese e a liberação aumentadas podem prevenir a progressão das manifestações lesivas (TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2005; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007).

O efeito vasodilatador do ON é mediado pela guanilato ciclase, aumentando a produção de GMPc, que resulta em relaxamento da musculatura lisa dos vasos. O GMPc é degradado pela PDE-5. Inibidores de PDE-5 melhoram, temporalmente, os efeitos vasodilatadores da via ON/GMPc, aumentando a perfusão (WALDMAN; MURAD, 1987) (Figura 1).

Testaram-se agentes vasoativos, incluindo o sildenafil e o tadalafila, empregados no tratamento da disfunção erétil (BEHESHTIAN et al., 2008), e

eficazes em modelos de lesões de isquemia/reperfusão (I/R) em diferentes órgãos (KUKREJA et al, 2005; SOYDAN et al., 2009; ARIKAN et al., 2010; ORUC et al., 2010; YILDIZ, et al., 2011). Encontraram-se aumento da sobrevivência e prevenção de danos celulares, relacionados com níveis elevados de ON. O sildenafil mostrou-se efetivo em modelos de lesão neuronal e de isquemia cerebral em ratos. O tratamento resultou em aumento dos níveis séricos de ON, na melhoria da perfusão, na sobrevivência de neurônios e na neurogênese (ZHANG et al., 2006; KO et al., 2009; SERARSLAN et al., 2010; OZDEGIRMENCI et al., 2011).

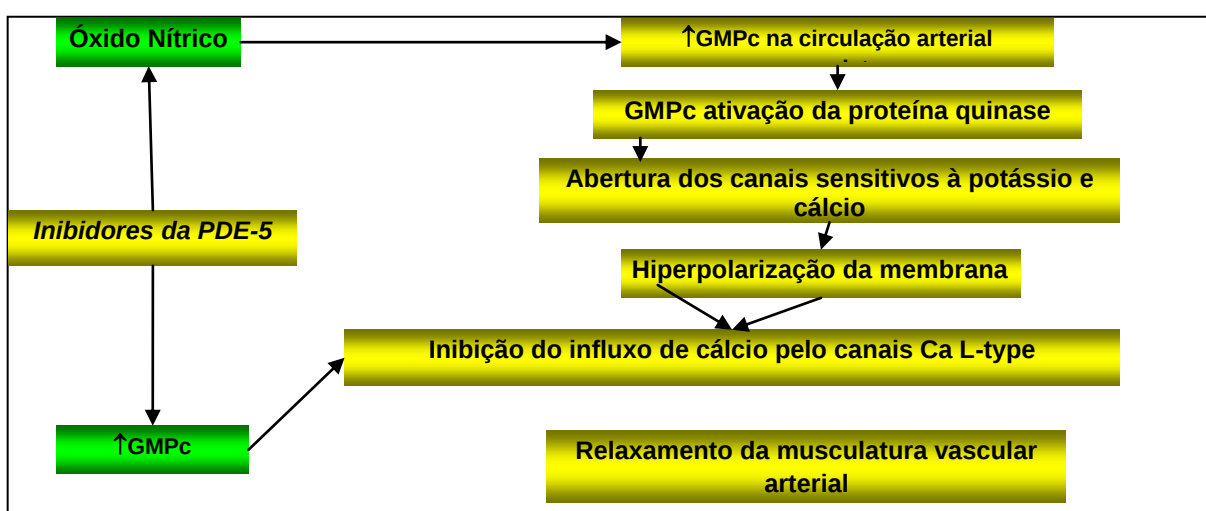


Figura 1. Representação esquemática da ação do óxido nítrico (ON) sobre a musculatura lisa arterial e ação de inibidores da *fosfodiesterase-5* (PDE-5), mediada pelo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (SHEKERDEMIAN; RARN, 2002).

Alterações vasculares e isquemia local são reconhecidas como estando entre os principais fatores de risco no glaucoma (FLAMMER et al., 2002; FLAMMER; MOZAFFARIEH, 2007). Pacientes com glaucoma sofrem de disfunção endotelial, resultando em baixos níveis de ON (GRUNWALD et al., 2001). A redução do fluxo sanguíneo na retina e no nervo óptico resulta em morte neuronal, em neuropatia óptica e em perda progressiva de visão (MICHELSON et al., 1998; YIN et al., 1997; HARJU; VESTI, 2001).

Com base nos resultados de estudos em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central e o coração (SALLOUM et al., 2008), em que o sildenafil reduziu a apoptose da célula cardíaca, por diminuição do estresse

oxidativo (EBRAHIMI et al., 2009), demonstrou-se que a substância foi capaz de atenuar a apoptose de miocélulas cardíacas em modelo de cardiotoxicidade por doxorubicina (FISHER et al., 2005), e de reduzir a necrose em casos de infarto do miocárdio (SALLOUM et al., 2008). Em contrapartida, estudos mostraram que o aumento de ON causa lesão do DNA, apoptose celular, neurotoxicidade e inflamação. Quando a concentração de ON é maior que 1 μM , os efeitos predominantes mediados por ele incluem a desaminação, oxidação ou nitração do DNA, via interação do ON com radicais superóxido ou de oxigênio. Quando a concentração é menor que 1 μM , suas ações são diretas, sem interagir com os radicais superóxido ou de oxigênio, podendo regular atividades fisiológicas, por diferentes vias de sinalização (LEE; CHENG, 2004).

O ON é produzido pela óxido nítrico sintase. Existem três tipos de sintase: a neuronal, a induzível e a endotelial. Pesquisas mostram que na morte celular, aumenta a produção de receptores de glutamato NMDA (N-methyl-D-aspartato), com incremento no influxo de Ca^{+} para a célula e, por conseguinte, formação de ON via óxido nítrico sintase neuronal (CHEN et al., 2013). Em indivíduos saudáveis, a enzima pode estar presente em baixa quantidade ou mesmo ausente, tendo sua expressão mediada pela ativação do sistema imune. Quando há exposição contínua à citocinas, sua expressão aumenta, mediada pelas células da glia, com consequente degeneração da retina e da cabeça do nervo óptico (WAX; TEZEL, 2009).

2.4 Inibidores da fosfodiesterase e ação vasodilatadora ocular

As PDEs são enzimas responsáveis pela quebra do GMPc e do AMPc, segundos mensageiros com funções específicas. As PDEs provêm a hidrólise destes a quem estão ligadas, convertendo-os em monofosfatos biologicamente inativos, que resulta em alguma função fisiológica (CORBIN; FRANCIS, 2002; PORST, 2004).

As PDEs são divididas em 11 famílias, compostas pela união de mais de 50 isoformas. Os inibidores da PDE-5 se assemelham estruturalmente a base guanosina do GMPc, ocupando o sítio ativo da enzima, prevenindo a hidrólise desse segundo mensageiro e, dessa forma, contribuindo para o aumento dos efeitos

vasodilatadores do ON (KUKREJA et al., 2005; WRIGHT, 2006; UTHAYATHAS et al., 2007). Fármacos inibidores da fosfodiesterase do tipo-5 são capazes de inibir a hidrólise do GMPc, aumentando a concentração desse segundo mensageiro na parede lisa dos vasos. O evento resulta em aumento da ação intravascular do ON e em vasodilatação local.

A PDE-5 é encontrada em grande quantidade no corpo cavernoso peniano e é a fosfodiesterase mais abundante nesse tecido, sendo a principal responsável por regular os níveis locais de GMPc por hidrólise. Os níveis de GMPc circulantes modulam a atividade endógena do ON e, conseqüentemente, o tônus vascular sendo, portanto, um alvo para intervenções terapêuticas na disfunção erétil, visto que a ereção é um processo hemodinâmico (KUKREJA et al., 2005).

A PDE-5 encontra-se, também, presente em células da musculatura lisa vascular dos pulmões, razão pela qual os inibidores da PDE-5 têm sido observados no controle da hipertensão pulmonar. Relatos científicos têm mostrado os valores do citrato de sildenafil, na prática médica, por via oral e por nebulização, como opção terapêutica em casos de hipertensão pulmonar não responsiva a hidralazina (PRASAD; WILKINSON; GATZOULIS, 2000; SASTRY; NARASIMHAN; REDDY, 2000; WILKENS et al., 2001; GHOFrani et al., 2002; LEPORE; MAROO; PEREIRA, 2002; GHOFrani et al., 2003a; GHOFrani et al., 2003b).

Não obstante, por ser estruturalmente semelhante à PDE-5, a fosfodiesterase do tipo-6 (PDE-6) pode ser inibida por fármacos inibidores de PDE-5, com conseqüente alteração na função visual. A PDE-6 é uma isoenzima da família das fosfodiesterases presente na retina que desempenha importante papel na transdução dos estímulos luminosos em impulsos nervosos (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2004; SEFTTEL, 2004; ASHBY, 2006; WRIGHT, 2006; STOCKMAN et al., 2007).

Estudos comprovam a ocorrência de vasodilatação promovida pelo citrato de sildenafil. Segundo Pache et al. (2002), que avaliaram o efeito do sildenafil na dose oral de 50 mg em homens e em mulheres em idade adulta, o fármaco foi capaz de aumentar em 5,8% o diâmetro de artérias e de veias retinianas, decorridos 30

minutos da administração. O estudo foi conduzido utilizando-se programa de análise de vasos retinianos¹, sendo possível a comprovação da ação vasodilatadora.

A avaliação da circulação retrobulbar pelo *Doppler* colorido após administração de 100 mg de sildenafil por via oral, em homens, mostrou aumento significativo da velocidade sistólica máxima (VSM) e da velocidade diastólica final (VDF) na artéria oftálmica, decorrida uma hora da sua administração (KURAHASHI et al. 2002).

Siu et al. (2000) avaliaram a repercussão hemodinâmica, em pacientes que receberam 100 mg de sildenafil, sobre o fluxo sanguíneo ocular, utilizando-se da *laser Doppler* fluxometria, mas não encontraram alterações significativas. Sponsel et al. (2000) avaliaram o fluxo sanguíneo ocular pulsátil em homens que receberam 50 mg de sildenafil por via oral, e observaram aumento em cerca de 30%, decorrente de alterações intrínsecas na musculatura vascular coroidal, resultando em vasodilatação.

Pesquisaram-se efeitos do sildenafil sobre a pressão intra-ocular, em pacientes humanos portadores de glaucoma crônico de ângulo aberto. Avaliou-se a pressão intra-ocular no interregno de cinco horas após a administração de 100 mg do fármaco por via oral. Não se encontraram alterações significativas (GRUNWALD et al., 2001).

Amaral et al. (2014) demonstraram que sildenafil melhora a circulação sanguínea na retina de coelhos, por aumentar a velocidade do fluxo sanguíneo e por diminuir a pressão de perfusão. Os autores utilizaram a angiografia fluoresceínica e comprovaram aumento da velocidade nas fases arterial e arterio-venosa, aos 7º e 15º dias de tratamento.

3. OBJETIVOS

Avaliar a ação neuroprotetora do citrato de sildenafil, em retinas de ratos com glaucoma agudo induzido. Buscar compreender a eventual ação neuroprotetora do fármaco, à morfometria, à histologia, à

¹ *Retinal Vessel Analyser* - RVA, Imedos, Weimar, Alemanha

imuno-histoquímica e quanto à marcação pelo teste de *TUNEL*, comparando-se a expressão de marcadores relacionados à ação da substância na retina e de marcadores de apoptose, entre indivíduos tratados e não tratados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações quanto à ética

A pesquisa foi realizada atendendo-se às normas da *Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (National Institutes of Health Publications n. 85-23: Revised 1985)*, de consoante com o código de NÜREMBERG (GOLDIM, 1995). Outrossim, sob expressa autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 009328-13).

4.2 Animais

Vinte e sete ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*², adultos, machos, com peso médio de 350g foram utilizados na consecução da pesquisa. Os animais foram clínica e oftalmicamente avaliados por métodos rotineiros e alocados em ambiente ventilado, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e de água potável “*ad libitum*”, e foram mantidos sob ciclos de 12 horas de luz e à temperatura controlada.

Aviva-se que o rato é o modelo animal mais utilizado atualmente em pesquisas sobre o glaucoma (MORRISON; JOHNSON; CEPURA, 2008; GUERIN et al., 2011; SANDALON et al., 2013) e que a linhagem Lewis, isogênica, possibilita estudos com respostas semelhantes entre os indivíduos. Empregar ratos endogâmicos é alternativa que ajuda a obter informações quanto à compreensão do funcionamento orgânico, relativamente ao processo saúde-doença no ser humano (ADER, 2003).

² Harlan Laboratories Inc, Israel

4.3 Grupos e protocolos experimentais

Constituíram-se cinco grupos, sendo um controle (Controle, n=3), composto por 3 animais, sem glaucoma e sem tratamento, e quatro tratados (1, 13, 14 e 20 DIAS, n=6), cada um composto por 6 animais, todos com glaucoma agudo unilateral induzido. Destes, 3 animais foram tratados com citrato de sildenafil (GS= olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafil/ CS= olhos contralaterais de animais tratados com sildenafil) e 3 tratados com placebo (GP= olhos com glaucoma de animais placebos/ CP= olhos contralaterais de animais placebos), em diferentes protocolos de tratamento (Tabela 1).

A indução do glaucoma deu-se por paracentese da câmara anterior. Empregou-se agulha de calibre 30G³, acoplada a equipo e a um frasco de solução salina 0,9%⁴, posicionado a altura de 150 centímetros do olho, visando a causar aumento da pressão hidrostática e a manter a PIO próxima a 70 mmHg (Tabela 2). O dispositivo foi mantido por 60 minutos e a PIO avaliada empregando-se tonômetro de rebote⁵ antes, aos 3 e aos 57 minutos da indução (OFRI et al., 1993; SANDALON et al., 2013). Colírio local, base de cloridrato de proximetacaína⁶ 0,5%, e associação de quetamina⁷ (75mg/Kg) e xilazina⁸ (10mg/kg), pela via intraperitoneal, foram empregados para a anestesia.

Os animais dos grupos tratados receberam citrato de sildenafil⁹ (comprimido de 50mg macerado de maneira estéril em solução salina⁴) à concentração de 1mg/ml, em doses e frequências variáveis (Tabela 1), pela via intraperitoneal. Os placebos receberam solução salina 0,9%⁴, com iguais critérios. Todos os animais sofreram eutanásia, realizada com injeção intraperitoneal da associação de quetamina⁷ (100mg/ml) com xilazina⁸ (20mg/ml) e posterior injeção intracardíaca de

³ BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA

⁴ TEVA Medical, Petach Tikva, Israel

⁵ TonoVet, Icare, Helsinki, Finlândia

⁶ Anestalcon, Alcon

⁷ Ketamine hydrochloride, Vétoquinol (UK) Ltd, Lure cedex, France

⁸ Xylazine hydrochloride 23.32 mg/ml, Eurovet, Bladel, Netherlands

⁹ Sildenafil citrate, Pfizer Inc, New York, USA

pentobarbital sódico¹⁰ (120mg/kg) (CLOSE, 1997), 1 hora após a última dose, no último dia de tratamento.

Tabela 1. Protocolo de Tratamento: discriminação quanto à denominação do grupo, quanto à dose de sildenafil administrada e quanto ao período de tratamento. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

GRUPO	DOSE	PERÍODO DE TRATAMENTO
1 DIA	1 mg/Kg	3 dias antes, no dia, e 1 dia pós elevação aguda da PIO
13 DIAS	1 mg/Kg	6 dias antes, no dia, e 13 dias pós elevação aguda da PIO
14 DIAS	1 mg/Kg	3 dias antes, no dia, e 14 dias pós elevação aguda da PIO
20 DIAS	0,5 mg/Kg	3 dias antes, no dia, e 3 dias pós elevação aguda da PIO

¹⁰ Pentobarbitone sodium 200 mg/ml, CTS, Hod-Hasharon, Israel

Tabela 2. Descrição da numeração dos ratos utilizados, do olho escolhido em sorteio aleatório para a indução do glaucoma, do tempo de manutenção da PIO elevada, dos valores de PIO avaliados logo após indução do glaucoma e da manutenção dos indivíduos após a indução, até a eutanásia. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

RATO	OLHO HIPERTENSO	TEMPO DE MANUTENÇÃO DE ALTA PRESSÃO	VALOR DE PIO AFERIDA IMEDIATAMENTE PÓS INDUÇÃO GLAUCOMA	TEMPO ENTRE INDUÇÃO GLAUCOMA E EUTANÁSIA
918	Esquerdo	1 h	70 mmHg	1 DIA
460	Esquerdo	1 h	71 mmHg	
373	Direito	1 h	71 mmHg	
416	Esquerdo	1 h	73 mmHg	
807	Direito	1 h	70 mmHg	
810	Direito	1 h	70 mmHg	
984	Esquerdo	1 h	42 mmHg	13 DIAS
483	Direito	1 h	65 mmHg	
656	Direito	1 h	50 mmHg	
697	Esquerdo	1 h	47 mmHg	
458	Direito	1 h	58 mmHg	
425	Esquerdo	1 h	42 mmHg	
741	Esquerdo	1 h	70 mmHg	14 DIAS
695	Direito	1 h	71 mmHg	
361	Direito	1 h	69 mmHg	
409	Esquerdo	1 h	80 mmHg	
601	Direito	1 h	75 mmHg	
624	Esquerdo	1 h	67 mmHg	
661	Esquerdo	1 h	73 mmHg	20 DIAS
802	Esquerdo	1 h	74 mmHg	
888	Direito	1 h	76 mmHg	
555	Direito	1 h	77 mmHg	
995	Direito	1 h	70 mmHg	
909	Esquerdo	1 h	74 mmHg	

4.4 Coleta, armazenamento e preparação das amostras

Após eutanásia dos animais, os olhos foram fixados em solução de formaldeído a 10% tamponado (pH 7,4)¹¹, por 48 horas. Fixadas, as amostras foram lavadas em água corrente, mantidas em álcool etílico¹² 70%, até o processamento de inclusão. Os procedimentos relativos a esta etapa da pesquisa foram realizados no “The Koret School of Veterinary Medicine - Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment - Hebrew University of Jerusalem”. A preparação das amostras deu-se no Laboratório de Histopatologia da FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, em dispositivo automático de processamento de tecido (TP1020)¹³. Os olhos, inteiros, foram incluídos em parafina e cortados transversalmente em secções consecutivas, de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo automático (RM2255)¹³, até atingir o centro do nervo óptico, incluindo a retina e o nervo óptico. Para cada avaliação, confeccionou-se uma lâmina por olho, por animal, e por avaliação (morfometria, histopatologia, imuno-histoquímica, *TUNEL*).

4.5 Morfometria e histologia

Para a morfometria e a histologia, realizaram-se a desidratação, a clarificação, a impregnação, a inclusão e a desparafinização, em estufa. Em seguida empregaram-se, para a coloração, Hematoxilina de *Harrys* (Hematoxilina monohidratada, nº. 59380025)¹⁴, e Eosina de *Lyson* (Eosina amarelada, nº. 59350025)¹⁴.

Para a morfometria, com o auxílio de um programa de análise de imagens Leica QWin v3.0¹³, em microscópio óptico convencional (Leica, DMR) equipado com câmara digital (Leica, DFC500)¹³, cinco imagens (campos) foram obtidas, de cada lâmina (objetiva 40x), contemplando-se toda a extensão da retina, da ora serrata à ora serrata (Figura 2), incluindo-se a cabeça do nervo óptico, em sua porção central. Em cada campo realizaram-se cinco avaliações, equidistantes, da espessura total da

¹¹ 10% neutral buffered formalin, Thermo electron corporation, Cheshire, UK

¹² Ethanol Absolute AR-b, Bio Lab Ltd, Jerusalem, Israel

¹³ Leica Biosystems, Richmond, USA

¹⁴ LabSynth, Diadema, SP, Brasil

retina (Figura 3), bem como das espessuras de cada uma de suas camadas (Figura 5). Obtiveram-se a média e desvio padrão. Contaram-se as células ganglionares da retina em toda extensão da retina de cada lâmina (Figura 4). A calibração espacial do sistema de análise de imagem foi realizada empregando-se régua micrométrica.

Para a histopatologia, avaliou-se descritivamente a presença de alterações nos âmbitos vascular (congestão), inflamatório (infiltrado), celular (picnólise, evidência cromática) e tecidual (atrofia, perda de definição) (Adaptado de JOHNSON et al., 2000).



Figura 2. Fotomicrografia de retina ilustrando a ora serrata (seta preta). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido, (HE, 40x). Laboratório de Histopatologia FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013.

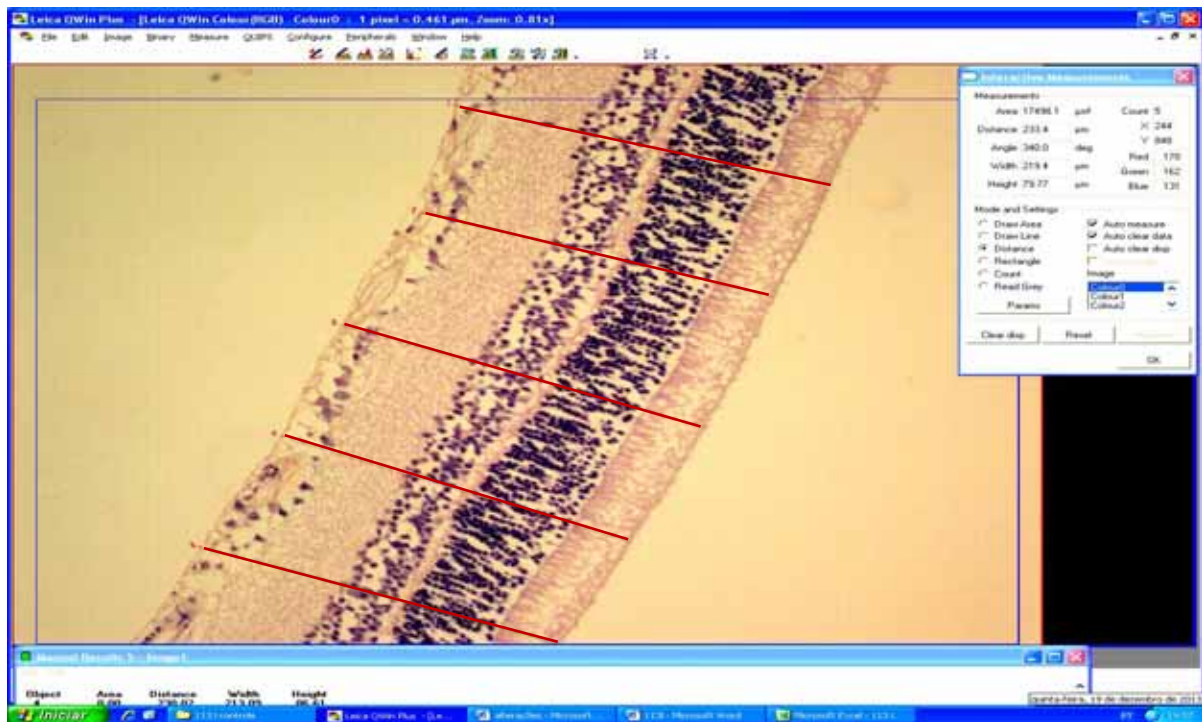


Figura 3. Imagem representativa das cinco avaliações realizadas por campo, para avaliação da espessura total da retina (linhas vermelhas). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

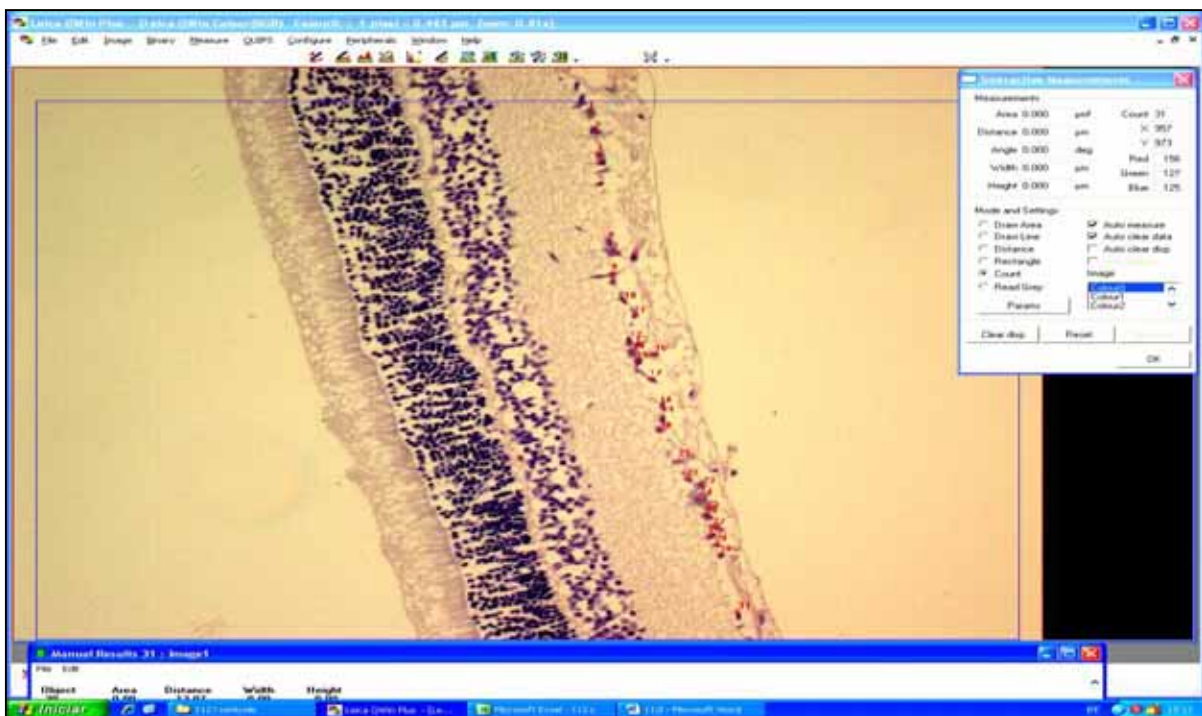


Figura 4. Imagem representativa da contagem de células na camada de células ganglionares da retina (+ vermelhos). Rato (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, macho, adulto, hígido. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

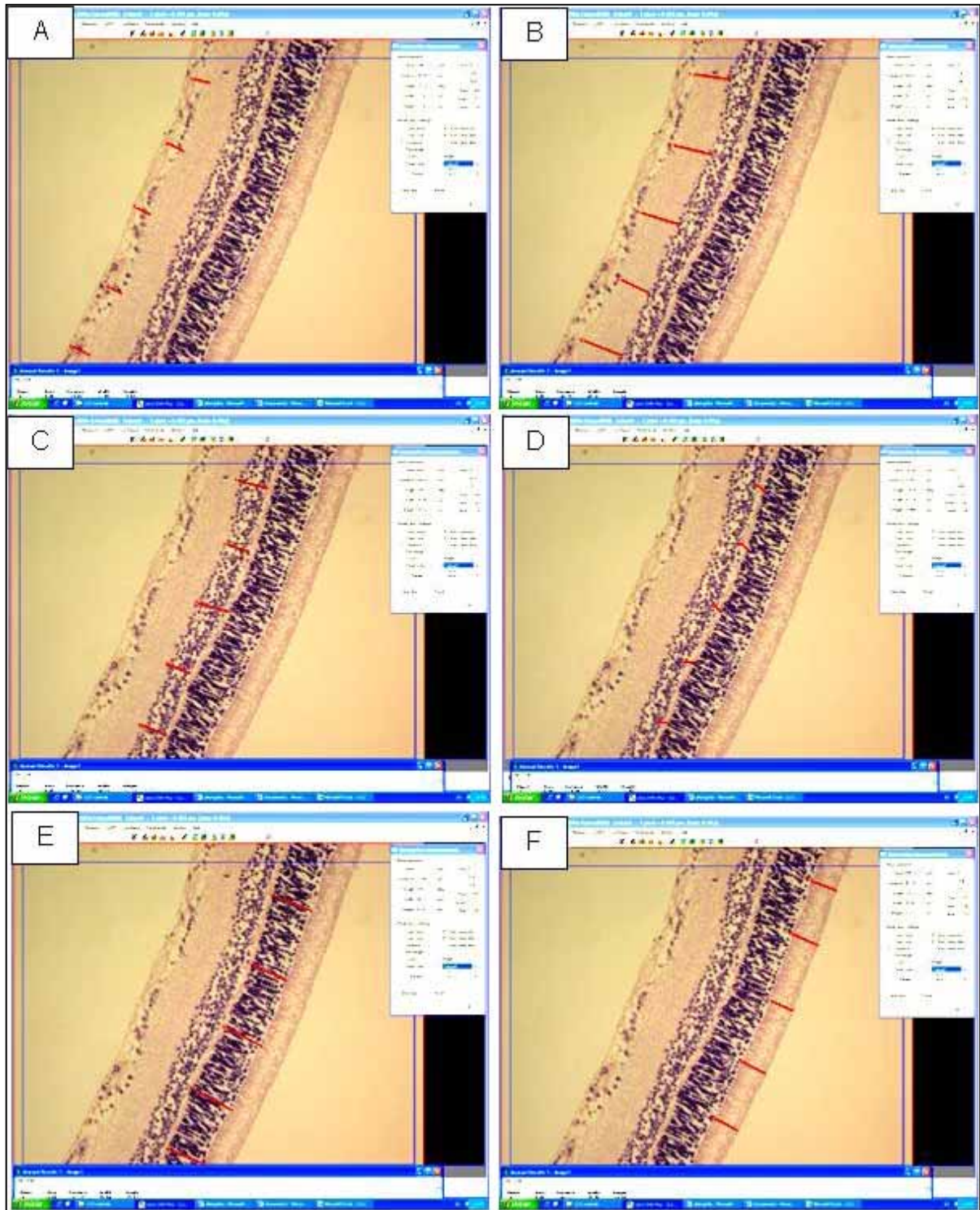


Figura 5. Imagem representativa das cinco avaliações realizadas por campo, respectivamente à espessura de cada camada da retina (linhas vermelhas). Em A, camada de células ganglionares; em B, camada plexiforme interna; em C, camada nuclear interna; em D, camada plexiforme externa; em E, camada nuclear externa e em F, camada de fotorreceptores. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígdos. Programa de análise de imagens Leica QWin v3.0. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

4.6 Imuno-histoquímica

Avaliou-se a distribuição tecidual dos anticorpos primários caspase-9, caspase-3, Bcl-2, NOS-2, PDE-5 e PDE-6, com ênfase na camada de células ganglionares da retina.

A padronização deu-se no Laboratório de Imuno-histoquímica da FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu. Foram testadas diferentes diluições para cada um dos anticorpos primários¹⁵. Realizaram-se ajustes na etapa de recuperação antigênica, a fim de se obterem marcações específicas (Tabela 3). Descreve-se, a seguir, o protocolo adotado.

Cortes histológicos distendidos em lâminas silanizadas permaneceram 8 horas em estufa, a 56°C. Eles foram desparafinizados com xilol¹⁴ e re-hidratados em álcool etílico¹⁴, em concentrações decrescentes (xilol I, xilol II, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 95% e álcool) e lavados em água deionizada¹⁶. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, em panela de pressão¹⁷, em banho maria¹⁸ ou em *steamer*¹⁹ de acordo com o protocolo estabelecido para cada anticorpo primário (Tabela 3). As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente, por 20 minutos, lavadas em água deionizada¹⁶ e tratadas com solução de metanol¹⁴ e peróxido de hidrogênio¹⁴ a 8%, para bloqueio da peroxidase endógena, por 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água deionizada¹⁶, por cinco minutos. Os cortes foram submetidos a bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó desnatado 16% (Molico®), por 60 minutos, e lavados em água deionizada, duas vezes, por cinco minutos cada.

O material foi incubado em anticorpo primário (Tabela 3). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão TRIS pH 7,4²⁰. Em ato contínuo, elas foram incubadas com anticorpos secundários de complexo estreptoavidina biotina, em *Histofine*²¹ ou em *LSAB*²², durante 30 minutos, em temperatura ambiente (27°C) e,

¹⁵ *Antibody diluent*, Dako, Carpinteria, CA, EUA

¹⁶ Dionizador comum DAU100, Union, Curitiba, PR, Brasil

¹⁷ Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, EUA

¹⁸ Banho Maria Analógico TBI 45/100, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil

¹⁹ Steam Cuisine 700, T-FAL, Inglaterra

²⁰ Trizma Base®-Sigma Chemical Co, EUA

²¹ Histofine Simple Stain MAX PO, Nichirei, Tokyo, Japan

²² LSAB System HRP K0690, Dako, USA

em seguida, lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4²⁰, por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se 3,3' *Tetracloreto de Diaminobenzidina*²³. Os cortes foram contra corados com *Hematoxilina Harrys*²⁴ e desidratados em concentrações crescentes de álcool¹⁴ e xilol¹⁴ (álcool 85%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, xilol I, xilol II e xilol III). As lâminas foram montadas com entellan²⁵ e lamínula.

Para os controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por tampão TRIS e, para os positivos, seguiram-se as instruções do fabricante (site www.protein-atlas.com).

Tabela 3. Imunomarcacão dos anticorpos Caspase-9, Caspase-3, Bcl-2, NOS-1, NOS-2, PDE-5, e PDE-6, em retina. Ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígdos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

Anticorpo Primário	Fabricante e Clone	Diluição	Método de Recuperação Antigênica	Período de Incubação	Localização da Marcação
Caspase-9	Cell Signaling (Asp 353)	1:100	Citrato pH6,0/ BW	ON/4°C	Citoplasma/núcleo
Caspase-3	R&D Systems AF-605-NA	1:250	Citrato pH6,0/ Steam	2h/27°C	Citoplasma
Bcl-2	Abcam (ab7973)	1:1000	Citrato pH6,0/ Steam	2h/27°C	Citoplasma
NOS-2	Santa Cruz (C19): SC-649	1:500	Citrato pH6,0/ Pascal	2h/27°C	Citoplasma
PDE-5	Santa Cruz (H-120): SC-32884	1:500	Citrato pH6,0/ BW	ON/4°C	Citoplasma
PDE-6	Abcam Ab5659	1:1000	Citrato pH6,0/ BW	2h/27°C	Citoplasma/ membrana

WB: Banho Maria (96°C), 30 minutos; ON: overnight (4°C),18h.

²³ DAB, Liquid DAB Cromogen®, Carpinteria, USA

²⁴ HHS.Sigma-Aldrich, Sant Luis, USA

²⁵ Entellan Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha

As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz²⁶, com objetiva de 40X, e as imagens processadas em *software*²⁷. Toda a extensão do corte de foi avaliada. Empregou-se índice semi-quantitativo para discriminação do percentil de células positivas, por escore de marcação (Tabela 4) e índice quali-quantitativo para a contabilização da intensidade de marcação, classificada como discreta, moderada ou intensa.

Tabela 4. Classificação da imunomarcação e da marcação *TUNEL*, por índice semi-quantitativo em retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

Índice	Marcação
0	<i>nihil</i>
1	Marcação de 1-25%
2	de 26-50% do campo marcado
3	de 51-75% do campo marcado
4	mais de 76% do campo marcado

4.11 Teste de *TUNEL*

Realizou-se a marcação de células em apoptose empregando-se o teste de detecção de fragmentação de DNA *TUNEL In situ POD*²⁸. As lâminas foram desparafinizadas. Empregou-se bloqueio da peroxidase endógena em solução de peroxidase¹¹, diluída em metanol¹⁴, na concentração 3%, durante 20 minutos. As lâminas foram lavadas em tampão fosfato salino²⁹ e incubadas em éter *mono*[*p*-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenílico] de polietilenglicol³⁰, durante oito minutos, seguindo-se as instruções dos fabricantes. Utilizou-se 3,3' *Tetracloreto de Diaminobenzidina*²³,

²⁶ Nikon Eclipse E200®, Nikon, Melville, NY, EUA

²⁷ Leica QWin Plus, Wetzlar, Alemanha

²⁸ Roche®, Alemanha

²⁹ PBS Kasvi K9-3441, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil

³⁰ Triton™X-100, Sigma-Aldrich, Sant Luis, USA

como cromógeno. Amostras incubadas com DNase foram usadas como controle positivo, e amostras negativas foram feitas pela exclusão da enzima Tdt.

As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz²⁶, em objetiva de 40X, e as imagens processadas em *software*²⁷, avaliando-se toda a extensão do corte. Empregou-se índice semi-quantitativo para discriminação do percentil de células positivas por escore de marcação, na camada de células ganglionares da retina (Tabela 4).

4.10 Estatística

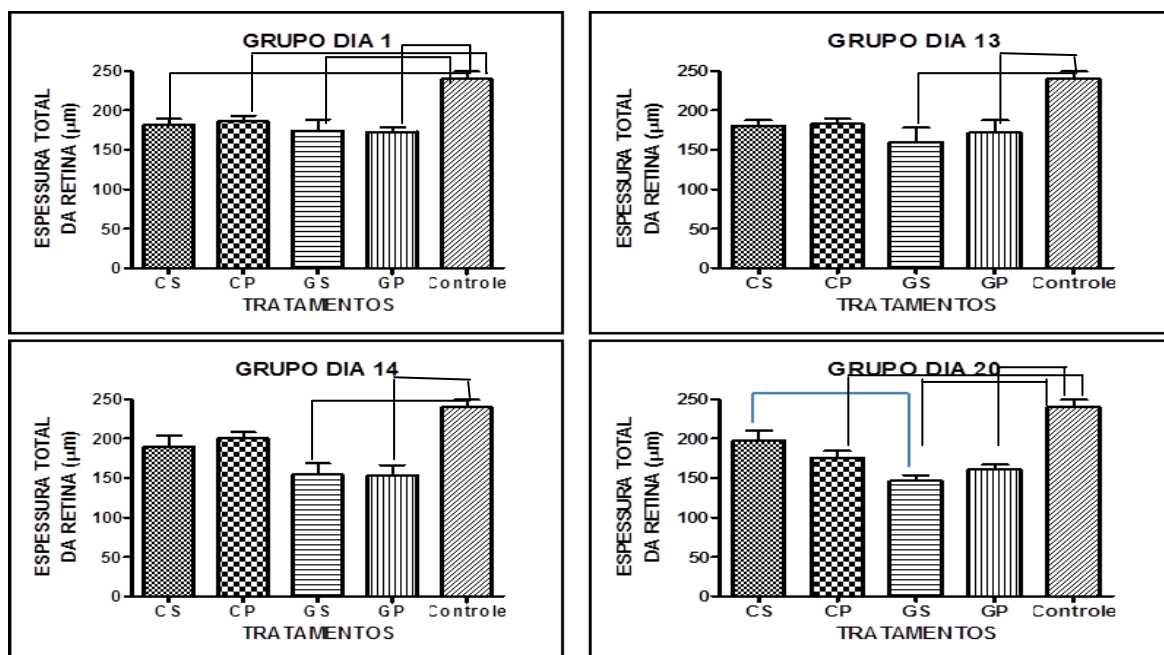
Para os valores da espessura total da retina, de suas camadas e a contagem global de células na camada de células ganglionares, os resultados foram avaliados quanto à sua normalidade, aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Empregou-se Análise de Variância para se comparar a média de cada variável entre os grupos. O *post test* de Bonferroni foi utilizado para se ajustarem os valores-P resultantes de comparações múltiplas³¹. Adotou-se, para todas as análises, nível de significância estatística de $p < 0,05$. Quanto à presença de alterações histológicas e aos escores da imunomarcação e da marcação do teste de *TUNEL*, empregou-se análise descritiva.

5 RESULTADOS

5.5 Morfometria e histologia

Todos os grupos tratados, sildenafil ou placebo, apresentaram diminuição da espessura total da retina, quando comparados ao grupo controle. A maior significancia deu-se em olhos com glaucoma. (Grupo 1 dia CS,CP,GS,GP/Controle $p < 0,05$, Grupo 13 dias GS,GP/Controle $p < 0,05$, Grupo 14 dias GS,GP/Controle $p < 0,05$, Grupo 20 dias GS,GP,CP/Controle $p < 0,01$ e GS/CS $p < 0,05$) (Figura 6).

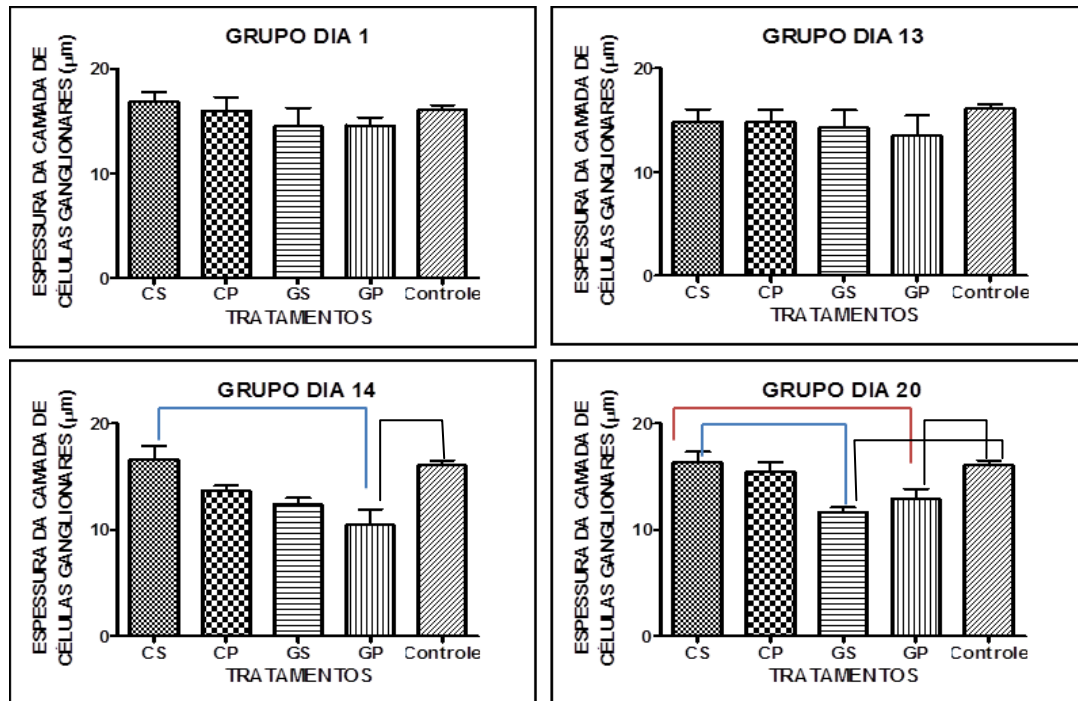
³¹ GraphPad Prism 4.0®, GraphPad Software, Inc, La jolla, CA, USA



Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafila), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafila), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 6. Média e desvio padrão da espessura total da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.
* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

A camada de CGR, quanto à sua espessura, não apresentou diminuição estatisticamente significativa nos grupos 1 dia e 13 dias. No grupo 14 dias houve diminuição da espessura em olhos com glaucoma de animais tratados com placebo (GP), comparados aos contralaterais de animais tratados com sildenafila (CS) ($p < 0,05$). A diferença foi também observada no grupo 20 dias com maior significância ($p < 0,01$). Observou-se, adjunto, diminuição desta camada em olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafila (GS), comparativamente aos contralaterais dos mesmos animais (CS) ($p < 0,01$). Encontraram-se, ainda, diferenças significativas, nos grupos 13 e 14 dias, comparativamente ao grupo controle (Grupo 13 dias GP/Controle $p < 0,05$, Grupo 14 dias GS/Controle $p < 0,01$ e GS/Controle $p < 0,05$) (Figura 7).

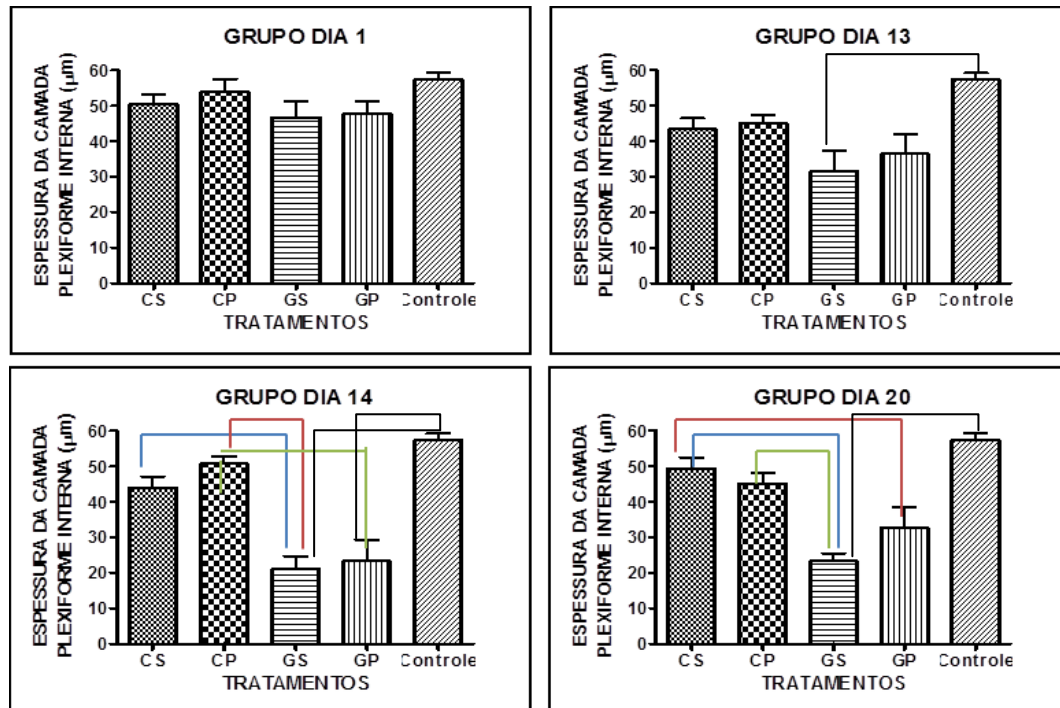


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafil), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafil), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 7. Média e desvio padrão da espessura da camada de células ganglionares da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígdos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

A espessura da camada plexiforme interna não revelou diferença estatística no grupo 1 dia ($p > 0,05$). O grupo 13 dias apresentou diminuição em olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafil (GS), comparativamente aos olhos do do grupo controle ($p < 0,05$), essa mesma comparação (GS/Controle) fora, também, observada nos grupos 14 e 20 dias, com valores $p = 0,01$ e $0,001$, respectivamente. Observou-se, ainda, no grupo 14 dias, diminuição da espessura em olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafil (GS), quando comparados aos olhos contralaterais (CS) ($p < 0,05$), e aos contralaterais de animais tratados com placebo (CP) ($p < 0,01$), estes últimos também se diferenciaram estatisticamente de olhos com glaucoma dos mesmos animais ($p < 0,05$). Demais diferenças encontradas, relativamente ao grupo 20 dias, foram: CS/GS ($p < 0,01$), CS/GP ($p < 0,05$) e CP/GS ($p < 0,01$) (Figura 8).

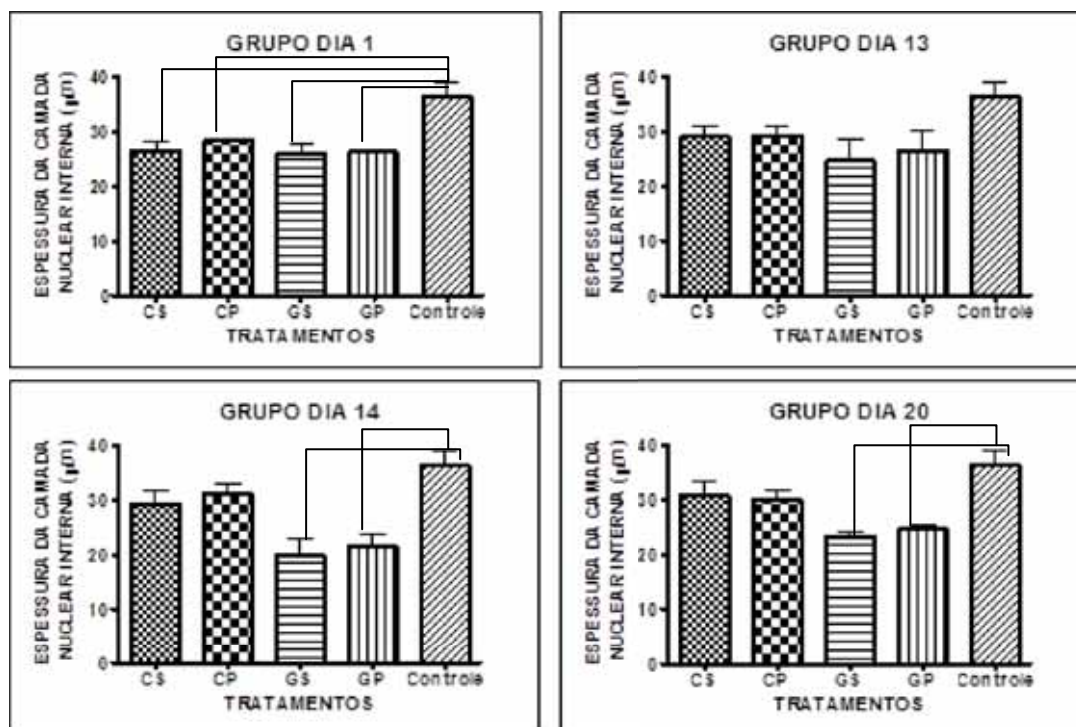


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafila), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafila), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 8. Média e desvio padrão da espessura da camada plexiforme interna da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

O grupo 13 dias não apresentou diferença estatística significativa, quanto à espessura da camada nuclear interna, razão do alto valor de desvio padrão observado. Houve diminuição significativa da espessura em todos animais do grupo 1 dia, comparativamente ao grupo controle, sendo a maior diferença a encontrada nos olhos com glaucoma ($p < 0,01$). Tanto no grupo 14 dias, quanto no grupo 20 dias, encontraram-se diferenças significativas entre olhos de animais do grupo controle e olhos com glaucoma tratados com sildenafila ou com placebo ($p < 0,05$) (Figura 9).

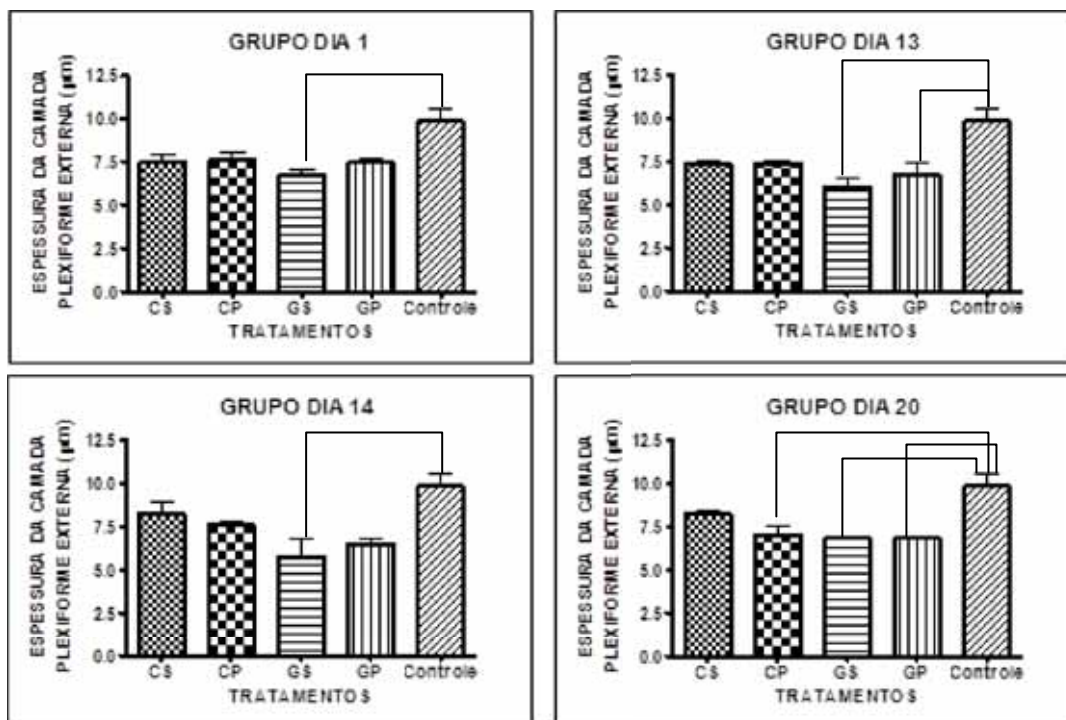


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafil), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafil), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 9. Média e desvio padrão da espessura da camada nuclear interna da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

Houve diminuição significativa da espessura da camada plexiforme externa da retina, entre o grupo controle e os animais dos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias, com glaucoma e tratados com sildenafil (Grupo 1 dia GS/Controle $p < 0,05$, Grupo 13 dia GS/Controle $p < 0,01$, Grupo 14 dias GS/Controle $p < 0,05$, Grupo 20 dias GS/Controle $p < 0,01$). As demais diferenças observadas foram: Grupo 13 dias GP/Controle e $p < 0,05$, Grupo 20 dias CP, GS e GP/Controle $p < 0,05$, e $p < 0,01$, respectivamente (Figura 10).

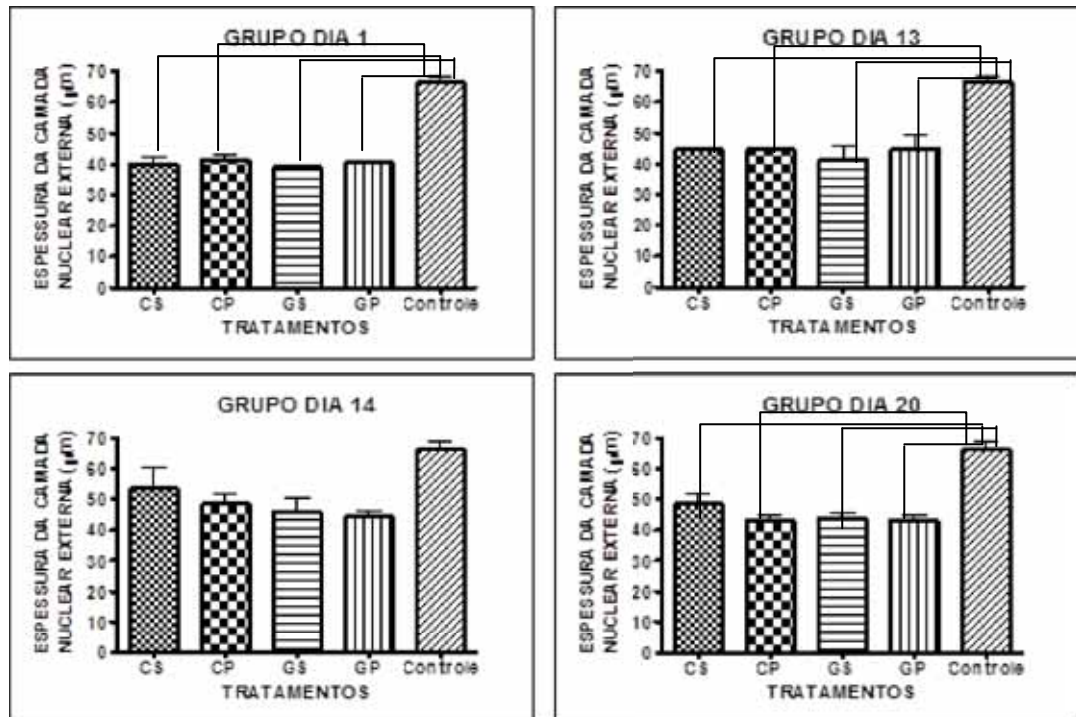


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafil), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafil), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 10. Média e desvio padrão da espessura da camada plexiforme externa da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

A espessura da camada nuclear externa da retina, mostrou diminuição significativa nos grupos tratados com sildenafil ou com placebo, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), com maior significância no grupo 20 dias, onde se observaram valores de $p < 0,001$. No Grupo 14 dias, devido ao alto desvio padrão, não houve valores estatísticos significativos ($p > 0,05$) (Figura 11).

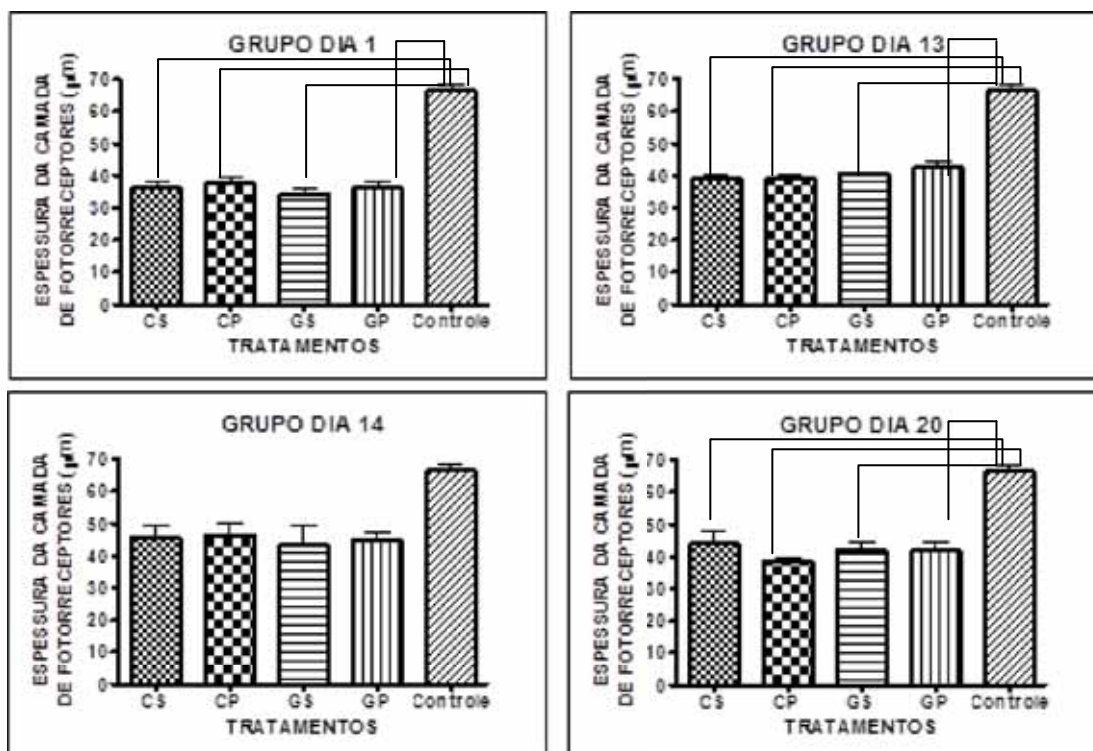


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafil), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafil), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebos), CP (olhos contralaterais, de animais placebos). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 11. Média e desvio padrão da espessura da camada nuclear externa da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

A espessura da camada de fotorreceptores foi onde menos se observaram diferenças entre os grupos. Não houve diferença no grupo 14 dias. O demais grupos apresentaram diminuição estatística em relação ao grupo controle (Grupo 1 dia e 13 dias GS,GP,CS,CP/Controle $p > 0,001$, Grupo 20 dias GS,GP,CS,CP/Controle $p > 0,01$) (Figura 12).

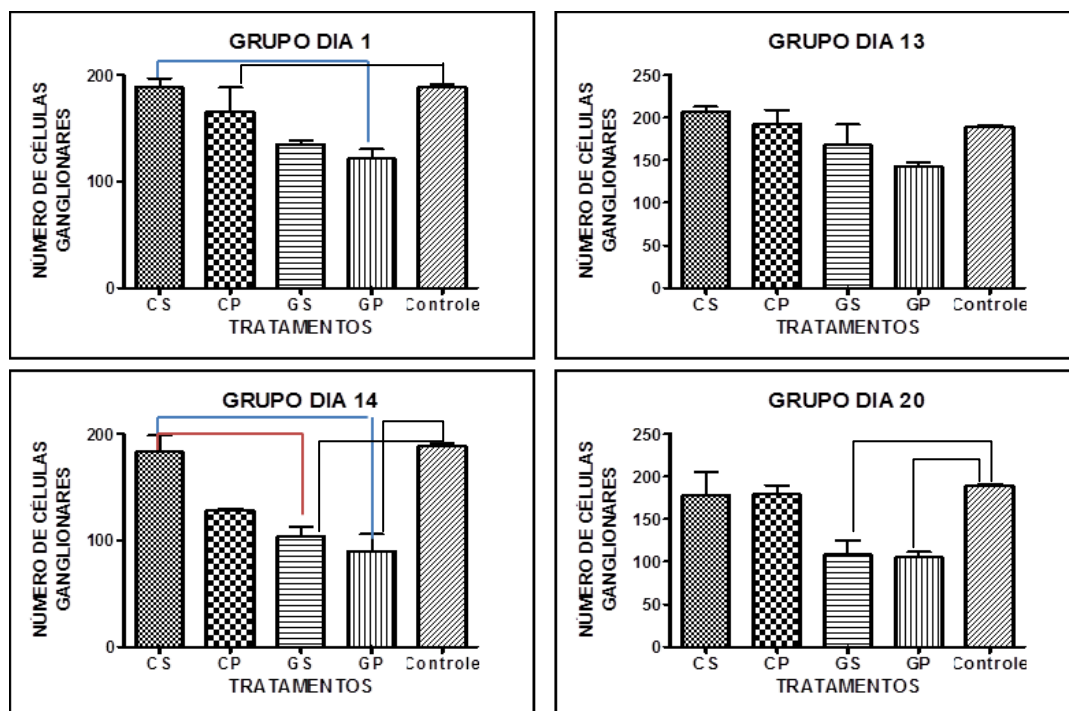


Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafila), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafila), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 12. Média e desvio padrão da espessura da camada de fotorreceptores da retina nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

Pelos gráficos (Figura 13), observou-se que todos os grupos (1, 13, 14 e 20 dias) os animais tratados com sildenafila (GS e CS) apresentaram maior quantidade de CGR, comparativamente aos tratados com placebo, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. O grupo 1 dia mostrou diferença entre GP/Controle ($p < 0,05$) e GP/CS ($p < 0,05$). No grupo 13 não houve diferença estatística entre os grupos. Os grupos 14 e 20 dias apresentaram diferenças entre o grupo controle e GP ($p < 0,05$) e controle e GS ($p < 0,05$). O grupo 14 dias apresentou, ainda, as seguintes correlações: CS/GS ($p < 0,05$) e CS/GP ($p < 0,01$).



Legenda: GS (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais tratados com citrato de sildenafil), CS (olhos contralaterais, de animais tratados com citrato de sildenafil), GP (olhos com glaucoma agudo induzido, de animais placebo), CP (olhos contralaterais, de animais placebo). Barras ligam resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 13. Média e desvio padrão da contagem global de CGR, na camada de células ganglionares da retina, nos grupos 1 dia, 13 dias, 14 dias e 20 dias. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

* Teste Bonferroni ($p < 0,05$)

No cômputo geral, relativamente à morfometria, observou-se que no grupo 1 dia o menor quantitativo de alterações, quanto à estrutura da retina. A diminuição, em espessura, de camadas da retina, relativamente aos controles, foi mais percebida no grupo 14 dias, entretanto é neste grupo que houve a maior diferença no número de CGR em olhos com glaucoma. Olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafil mantiveram maior número celular que olhos com glaucoma de animais tratados com placebo, assim como mantiveram a espessura da camada de CGR mais próximas dos achados no grupo controle. Encontrou-se discreta diferença entre olhos com glaucoma e seus contralaterais, e maior destes, comparativamente, aos controles (Tabela 4).

Tabela 5.

Valores médios (média e desvio padrão) do quantitativo de células da camada de célula ganglionares da retina, das espessuras das camadas de células ganglionares da retina, da plexiforme interna, da plexiforme externa, da nuclear externa, de fotorreceptores, e de toda retina, em μm . Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

GRUPOS	TRATAMENTO	ESPESURA DAS CAMADAS (µm)								CONTAGEM DE CÉLULAS																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
		Células Ganglionares (média±sd)	Plexiforme Interna (média±sd)	Nuclear Interna (média±sd)	Plexiforme Externa (média±sd)	Nuclear Externa (média±sd)	Fotorreceptores (média±sd)	Retina (média±sd)	Camada de Células (média±sd)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
		Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	Olho	

Legenda: letras minúsculas representam diferença estatística significativa, dentro dos diferentes grupos ($p < 0,05$). x representa diferença estatística significativa entre o grupo controle e demais grupos e subgrupos ($p < 0,05$).

Com relação à análise descritiva da histopatologia, da camada de células ganglionares da retina, grande parte das alterações foi do tipo celular e tecidual. Observou-se maior prevalência de lesões em olhos com glaucoma, quando comparados aos controles e aos contralaterais.

Encontraram-se desorganização das camadas e atrofia da retina. Houve discreta prevalência em olhos com glaucoma de animais tratados com placebo (GP), comparativamente a olhos com glaucoma de animais tratados com sildenafil (GS) e a olhos contralaterais (CP,CS) e controles, notadamente quanto à morte de CGR. Observaram-se células em etapas da apoptose, com vacuolização celular, condensação cromatínica e picnólise. Houve, congestão vascular e infiltrado inflamatório foram observados, principalmente em olhos tratados com sildenafil.

O grupo controle não apresentou alterações de quaisquer natureza. Olhos contralaterais exibiram discretas alterações tanto celular, quanto vascular, tecidual ou inflamatória. Dos grupos tratados, o grupo 1 dia foi o que apresentou o menor quantitativo de alterações, em contraste têm-se o grupo 20 dias que exibiu grande desorganização estrutural retiniana (Figura 14).

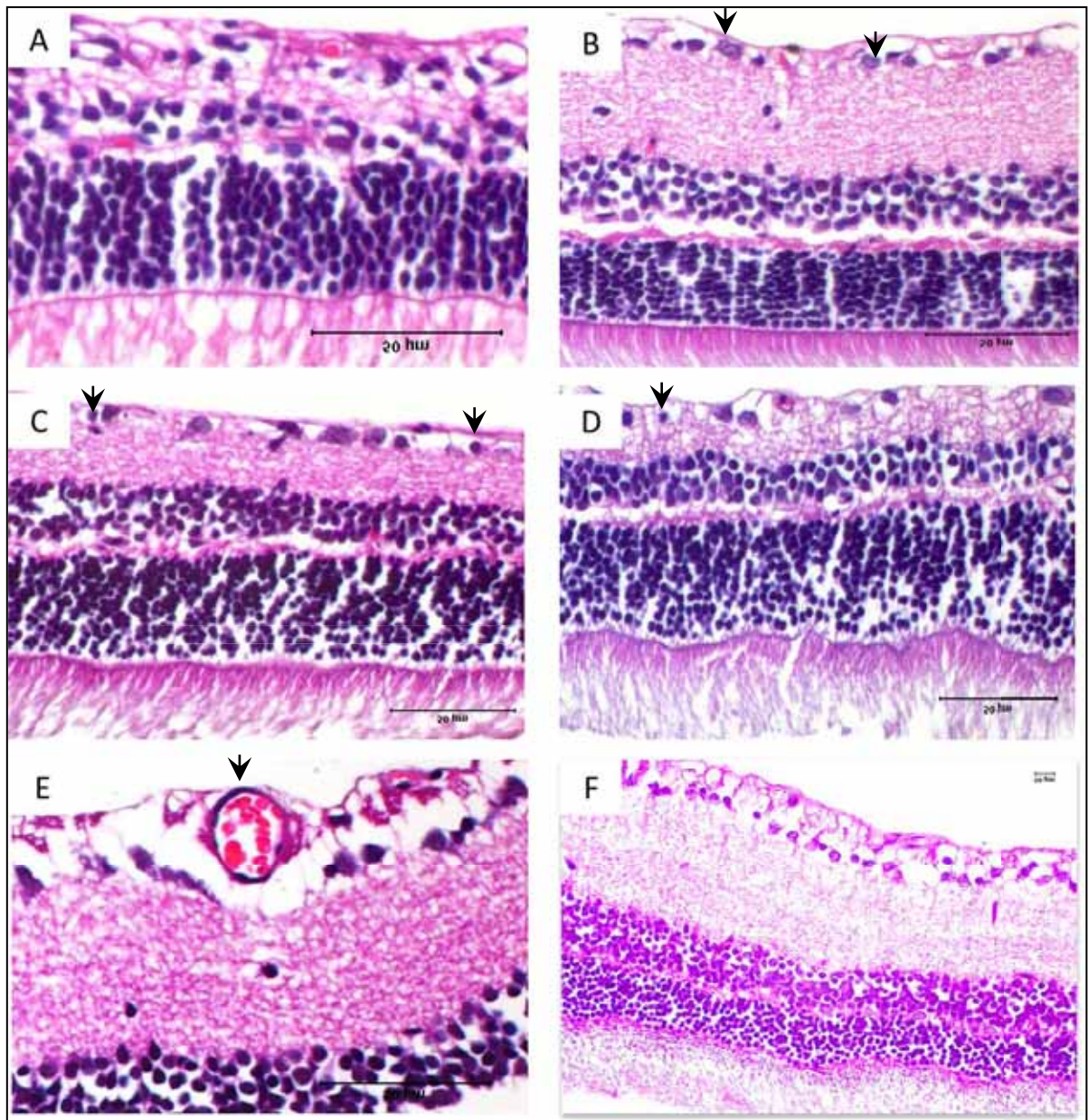


Figura 14. Fotomicrografias de retinas, ilustrando as alterações histopatológicas observadas. Em (A) e (B), retinas animais com glaucoma placebo, notar, em A, atrofia da retina com desorganização das camadas internas (camada de CGR, camada plexiforme interna, camada nuclear interna) e, em (B), condensação cromatínica nas CGR. Em (C) e (D), retinas de animais com glaucoma e tratados com sildenafil, notar atrofia da retina e presença de células picnóticas. Em (E) retina de olho contralateral de animal placebo, notar congestão vascular. Em (F), retina de animal do grupo controle, notar ausência de alterações à histopatologia. (setas pretas). Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hípidos (HE, 40x). Laboratório de Histopatologia FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013.

5.6 Imuno-histoquímica

Os achados, tanto para a avaliação semi-quantitativa de padrão de marcação (Tabela 5), quanto para a quali-quantitativa de intensidade de marcação (Tabela 6), foram interpretados descritivamente.

À análise descritiva dos resultados em imuno-histoquímica, quanto à marcação da expressão da caspase-9, na camada de células ganglionares da retina, mostraram-se mais células marcadas no grupo 13 dias, e menor nos grupo 14 e 20 dias. Houve mais células marcadas em olhos com glaucoma, sem diferença entre animais tratados com sildenafil ou com placebo. Encontrou-se aumento na intensidade de marcação em todos os grupos, comparativamente ao grupo controle (Figura 14 e 20).

A caspase-3 mostrou discreta expressão nos olhos com glaucoma em animais tratados com sildenafil, comparativamente aos não tratados, e maior intensidade de marcação nos olhos com glaucoma, em comparação aos olhos contralaterais e aos do grupo controle, mormente no grupo de 13 dias (Figura 15 e 20).

Observou-se discreto aumento na marcação do Bcl-2 em olhos com glaucoma, com discreto aumento na intensidade em olhos tratados com sildenafil, melhor observado no grupo 14 dias (Figura 16 e 20).

A NOS-2 teve sua expressão discretamente aumentada em olhos com glaucoma, quando comparada aos contralaterais e aos do grupo controle. Outrossim, observou-se diminuição na marcação em olhos de animais tratados com sildenafil. Não foram, contudo, observadas diferenças marcantes entre animais tratados e não tratados, em quaisquer dos grupos (Figura 17 e 20).

Quanto à PDE-5, observou-se menor marcação em olhos de animais tratados com sildenafil, notadamente, em olhos com glaucoma. O grupo de 14 dias foi o que mostrou menor marcação. Não houve diferença na intensidade de marcação entre os demais grupos, em que, na maioria dos olhos avaliados, deu-se intensa marcação (Figura 18 e 20).

A PDE-6 mostrou discreto aumento no número de células marcadas nos grupos tratados com sildenafil, comparativamente aos tratados com placebo,

principalmente no grupo 14 dias, entretanto, não houve padrão de marcação constante, nas diferentes categorias avaliadas. Observou-se prevalência de marcação intensa em todos o grupos, notadamente na camada de fotorreceptores, cujo local é o de maior concentração e atividade da enzima (Figura 19 e 20).

Tabela 6. Número de casos (parcial/total de olhos avaliados) da distribuição do escore de marcação para imuno-histoquímica, por grupo estudado, relativamente às células positivas para Caspase 9, Caspase 3 e Bcl 2, NOS-2, PDE-5 e PDE-6 na camada de células ganglionares da retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

GRUPOS	TRATAMENTO	IMUNOMARCAÇÃO (escore de células positivas)																								
		Caspase-9				Caspase-3				Bcl-2				NOS-2				PDE-5				PDE-6				
		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		Olho Contralateral		Olho Glaucoma		
1 dia		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
		3/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3
13 dias	Sildenafil Placebo	2/3	1/3	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		3/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3
14 dias	Sildenafil Placebo	1/3	2/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3
		1/3	2/3	2/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	3/3
20 dias	Sildenafil Placebo	1/3	2/3	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		1/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3
Controle		2 (6/6)				2 (6/6)				2 (6/6)				2 (6/6)				3 (6/6)				3 (6/6)				

Legenda: escore de marcação à imuno-histoquímica 1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) e 4 (76-100%).

Tabela 7.

Número de casos (parcial/total de olhos avaliados) da distribuição do escore de marcação para imuno-histoquímica, por grupo estudado, com relação à intensidade de marcação para Caspase 9, Caspase 3 e Bcl 2, NOS-2, PDE-5 e PDE-6 na camada de células ganglionares da retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hígidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

GRUPOS	TRATAMENTO	IMUNOMARCAÇÃO (intensidade na marcação)																															
		Caspase-9				Caspase-3				Bcl-2				NOS-2				PDE-5				PDE-6											
		Olho		Glaucoma		Olho		Glaucoma		Olho		Glaucoma		Olho		Glaucoma		Olho		Glaucoma		Olho		Glaucoma									
		D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I	D	M	I		
1 dia	Sildenafil	1/3	2/3		2/3	1/3		2/3	1/3	3/3		2/3	1/3		1/3	2/3		2/3	1/3		3/3		3/3		2/3	1/3		2/3	1/3		2/3	1/3	
	Placebo	1/3	2/3		1/3	2/3		3/3			3/3					3/3					3/3				2/3	1/3		2/3	1/3		2/3	1/3	
13 dias	Sildenafil	3/3			2/3	1/3		3/3		1/3	2/3		3/3		2/3	1/3		3/3		1/3	2/3		3/3		3/3		3/3		1/3	2/3		2/3	2/3
	Placebo		3/3			3/3			3/3		2/3	1/3		1/3	1/3	1/3	1/3				2/3	1/3		3/3			3/3			3/3		3/3	3/3
14 dias	Sildenafil	1/3	2/3		1/3	1/3		1/3	1/3	1/3	1/3		1/3	1/3	1/3	1/3		3/3		1/3	2/3		3/3		2/3	1/3		1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
	Placebo	1/3	2/3		2/3	1/3		3/3		2/3	1/3		2/3	1/3		2/3	1/3				1/3	2/3		3/3	1/3		3/3	1/3		1/3	2/3		1/3
20 dias	Sildenafil	1/3	2/3		2/3	1/3		3/3		3/3		3/3		3/3		3/3		3/3		3/3				1/3	2/3		3/3		1/3	2/3		2/3	1/3
	Placebo	1/3	2/3		2/3	1/3		3/3		1/3	2/3		1/3	2/3		1/3	2/3				1/3	2/3		2/3		1/3	2/3		2/3	1/3		2/3	1/3
Controle		M				M				D				M				I				M											

Legenda: intensidade de marcação à imuno-histoquímica D (discreta), M (moderada) e I (intensa).

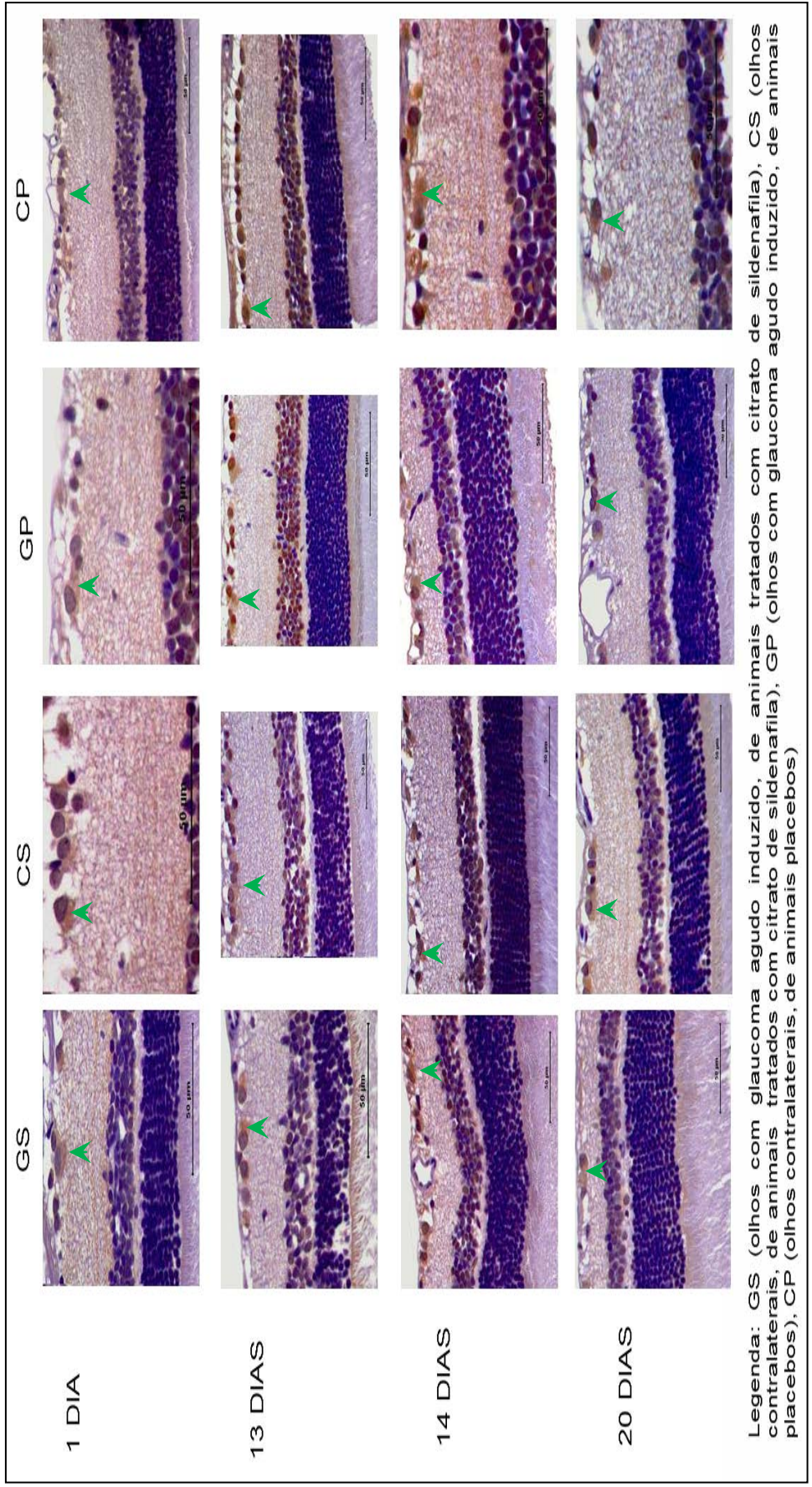


Figura 15. Fotomicrografias de imunomarcção da caspase-9 (1:100). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hígidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

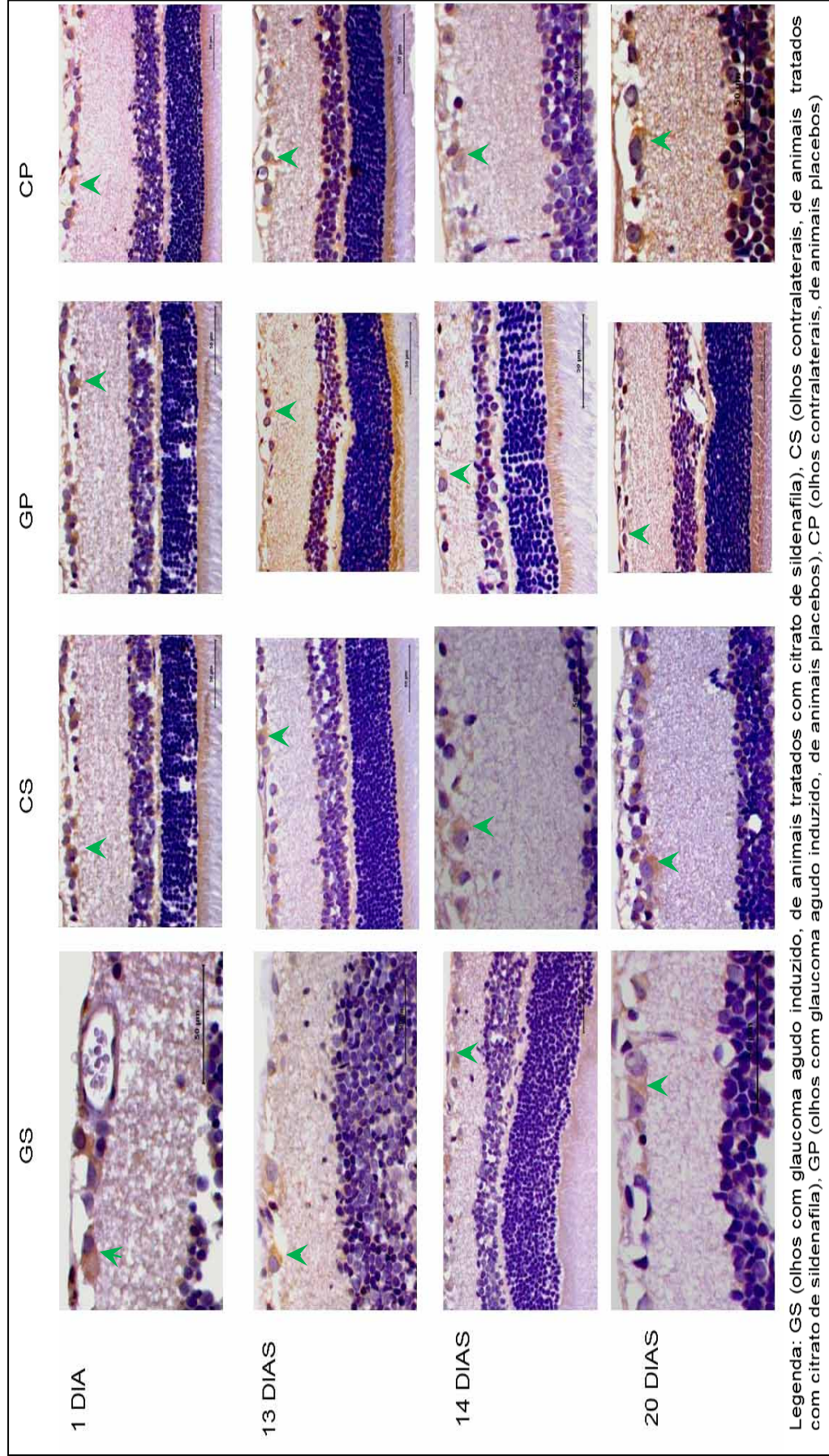


Figura 16. Fotomicrografias de imunomarcção da caspase-3 (1:250). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hígidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

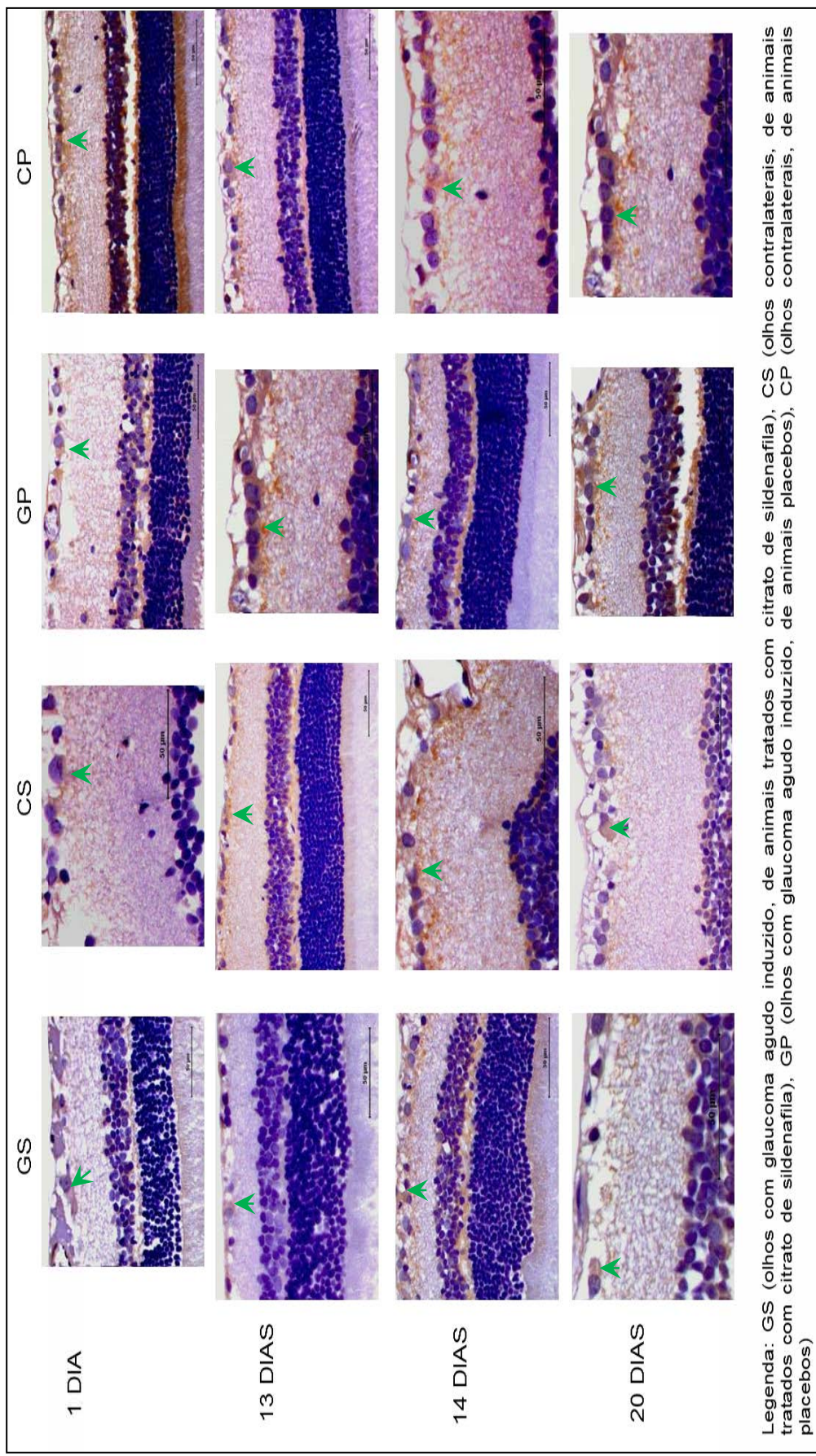


Figura 17. Fotomicrografias de imunomarcção da Bcl-2 (1:1000). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hígdos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

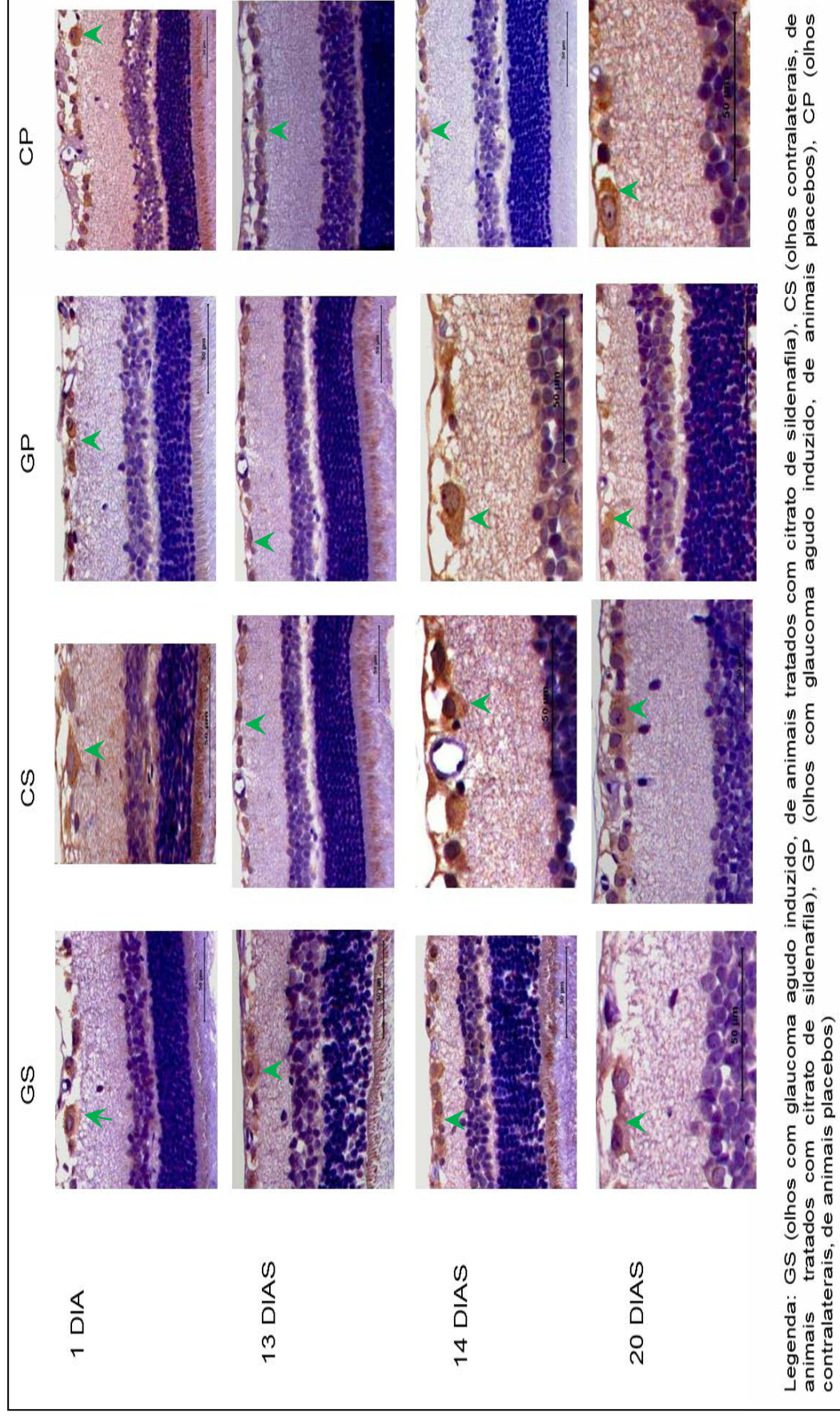


Figura 18. Fotomicrografias de imunomarcção da NOS-2 (1:500). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (setas verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hígidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

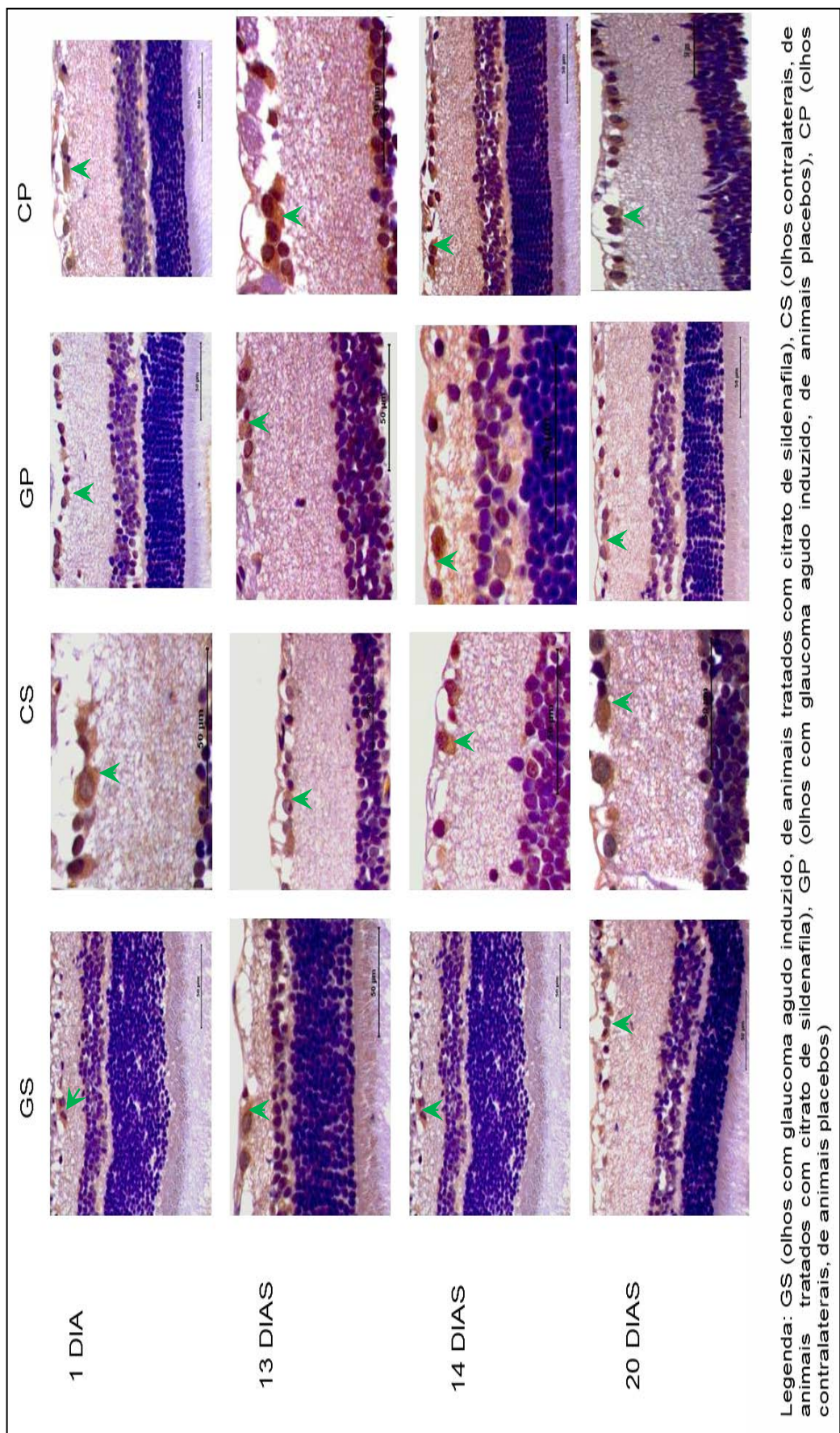


Figura 19. Fotomicrografias de imunomarcção da PDE-5 (1:500). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (seta verde) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hípidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

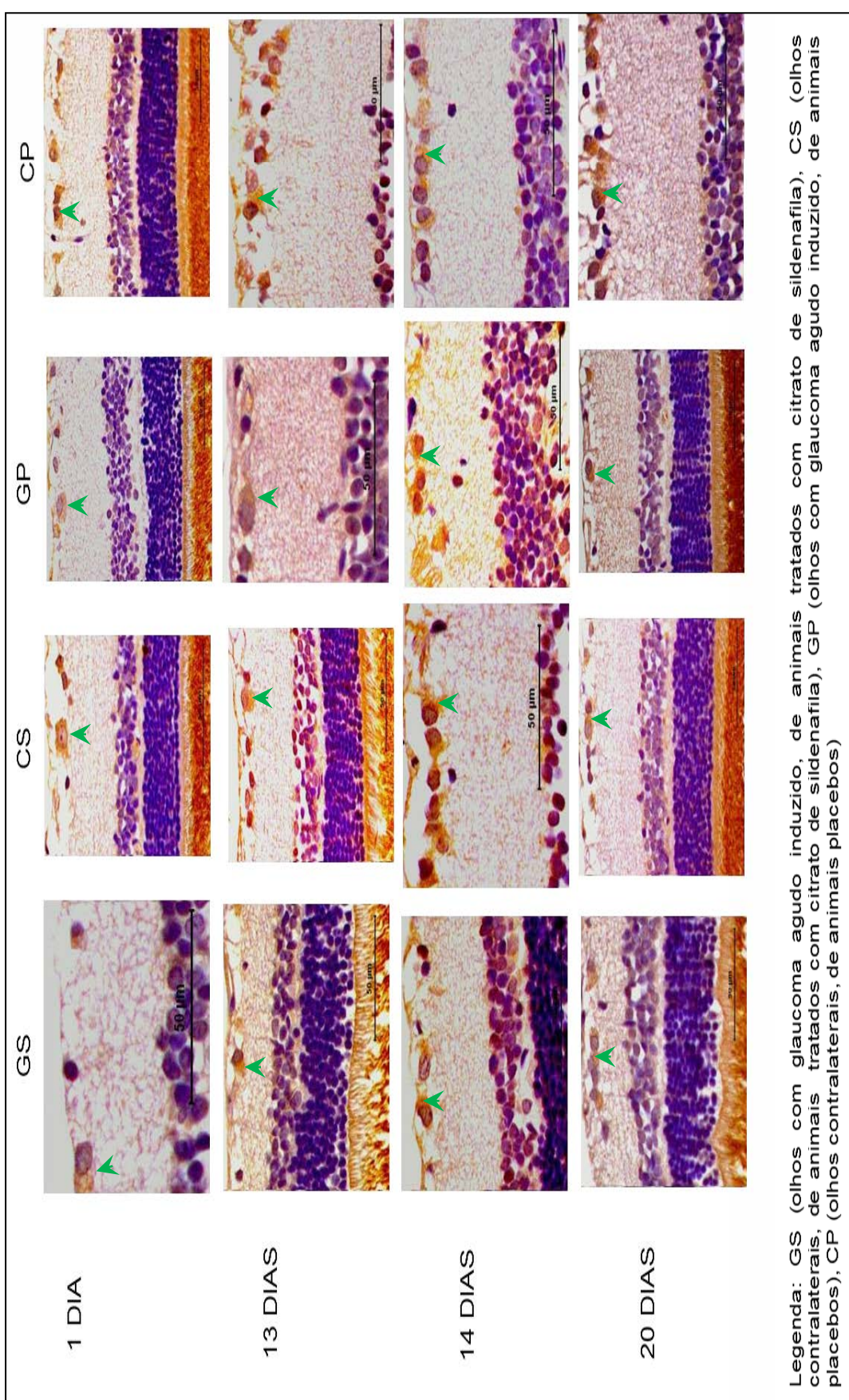


Figura 19. Fotomicrografias de imunomarcção da PDE-6 (1:1000). Notar marcação no citoplasma de células da camada de células ganglionares da retina (setas pretas) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Ratos (Rattus norvegicus), *Lewis/SsNHsd*, machos, adultos, hígidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

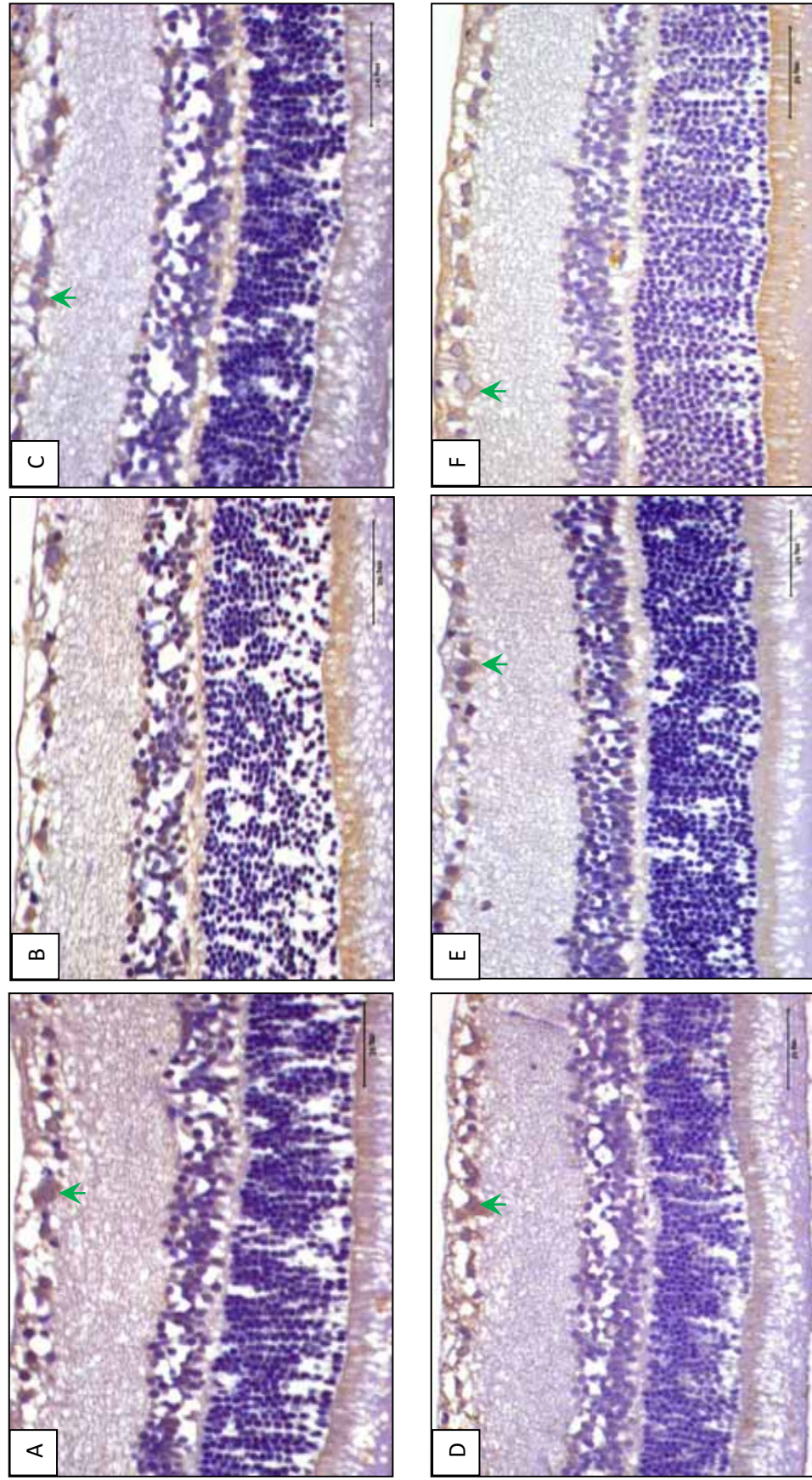


Figura 20. Fotomicrografias de imunomarcção para caspase-9 (1:100) em (A), caspase-3 (1:250) em (B), Bcl-2 (1:1000) em (C), NOS-2 (1:500) em (D), PDE-5 (1:500) em (E) e PDE-6 (1:1000) em (F), no Grupo Controle. Notar marcação no citoplasma em células da camada de células ganglionares da retina (setas verdes) (Complexo Peroxidase, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, 40x) Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp. Rato (*Rattus norvegicus*), Lewis/SsNHsd, machos, adultos, hígidos, Botucatu, SP, Brasil, 2013.

5.7 Teste de *TUNEL*

À avaliação descritiva da distribuição dos escores de marcação pelo teste de *TUNEL*, em células da camada de células ganglionares da retina, positivas para fragmentação de DNA, observou-se tendência de maior marcação em ratos com glaucoma, quando comparados aos controles e aos contralaterais. Ressalta-se que a marcação foi mais expressiva em olhos com glaucoma de animais não tratados, comparativamente a olhos controles e a olhos com glaucoma tratados. O grupo controle apresentou escore 1 em 75% dos olhos avaliados e escore 2 em 25% deles (Figura 18)

Tabela 8. Número de casos da distribuição do escore de marcação pelo teste de *TUNEL*, por grupo estudado, na camada de células ganglionares da retina. Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Lewis/SsNHsd*, adultos, machos, hípidos. Botucatu, SP, Brasil, 2013.

GRUPOS	TRATAMENTO	Teste de <i>TUNEL</i> (escore de células positivas)							
		Olho Contralateral				Olho Glaucoma			
		1	2	3	4	1	2	3	4
1 dia	Sildenafil	1/3	1/3	1/3		2/3	1/3		
	Placebo	1/3	2/3			1/3	2/3		
13 dias	Sildenafil		3/3			2/3	1/3		
	Placebo		3/3			1/3	2/3		
14 dias	Sildenafil		3/3			3/3			
	Placebo		1/3	2/3				3/3	
20 dias	Sildenafil	2/3	1/3			2/3	1/3		
	Placebo	2/3	1/3			1/3	2/3		

Legenda: escore de marcação ao teste de *TUNEL* 1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) e 4 (76-100%).

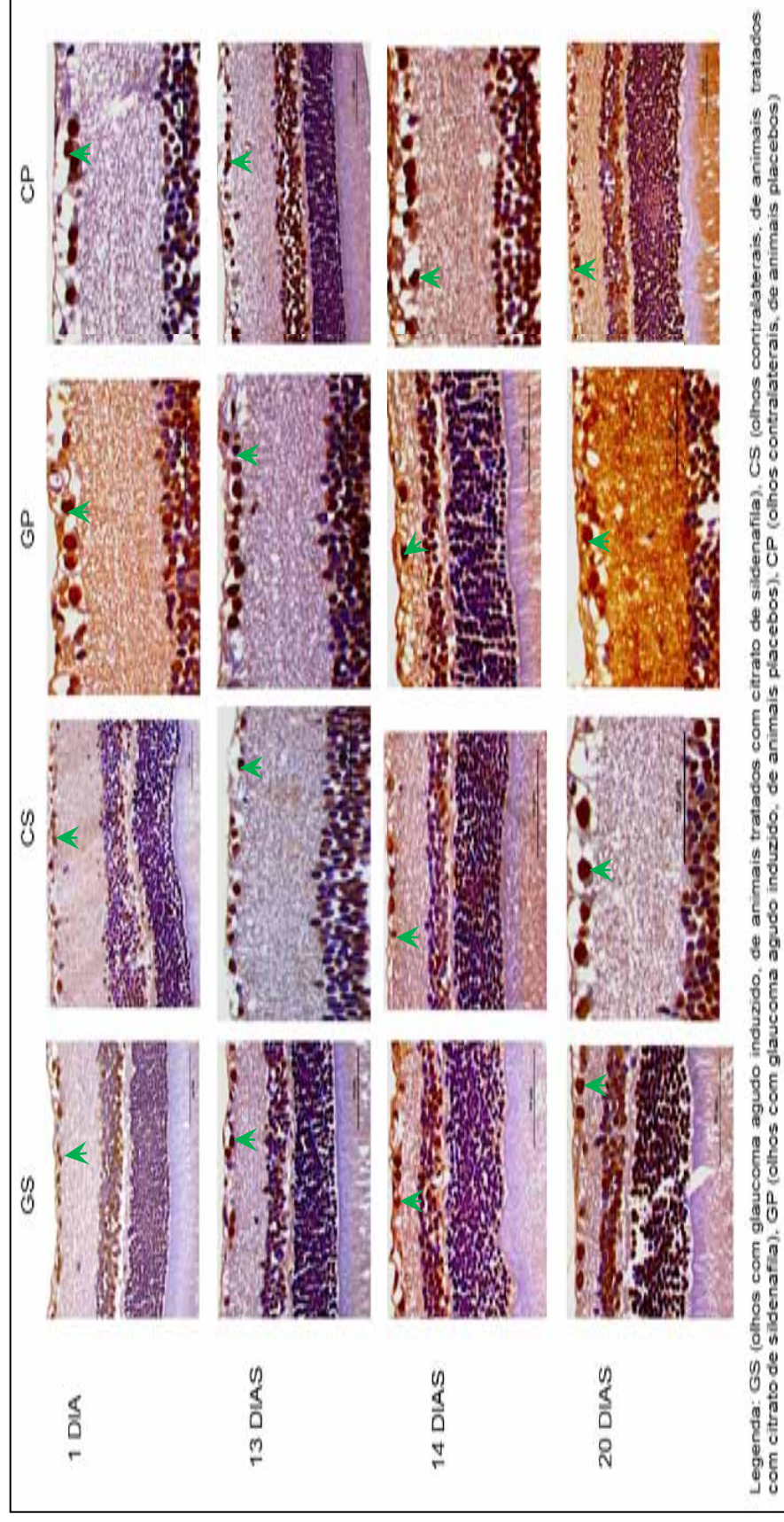


Figura 21.

Fotomicrografias da marcação pelo teste de TUNEL, de células positivas, com marcação nuclear, na camada de células ganglionares da retina (setas verdes - células positivas para apoptose)(40x). Ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Lewis/SsNHsd, adultos, machos, hígidos. Laboratório de Imuno-histoquímica FMVZ/Unesp, Câmpus Botucatu, SP, Brasil, 2013.

6 DISCUSSÃO

Em seres humanos, a principal via de drenagem do humor aquoso é composta pela malha trabecular, pelo canal de Schlemm, por vasos e por canais coletores. Kagemann et al. (2014) demonstraram que em olhos com PIO elevada há diminuição do diâmetro no canal de Schlemm, influenciando sobremaneira na patogênese do glaucoma. Cães, protagonistas maiores do glaucoma em animais não possuem canal Schlemm. Em contrapartida, ratos o possuem. Outra semelhança, entre esta espécie e os humanos, é quanto a relação entre astrócitos ultraestruturais e axônios, resulta que alterações em retina e nervo óptico, decorrentes da elevação da PIO, sejam fisiopatologicamente semelhante às observadas no homem, fatos que justificam a utilização desta espécie em modelos de glaucoma, como o empregado no presente estudo (MORRISON; JOHNSON; CEPURNA, 2008).

O método empregado para se reproduzir a elevação aguda da PIO, conhecido como de “isquemia-reperfusão”, é amplamente utilizado. Reconhece-se a isquemia como a principal causa de apoptose e consequente necrose, com danos ao tecido retiniano (LAGRÈZE et al., 1998; ROSENBAUM et al., 2010; SANDALON et al., 2013).

No presente estudo, obtiveram-se bons resultados com o modelo experimental e com o método empregados, representados por condições histopatológicas que decorrem à similitude da literatura, relativamente às lesões por isquemia/reperfusão, com ênfase para as células ganglionares da retina, relativamente a diferentes etapas da apoptose (vacualização, picnose, condensação cromatínica), e diminuição na contagem de CGR, como descrito por Katai e Yoshimura (1999), Lam; Abler; Tso (1999), Mittag et al. (2000), Agar et al. (2006), Dvorianchikova; Degterev; Ivanov (2014) e Schmid et al. (2014).

Scott et al. (2013) estudaram alterações precoces na retina e no nervo óptico de cães com POAG, empregando a hematoxilina/eosina (HE) para contagem de células na CGR, e marcação com teste de *TUNEL* em estudo sobre apoptose. Foram encontrados infiltrados inflamatórios (neutrófilos), células necróticas, perda de

CGR e adelgaçamento de todas camadas neurosensoriais da retina. No presente estudo, os achados não divergiram.

Substâncias podem ser utilizadas para facilitar a observação de alterações sofridas pelas CGR no glaucoma, como a aplicação retrógrada de *fluorogold* (GARCIA-VALENZUELA et al., 1995; MITTAG et al., 2000; THANOS; NASKAR, 2004; GUO et al., 2005; REICHSTEIN et al., 2007; JHA et al., 2011; SANDALON et al., 2013) e *fast blue* (LAQUIS; CHAUDHARY; SHARMA, 1998), seguida pela avaliação à microscopia com fluorescência.

Relativamente ao adelgaçamento das camadas da retina, visibilizado em todos os olhos analisados, à exceção dos do grupo controle, mediante à morfometria (espessura das camadas e da retina como um todo) em lâminas coradas com HE, e o emprego do programa de análise de imagens³², semelhante ao que fora realizado por Chan et al. (2012). Os dados de espessura encontrados corroboraram com os encontrados no curso da evolução do glaucoma. Métodos adjuntos têm sido empregados para tal análise. Em muitos casos a tomografia de coerência óptica (OCT) *in vivo* tem se mostrado como de grande utilidade. (SCHUMAN et al., 1995; LEUNG, 2014; GRAMLICH et al., 2014; HOOD et al., 2014).

A retina exhibe espessuras diferentes na periferia e no centro. Por essa razão, realizou-se, na presente pesquisa, a média, em μm , a partir de 25 medidas por lâmina de cada olho, em corte transversal, de todas as camadas da retina, incluindo o centro do nervo óptico, estendendo-se da ora serrata nasal à ora serrata lateral, a exemplo do que fora realizado por Bayer et al. (2001) na avaliação da espessura das camadas da retina em uma linhagem de camundongos (DBA/2), em que o glaucoma se desenvolve espontaneamente.

Substâncias têm sido estudadas, quanto a estratégias de proteção contra a neurodegeneração no glaucoma. Modelos experimentais e investigações semelhantes aos empregados na presente pesquisa já foram utilizados. Abarcam-se a catalase (CHEN; TANG, 2011), a pentoxifilina (DEMIR et al., 2003), a diosmina (TONG et al., 2012), o fator estimulador de colônias de granulócitos (SHIMA et al.,

³² Leica QWin v3.0, em microscópio óptico convencional (Leica, DMR) equipado com câmara digital (Leica, DFC500). Leica Biosystems, Richmond, USA

2012), a tetradina (LI et al., 2014), o tripsiton (SWARTZ; LINN; LINN, 2013), a lepitina (GUPTA, 2013), dentre outros.

Visando-se à neuroproteção no modelo de glaucoma empregado nesta investigação, em que a neuropatia advém, principalmente, de alterações vasculares, optou-se por se avaliar o citrato de sildenafil, tendo em conta que o fármaco foi citado como benéfico em diferentes modelos lesão por isquemia/reperfusão, nas lesões hepáticas (LI et al., 2005), em doenças neurodegenerativas, como na lesão cerebral (ZHANG et al., 2006), medular (SERARSLAN et al., 2010) e no Alzheimer (CUADRADO-TEJEDOR et al., 2011), em algumas formas de cardiomiopatia (SALLOUM et al., 2008), na torção testicular (BEHESHTIAN et al., 2008), em lesões renais (ORUC et al., 2010) e intestinais (SOYDAN et al., 2009) e na hipertensão arterial pulmonar (SHAPIRO et al., 2013).

Grunwald et al. (2001) demonstraram não haver danos à retina, em pacientes tratados com sildenafil, comparativamente aos placebos. No presente estudo, as doses de sildenafil utilizadas variaram entre 0,5-1,0 mg/kg, em diferentes períodos de utilização. Não se encontraram efeitos nocivos à retina, de consoante com a literatura, que cita como dose máxima, para seres humanos, de 100 mg por indivíduo (máximo de 2 mg/kg), para que não decorram efeitos adversos (CARSON; LUE, 2005).

Visando-se a avaliar se o fármaco poderia causar efeitos contrários aos desejados, uma vez que a vasodilatação pode suscitar hipotensão, estudos foram conduzidos. Observou-se que administrando-se o máximo da dose diária recomendada (100mg) em períodos agudos de tratamento, não se encontraram adversidades relativamente à perfusão ocular. Polak et al. (2003) relataram que o sildenafil aumenta o diâmetro vascular e fluxo sanguíneo na retina, sem alterar a PIO. Koksai et al. (2005) observaram aumento do fluxo sanguíneo em artérias da retina. Entretanto, os estudos revelaram lesão ao nervo óptico e diminuição do campo visual em pacientes que utilizaram o sildenafil cronicamente (DUSZAK et al., 2007; PEPIN; PITA-ROWE, 2008; SU; ANG; TOW, 2008).

Gerometta et al. (2010) reportaram que o sildenafil aumentou significativamente a pressão intraocular de ovelhas tratadas tanto com dose a mínima recomendada (50mg), quanto com a dose máxima (100mg), decorrida uma

hora a ingestão do fármaco. Em 2011, realizando estudos em seres humanos, os mesmos autores verificaram aumento da PIO decorrida uma hora da ingestão do medicamento. Houve, entretanto, retorno aos valores basais na segunda hora e diminuição das pressões sistólica e diastólica. Valores mínimos foram observados aos 90 minutos da administração. Não foram encontradas alterações significativas na PIO e na pressão arterial sistêmica, quando os mesmos pacientes receberam placebo. Por conclusão, os autores admitiram que o sildenafil pode ensejar aumento transitório da PIO e que tal pode ser representativo em pacientes que recebem cronicamente o fármaco (GEROMETTA et al., 2011).

Buscando elucidarem-se os mecanismos pelos quais o sildenafil poderia atuar na neuroproteção no glaucoma, optou-se pela marcação protéica, à imuno-histoquímica, quanto à sua farmacodinâmica na retina (PDE-5, PDE-6) e à apoptose (NOS-2, BCL-2, Caspase 3, Caspase 9). Esperava-se que, na retina, o sildenafil, ao inibir PDE-5, por via óxido nítrico, produzido pela NOS, induziria à alguma vasodilatação e à homeostasia celular (recuperação do fluxo sanguíneo e manutenção da nutrição celular), reduzindo os estímulos de ativação da caspase 9 e, por conseguinte, da caspase 3, ensejando aumento de Bcl-2, e proteção das CGR.

A imuno-histoquímica é método utilizado para estudos de mecanismos moleculares envolvidos na patogênese glaucomatosa (KATAI; YOSHIMURA, 1999; LAM; ABLER; MARK, 1999; JOHNSON et al., 2000; HANNINEN et al., 2002; MCKINNON et al., 2002; GUO et al., 2005; JI et al., 2005; ROSENBAUM et al., 2010; JHA et al., 2011; YANG et al., 2011; VIGNESWARA et al., 2012; CHEN et al., 2013; DU et al., 2013; SCOTT et al., 2013; DVORANTCHIKOVA; DEGTEREV; IVANOV et al., 2014; LEVKOVITCH-VERBIN et al., 2014; SCHMID et al., 2014). Ressalta-se que na maioria destes estudos empregaram-se métodos moleculares adjuntos, para validação dos resultados, como o Western blotting (KATAI; YOSHIMURA, 1999; HANNINEN et al. 2002; ROSENBAUM et al. 2010; JHA et al., 2011; KO et al., 2011), e a expressão gênica (PCR) (KATAI; YOSHIMURA, 1999; THANOS; NASKAR, 2004; DVORANTCHIKOVA; DEGTEREV; IVANOV et al., 2014; LEVKOVITCH-VERBIN et al., 2014).

À imuno-histoquímica, na presente pesquisa observou-se eficiência do fármaco em inibir a fosfodiesterase do tipo 5. Houve menor marcação de PDE-5, em

todos os grupos tratados. Relatos reportaram efeitos visuais adversos com o uso do sildenafil, decorrentes da ação indireta do fármaco, com inibição cruzada da PDE-6 em cones e em bastonetes (YANG et al., 2011). Foresta et al. (2008) pesquisaram, à imuno-histoquímica, a expressão da PDE-5 e PDE-6 no bulbo do olho de dois cadáveres humanos. Os autores encontraram expressão da enzima PDE-6 na camada de fotorreceptores, assim como fora observado no presente estudo em que houve maior alta expressão desta proteína na camada de fotorreceptores. Sabe-se que a PDE-6 participa na fototransdução visual (TAYLOR et al., 2001).

Um dos desafios no desenvolvimento de substâncias específicas inibidoras de PDE-5 para fins terapêuticos é a similaridade dos sítios catalíticos da PDE-5 e PDE-6, e as intercorrências para a visão. Não obstante, há como minimizá-los, empregando-se fármacos mais seletivos para a PDE-5, comparado ao sildenafil. Mochida et al. (2013) e Kotera et al. (2012) demonstraram, eletroretinograficamente e à hemodinâmica, que o Avanafil exhibe seletividade, relativamente à inibição de PDE-5, na comparação com a PDE-6, na retina, 25 vezes maior que o sildenafil (KOTERA et al., 2012). Outros fármacos, inibidores de fosfodiesterase do tipo 5, com maior seletividade que o sildenafil, para PDE-5, são o vardenafil e o tadalafil (SEFTTEL, 2004; WRIGHT, 2006).

Dados da presente pesquisa referentes à imunomarcação da PDE-6, em animais tratados, mostraram inconstância na marcação. A condição pode ser explicada não apenas pela inibição indireta induzida pelo sildenafil. Acrescenta-se que ela não apenas se restringiu à camada de fotorreceptores, mas foi também observada em camadas internas da retina. Pelos resultados, admiti-se que estudos adjuntos devam ser conduzidos para se esclarecerem a localização, a função e a interação entre PDE5/PDE-6 na retina.

O óxido nítrico desempenha papel relevante quanto à ação do sildenafil na retina, admitindo-se que a PDE-5 é responsável por regular o níveis de monofosfato de guanosina cíclico e que este modula a atividade endógena de ON, induzindo relaxamento da musculatura lisa dos vasos e vasodilatação (KUKREJA et al., 2005). Relatos informam sobre o papel do óxido nítrico na regulação da hemodinâmica na retina e no nervo óptico (BUERK; RIVA; CRANSTOUN, 1996; GALASSI et al., 2000; SPONSEL et al., 2000; SIU et al., 2000; PACHE et al., 2002; KURAHASHI et al.,

2002; AMARAL et al., 2014). No glaucoma, a alteração no fluxo sanguíneo está relacionada à disfunção endotelial, à hipotensão e ao aumento da viscosidade do sangue. Sabe-se que o ON é partícipe desses eventos (SCHMETTERER; POLAK, 2001).

O ON, destinado à vasodilatação, é produzido pela NOS-1 e pela NOS-3, ativadas mediante o complexo de cálcio/calmodulina. A NOS-2 ativa-se na presença de estímulos imunogênicos e inflamatórios, independentemente do cálcio, e seu estímulo é considerado como um dos fatores desencadeantes de apoptose no glaucoma, uma vez que é capaz de gerar quantitativo de ON, de peroxinitrito e de radicais hidroxila, induzindo à degeneração oxidativa da retina (SCHMETTERER; POLAK, 2001; WEINREB; KHAW, 2004; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007).

No presente trabalho, a NOS-2 apresentou imunomarcação em todos os grupos estudados e as células marcadas distribuíram-se por todas as camadas da retina, à similitude do que fora reportado por Neufeld et al. (2002). Encontrou-se, na presente investigação, maior marcação de NOS-2 em olhos com glaucoma. Tais dados corroboram aos aventados pela literatura, que informa sobre maior marcação de NOS-2 em olhos com glaucoma ou com lesões de isquemia/reperfusão. Observou-se, entretanto, que olhos com glaucoma tratados com sildenafil apresentaram menor marcação. Os achados podem representar e reforçar a idéia de que há neuroproteção exercida pelo sildenafil, possivelmente por estimulação a NOS-1, que diminui a atividade tóxica da NOS-2, como ficara evidente em dados descritos por Li et al. (2010), em que os autores observaram que o Polygonum Bistorta L. n-butyl Alcohol (PBNA) exerce efeito terapêutico sobre a retina, em lesão de isquemia/reperfusão, pelo aumento da atividade da NOS-1 e da NOS-3, e diminuição da atividade da NOS-2, elevando o teor de ON, e aumentando a anti-oxidação e a dilatação dos vasos sanguíneos.

Para se comprovar a ação do sildenafil, importante seria se avaliar também a NOS-1. Por induzir à produção de ON, a ela foi atribuída atividade neuroprotetora no glaucoma, uma vez que mantém o fluxo sanguíneo no tecido nervoso comprometido (TSUMAMOTO et al., 2002; TODA; NAKANISHI-TODA, 2007; LI et al., 2010; DU et al., 2013).

A neurodegeneração do glaucoma é decorrente da apoptose de células da CGR, gerada, principalmente, pela ativação da cascata apoptótica pela via das caspases (LAM; ABLER; TSO, 1999). No presente estudo, observou-se maior imunomarcação das caspases 9 e 3 em olhos com glaucoma, ratificando dados da literatura, que revelam que no glaucoma as principais caspases envolvidas com a morte de células na retina são as iniciadoras 8 e 9, estimulando a ação executora da 3, em células ganglionares da retina (KATAI; YOSHIMURA, 1999; ROBERT; NICKELLS, 1999; MCKINNON et al., 2003).

Katai e Yoshimura (1999) reportaram haver ativação da caspase executora 1 em lesões de isquemia/reperfusão, e que a marcação à IHC se deu nas camadas externas da retina e, portanto, não diretamente relacionada à morte de CGR, em que se encontraram maior presença da caspase-3. No presente estudo, os resultados não divergiram tendo havido menor marcação da caspase-3 em animais tratados com sildenafil, dando a perceber a ação da substância na melhoria do fluxo sanguíneo, diminuindo estímulos desencadeadores de apoptose.

Na presente investigação, revelou-se imunomarcação de Bcl-2, mais intensa nos indivíduos tratados, comparativamente aos não tratados, de consoante com a literatura. A Bcl-2 (anti-apoptótica), proteína do grupo Bcl-2, participe da regulação da cascata apoptótica, apresentou-se pouco expressa, como fora mostrado em modelos de glaucoma. Outrossim, mostrou-se em níveis constantes ou elevados com o tratamento neuroprotetor (ROBERT; NICKELLS; 1999). Pesquisa sobre a ação neuroprotetora da Sinvastatina em modelo de injúria retiniana por isquemia/reperfusão, semelhante ao conduzido no presente estudo, demonstrou que o fármaco regula a expressão do gene Bcl-2, mantendo-o em níveis regulares. Em paralelo, evidenciou que a prevenção da morte de CGR possivelmente decorre de alterações ensejadas na via apoptótica (KO et al., 2011).

Observou-se, no presente estudo, em olhos com glaucoma de animais tratados, manutenção das CGR, ratificada pela marcação do teste de *TUNEL*. O emprego do método para a marcação de fragmentação do DNA, visando-se à observação de células em apoptose, é frequente em modelos de estudo do glaucoma. Os dados encontrados em olhos com glaucoma corroboram com os da literatura, notadamente quanto à presença de apoptose em todas camadas da

retina, com ênfase para a camada de CGR (KATAI; YOSHIMURA, 1999; LAM; ABLER; TSO, 1999; JOHNSON et al., 2000; HANNINEN et al., 2002; JI et al., 2005; AGAR et al., 2006; ROSENBAUM et al., 2010; GUERIN et al., 2011; JHA et al., 2011; KO et al., 2011; VIGNESWARA et al., 2012; SCOTT et al., 2013).

A presente investigação possibilitou observar que quanto maior o período de avaliação pós indução aguda do glaucoma, maior a intensidade e número de células marcadas para o teste de *TUNEL*, de consoante com o aventado por Johnson et al. (2000) relativamente às consequências temporais, para a retina e para o nervo óptico, quando da elevação da PIO. Observou-se, entretanto, menor escore de marcação em grupos mantidos, por maiores períodos pós indução do glaucoma. O avanço da neuropatia implica em morte de CGR. Há diminuição no número de células e presença de células picnóticas afuncionais não positivas ao método *TUNEL*, o que explica os achados.

Não se pode firmar que o sildenafil seja um neuroprotetor, em razão de certas variáveis, como o tamanho amostral, por exemplo, que impossibilitou concluir por assertivas definitivas. É, todavia, factível admitir que o fármaco possibilitou observar maior tendência de sobrevida de CGR.

Pacientes com grave dano neurogênico, diabetes melito ou com doença vascular severa podem ser resistentes aos efeitos dos inibidores da fosfodiesterase. A condição decorre da diminuição da expressão ou da atividade das sintetases neuronal e endotelial, à falha na liberação do ON ou da degradação persistente do ON. O evento impede a produção satisfatória de GMPc, reduzindo a ação dos inibidores da PDE-5. Como no glaucoma, ocorrem danos vasculares na retina e no nervo óptico, o inibidor de PDE poderia apresentar eficácia vasodilatadora reduzida (BORUTAITE et al., 2003).

Resultados da presente pesquisa, somados a autorais deste mesmo grupo e de outros, quanto às ações benéficas potenciais de inibidores de PDE, fortalecem a convicção de que estudos adicionais ofereceriam grande contribuição.

Segundo Jindal (2013), a patogênese do glaucoma em níveis moleculares pode ser comparada à de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson. Ressalta-se que, além dos métodos atuais para o controle da PIO, intervenções terapêuticas, no glaucoma, devem incluir substâncias capazes de inibir

a apoptose, de manter o transporte axonal das neurofinas, de evitar danos por radicais livres e por ácidos graxos poli-insaturados, relativamente à disfunção mitocondrial e à ativação da apoptose, melhorando o fluxo sanguíneo da retina e regulando as expressão gênica alterada, dentre outras variáveis.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, na forma como a pesquisa fora concebida, é factível admitir que o citrato de sildenafil desempenhou papel neuroprotetor na retina de ratos (*Lewis/SsNHsd*) com glaucoma agudo induzido. Encontrou-se sobrevida de células na camada ganglionar da retina de indivíduos com glaucoma tratados com o fármaco, demonstrada à morfometria e à marcação pelo teste de *TUNEL*. À imuno-histoquímica observou-se que esta ação protetora pode estar relacionada a estímulos de fatores anti-apoptóticos.

8 REFERÊNCIAS ³³

ADER R. Conditioned immunomodulation: research needs and directions. **Brain Behavior Immunology**, v.17, n.1, p.51-57, 2003.

AGAR, A.; LI, S.; AGARWAL, N.; CORONEO, M.T.; HILL, M.A. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. **Brain Research**, v. 1086, p. 191-200, 2006.

ALMASIEH, M.; WILSON, A.M.; MORQUETTE, B.; CUEVA VARGAS, J.L.; DI POLO, A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. **Progress in Retinal and Eye Research**, n. 31, v. 2, p. 152-181, 2012.

AMARAL, A.V.C.; SILVA, G.A.; COSTA, A.P.A.; OLIVEIRA, K.S.; JORDÃO, P.; RIBEIRO, A.P.; RENZO, R.; LAUS, J.L. Effects of sildenafil citrate on retrobulbar and retinal circulation of rabbits. **Ciência Rural**, n.8, v.44, p., 2014.

ARIKAN, D.C.; BAKAN, V.; KURUTAS, E.B.; SAYAR, H.; COSKUN, A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 45, n. 11, p. 2203-2209, 2010.

ASHBY, B. Prostaglandinas e autacóides correlatos. In: MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. **Brody – Farmacologia Humana**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, p. 211-216, 2006

BALTMER, A.; DUGGAN, J.; NIZARI, S.; SALT, T.E.; CORDEIRO, M.F. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role?. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 5, p. 554-566, 2010.

BAYER, A.U.; NEUHARDT, T.; MAY, A.C.; MARTUS, P.; MAAG, K.; BRODIE, S.; LU'TJEN-DRECOLL, E.; PODOS, S.M.; MITTAG, T. Retinal Morphology and ERG Response in the DBA/2Nnia Mouse Model of Angle-Closure Glaucoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, May, v. 42, n. 6, 2001.

BEHESHTIAN, A.; SALMASI, A.H.; PAYABVASH, S.; KIUMEHR, S.; GHAZINEZAMI, B.; RAHIMPOUR, S.; TAVANGAR, S.M.; DEHPUR, A.R. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. **World Journal of Urology**, v. 26, n. 2, p. 197-202, 2008.

BLOCKER, T.; VAN DER WOERDT, A. The feline glaucomas: 82 cases (1995-1999). **Veterinary Ophthalmology**, v.4, n.2, p.81-85, 2001.

BORUTAITE, V.; JEKABSONE, A.; MORKUNIENE, R.; BROWN, G.C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome

³³ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

c release and apoptosis induced by heart ischemia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 4, p. 357- 366, 2003.

BOUHENNI, R.A.; DUNMIRE, J.; SEWELL, A.; EDWARD, D.P. Animals models of glaucoma. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, 2012.

BUERK, D.G.; RIVA, C.E.; CRANSTOUN, S.D. Nitric oxide has a vasodilatory role in cat optic nerve head during flicker stimuli. **Microvascular Research**, v. 52, n. 1, p. 13-26, 1996.

BURR, J.M.; MOWATT, G.; HERNÁNDEZ, R.; SIDDIQUI, M.; COOK, J.; LOURENCO, T.; RAMSAY, C.; VALE, L.; FRASER, C.; AZUARA-BLANCO, A.; DEEKS, J.; CAIRNS, J.; WORMALD, R.; MCPHERSON, S.; RABINDRANATH, K.; GRANT, A. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for open angle glaucoma: a systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 11, n. 41, 2007.

CARSON, C. C.; LUE, T. F. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. **BJU International**, Oxford, v. 96, p. 257-280, 2005.

CHAN, T.F.; CHIU, K.; LOK, C.K.M.; HO, W.L.; SO, K.; CHANG, R.C. Morphometric Analyses of Retinal Sections. **Journal of Visualized Experiments**, v. 60, p. 1-6, 2012.

CHEN, B.; TANG, L. Protective effects of catalase on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. **Experimental Eye Research**, v. 93, p. 599-606, 2011.

CHEN, C.; XU, Y.; ZHANG, J.; ZHU, J.; ZHANG, J.; HU, N.; GUAN, H. Altered Expression of nNOS/NIDD in the Retina of a Glaucoma Model of DBA/2J Mice and the Intervention by nNOS Inhibition. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.51, n.1, p.47-56, 2013.

CIOFFI, G.A.; SULLIVAN, P. The effect of chronic ischemia on the primate optic nerve. **European Journal of Ophthalmology**, v. 9, Suppl 1, S34-36, 1999.

CLAVIEN P. A.; RUDIGER H. A.; SELZNER, M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. **Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 869-879, 2001.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Laboratory animals. In:_____. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2, 1997, v. 31, p. 1-32.

COYLE, D.; DRUMMOND, M. The economic burden of glaucoma in UK. **PharmacoEconomics**, v.7, n.6, p. 484-489, 1995.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Pharmacology of fosfodiesterase 5 inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**, v. 56, n. 6, p. 453-459, 2002.

CUADRADO-TEJEDOR, M.; HERVIAS, I.; RICOBARAZA, A.; PUERTA, E.; PÉREZ-ROLDÁN, J.M.; GARCÍA-BARROSO, C.; FRANCO, R.; AGUIRRE, N.; GARCÍA-OSTA, A. Sildenafil restores cognitive function without affecting β -amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **British Journal Pharmacology**, v. 164, n. 8, p. 2029-2041, 2011.

CRISH, S.D.; CALKINS, D.J. Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. **Neuroscience**, v. 176, p. 1-11, 2011.

DEMIR, T.; ULAS, F.; OZERCAN, I.; ILHAN, N.; CELIKER, U.; YASAR, M.A. Protective Effects of Pentoxifylline in Retinal Ischemia/Reperfusion Injury. **Ophthalmologica**, v. 217, p. 217-337, 2003.

DEVAN, B.D.; SIERRA-MERCADO, D. JR.; JIMENEZ, M.; BOWKER, J.L.; DUFFY, K.B.; SPANGLER, E.L.; INGRAM, D.K. Fosfodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.79, n. 4, p. 691- 699, 2004.

DOGANAY, S.; EVEREKLIOGLU, C.; TURKOZ, Y.; ER, H. Decreased nitric oxide production in primary open-angle glaucoma. **European Journal of Ophthalmology**, v. 12, n. 1, p. 44-48, 2002.

DU, A.J.; REN, B.; GAO, X.W.; YANG, L.; FU, Y.; ZHAO, X.D. Effects of aminoguanidine on retinal apoptosis in mice with oxygen-induced retinopathy. **International Journal of Ophthalmology**, v.6,n.4,p.436-441, 2013.

DUGGAL, P.; KLEIN, A.P.; LEE, K.E.; IYENGAR, S.K.; KLEIN, R.; BAILEY-WILSON, J.E.; KLEIN, B.E. A genetic contribution to intraocular pressure: the beaver dam eye study. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 2, p. 555-560, 2005.

DUSZAK, R.; VERGHESE, M.; RINEHART, C.; ALEXANDER, A. Optic atrophy after sildenafil use. **Optometry**, v.78, n.7, p.329-330, 2007.

DVORANTCHIKOVA, G.; DEGTEREV, A.; IVANOV, D. Retinal ganglion cell (RGC) programmed necrosis contributes to ischemia/reperfusion-induced retinal damage. **Experimental Eye Research**, v. 103, p. 1-7, 2014.

EBRAHIMI, F.; SHAFAROODI, H.; ASADI, S.; NEZAMI, B.G.; GHASEMI, M.; RAHIMPOUR, S.; HASHEMI, M.; DOOSTAR, Y.; DEHPOUR, A.R. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 7, p. 556–564, 2009.

ERCEG, S.; MONFORT, P.; HERNÁNDEZ-VADEL, M.; RODRIGO, R.; MONTOLIU, C.; FELIPO, V. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. **Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 299-306, 2005.

FAROOQ, M.U.; NARAVETLA, B.; MOORE, P.W.; MAJID, A.; GUPTA, R.; KASSAB, M.Y. Role of sildenafil in neurological disorders. **Clinical Neuropharmacology**, v.31, n.6, p.353-562, 2008.

FISHER, P.W.; SALLOUM, F.; DAS, A.; HYDER, H.; KUKREJA, R.C. Fosfodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. **Circulation**, v. 111, n. 113, p. 1601–1610, 2005.

FLAMMER, J. Glaucomatous optic neuropathy: a reperfusion injury. **Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde**, v. 218, n. 5, p. 290-291, 2001.

FLAMMER, J.; ORGÜL, S.; COSTA, V.P.; ORZALES, N.; KRIEGLSTEIN, G.K.; SERRA, L.M.; RENARD, J.P.; STEFÁNSSON, E. The impact of ocular blood flow in glaucoma. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n. 4, p. 359-393, 2002.

FLAMMER, J.; MOZAFFARIEH, M. What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? **Survey of Ophthalmology**, v. 52, Suppl. 2, S162-S173, 2007.

FORESTA, C.; CARETTA, N.; ZUCCARELLO, D.; POLETTI, A.; BIAGIOLI, A.; CARETTI, L.; GALAN, A. Expression of the PDE5 enzyme on human retinal tissue: new aspects of PDE5 inhibitors ocular side effects. **Eye**, London, v. 22, p. 144–149, 2008.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**, Washington, v. 91, p. 651-690, 2011.

GALASSI, F.; SODI, A.; UCCI, F.; RENIERI, G.; PIERI, B.; MASINI, E. Ocular haemodynamics and nitric oxide in normal pressure glaucoma. **Acta Ophthalmologica Scandinavica Supplement**, v. 232, p. 37-38, 2000.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GARCIA-VALENZUELA, E.; SHAREEF, S.; WALSH, J.; SHARMA, S.C. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. **Experimental Eye Research**, v. 61, n. 1, p. 33-44, 1995.

GEROMETTA, R.; ALVARES, L. J.; CANDIA, O. A. Effects of sildenafil and tadalafil on intraocular pressure in sheep: implications for aqueous humor dynamics. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Saint Louis, v. 51, n. 6, p. 3139-3144, 2010.

GEROMETTA, R.; LAWRENCE, J. A., OSCAR, A. C. Effect of sildenafil on intraocular pressure and blood pressure in human volunteers. **Experimental Eye Research**, London, v. 93, p. 103-107, 2011.

GHOFRANI, H. A.; WIEDERMANN, R.; ROSE, F.; OLSCHESKI, H.; SCHERMULY, R. T.; WEISSMAN, N. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe hypertension. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 7, p. 515-522, 2002.

GHOFRANI, H.A.; ROSE, F.; SCHERMULY, R.T.; OLSCHESKI, H.; WIEDEMANN, R.; KRECKEL, A.; WEISSMANN, N.; GHOFRANI, S.; ENKE, B.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 1, p. 158-164, 2003A.

GHOFRANI, H.A.; SCHERMULY, R.T.; ROSE, F.; WIEDEMANN, R.; KOHSTALL, M.G.; KRECKEL, A.; OLSCHESKI, H.; WEISSMANN, N.; ENKE, B.; GHOFRANI, S.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. Sildenafil for long term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 8, p. 1139-1141, 2003B.

GHOSH, R.; SAWANT, O.; GANPATHY, P.; PITRE, S.; KADAM, V. Phosphodiesterase inhibitors: their role and implications. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 1, n. 4, p. 1148-1160, 2009.

GOLDIM, J.R. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. Porto Alegre: HCPA, p. 28; 1995.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 617p.

GRAMLICH, O.W.; LUECKNER, T.C.S.; KRIECHBAUM, M.; TEISTER, J.; TAO, X.; PEIN, H.D.V; PFEIFFER, N.; GRUS, F.H. Dynamics, Alterations, and Consequences of Minimally Invasive Intraocular Pressure Elevation in Rats. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v.55, n.1, p.600-611, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-54, 2007.

GRUNWALD, J.E.; PILTZ, J.; HARIPRASAD, S.M.; DUPONT, J.; MAGUIRE, M.G. Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension. **American Journal of Ophthalmology**, v. 127, n. 5, p. 516-522, 1999.

GRUNWALD, J.E.; JACOB, S.S.; SIU, K.; PILTZ, J.; DUPONT, J. Acute effects of sildenafil citrate (Viagra) on intraocular pressure in open-angle glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, v. 132, n. 6, p. 872-874, 2001.

GUERIN, M.B.; DONOVAN, M.; MCKERNAN, D.P.; O'BRIEN, C.J.; COTTER, T.G. Agedependent rat retinal ganglion cell susceptibility to apoptotic stimuli: implications for glaucoma. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.39, n.3, p. 243-251, 2011.

GUO, L.; MOSS, S.E.; ALEXANDER, R.A.; ALI, R.R.; FITZKE, F.W.; CORDEIRO, M.F. Retinal Ganglion Cell Apoptosis in Glaucoma Is Related to Intraocular Pressure and IOP-Induced Effects on Extracellular Matrix. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 1, 2005.

GUPTA, A. Leptin as a neuroprotective agent in glaucoma. **Medical Hypotheses**, v.81, p.797–802, 2013.

HANNINEN, V.A.; PATCHEVA, M.B.; FREEMAN, E.E.; PAULIN, N.R.; GROUSKEUTZ, C.L. Activation of caspases-9 in a rat model of experimental glaucoma, *Curent eye Research*, v.25, n.6, p.389-295, 2002.

HARJU, M.; VESTI, E. Blood flow of the optic nerve head and peripapillary retina in exfoliation syndrome with unilateral glaucoma or ocular hypertension. **Graefes Archieve of Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 239, n. 4, p. 271-277, 2001.

HAYREH, S.S.; PE'ER, J.; ZIMMERMAN, M.B. Morphologic changes in chronic high pressure experimental glaucoma in rhesus monkeys. **Journal of Glaucoma**, v. 8, n. 1, p. 56-71, 1999.

HERNANDEZ, M.R. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. **Progress in Retina and Eye Research**, v. 19, n. 3, p. 297-321, 2000.

HONRUBIA, F.; GARCIA-SANCHEZ, J.; MARTINEZ DE LA CASA, J. M.; SOTO, J. Conjunctival hyperemia with the use of latanoprost versus other prostaglandin analogues in patients with ocular hypertension or glaucoma: a meta-analysis of randomized clinical trials. **British Journal of Ophthalmology**. v.93, n.3, p.313-321, 2009.

HOOD, D.C.; SLOBODNICK, A.; RAZA, A.S.; MORAES, A.G.; TENG, C.C.; RITCH, R. EARLY Glaucoma Involves Both Deep Local, and Shallow Widespread, Retinal Nerve Fiber Damage of the Macular Region. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v.55, n.2, p.632-649, 2014.

JHA, P.; BANDA, H.; TYTARENKO, R.; BORA, P.S.; BORA, N.S. Complement mediated apoptosis leads to the loss of retinal ganglion cells in animal model of glaucoma. **Molecular Immunology**, v.48, n.15, p.2151-2158, 2011.

JI, J.; CHANG, P.; PENNESI, M.E.; YANG, Z.; ZHANG, J.; LI, D.; WU, S.M.; GROSS, R.L. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. **Vision Research**, v.45, n.2, p.169-179, 2005.

JINDAL. Glaucoma: an extension of various chronic neurodegenerative disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 28, n. 1, p. 186-189, 2013.

JOHNSON, E.C.; DEPPMEIER, L.M.; WENTZIEN, S.K.; HSU, I.; MORRISON, J.C. Chronology of Optic Nerve Head and Retinal Responses to Elevated Intraocular Pressure. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, n.2, p.431-442, 2000.

JOHNSTON, K.C. Effect of sildenafil (Viagra) on cerebral blood vessels. **Neurology**, v.65, p.785, 2005.

KAGEMANN, L.; WANG, B.; WOLLSTEIN, G.; ISHIKAWA, H.; NEVINS, J.E.; NADLER, Z.; SIGAL, I.A.; BILONICK, R.A.; SCHUMAN, J.S. IOP Elevation Reduces Schlemm's Canal Cross-Sectional Area. **Glaucoma**, v.55, n.3, p. 1805-1809, 2014.

KANEMAKI, N.; TCHEDRE, K.T.; IMAYASU, M.; KAWARAI, S.; SAKAGUCHI, M.; YOSHINO, A.; ITOH, N.; MEGURO, A.; MIZUKI, N. Dogs and Humans Share a Common Susceptibility Gene SRBD1 for Glaucoma Risk. **PloS One**, v.8, n.9, 2013.

KATAI, N.; YOSHIMURA, N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 40, n. 11, p. 2697-2705, 1999.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

KERR, N. M.; DANESH-MEYER, H. V. Phosphodiesterase inhibitors and the eye. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, Sydney, v. 37, p. 514–523, 2009.

KO, I.G.; SHIN, M.S.; KIM, B.K.; KIM, S.E.; SUNG, Y.H.; KIM, T.S.; SHIN, M.C.; CHO, H.J.; KIM, S.C.; KIM, S.H.; KIM, K.H.; SHIN, D.H.; KIM, C.J. Tadalafil improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of hippocampal neuronal cells in gerbils. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 629-635, 2009.

KO, M.L.; CHEN, C.F.; PENG, P.H.; PENG, Y.H. Simvastatin upregulates Bcl-2 expression and protects retinal neurons from early ischemia/reperfusion injury in the rat retina. **Experimental Eye Research**, v. 93, n. 5, p. 580-585, 2011.

KOKSAL, M.; OZDEMIR, H.; KARGI, S.; YESILLI, C.; TOMAÇ, S.; MAHMUTYAZICIOGLU, K.; MUNGAN, A. The effects of sildenafil on ocular blood flow. **Acta Ophthalmologica Scandinavi**, v.83, n.3, p. 355-359, 2005.

KOTERA, J.; MOCHIDA, H.; INOUE, H.; NOTO, T.; FUJISHIGE, K.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, T.; KOJIMA, K.; YEE, S.; YAMADA, Y.; KIKKAWA, K.; OMORI, K. Avanafil, potent and highly selective phosphodiesterase inhibitor for erectile dysfunction. **Journal of Urology**, v.188, n.2, p. 668-674, 2012.

KURAHASHI, A.; NASCIMENTO, M.; MARCONDES, A. M.; FILHO, N. M.; BARACAT, J.; COSTA, V. P. Estudo da circulação retrobulbar e do campo visual após dose única de citrato de sildenafil (Viagra®). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2002.

KUKREJA, R.C.; T, SALLOUM, F.; DAS, A.; OCKAILI, R.; YIN, C.; BREMER, Y.A.; FISHER, P.W.; WITTKAMP, M.; HAWKINS, J.; CHOU, E.; KUKREJA, A.K.; WANG, X.; MARWAHA, V.R.; XI, L. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. **Vascular Pharmacology**, v.42, n.6, p.219-232, 2005.

LAGRÈZE, W.A.; KNÖRLE, R.; BACH, M.; FEUERSTEIN, T.J.. Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. **Investigative Ophthalmology Vision and Science**. v.39, p.1063-1066, 1998.

LAN, Y.; HSIEH, J.; HUNG, P. Ocular biometry in primary angle closure glaucoma. **Journal Medical of Ultrassound**. v.15, n.4, p.243-250, 2007.

LAM, T.T.; ABLER, A.S.; MARK, M.T. Apoptosis and Caspases after Ischemia—Reperfusion Injury in Rat Retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, April 1999, v. 40, n. 5, p. ,1999.

LAQUIS, S.; CHAUDHARY, P.; SHARMA, S.C. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. **Brain Research**, v. 784, p.100–104, 1998.

LEE, N. P. Y.; CHENG, C. Y. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 267-276, 2004.

LEPORE, J. J.; MAROO, A.; PEREIRA, N. L. Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension. **American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 6, p. 677-680, 2002.

LESKE, M.C. Open-angle glaucoma -- an epidemiologic overview. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 14, n. 4, p. 166-172, 2007.

LEUNG, C.K. Diagnosing glaucoma progression with optical coherence tomography. **Currien Opinion in Ophthalmology**, v. 25, n. 2, p.104-111, 2014.

LEVIN, L.A. Neuroprotection and regeneration in glaucoma. **Ophthalmology Clinics of North America**, v. 18, n. 4, p. 585-596, 2005.

LEV KOVITCH-VERBIN, H.; WASERZOOG, Y.; VANDER, S.; MAKAROVSKY, D.; PIVEN, I. Minocycline upregulates pro-survival genes and downregulates pro-apoptotic genes in experimental glaucoma. **Graefes Archves of Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.252, n.5, p.761-772.

LI, J.; FU, P.; DELEON, M.; FRENCH, B.A.; FRENCH, S.W. The effect of Viagra (sildenafil citrate) on liver injury caused by chronic ethanol intragastric feeding in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 78, n. 2, p. 101-108, 2005.

LI, W.; YANG, C.; LU, J.; HUANG, P.; BARNSTABLE, C.J.; ZHANG, C.; ZHANG, S.S. Tetrandrine protects mouse retinal ganglion cells from ischemic injury. **Drug Design Development Therapy**, v.21, n.8, p.327-339, 2014.

LUCHS, A.; PANTALEÃO, C. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno. **Einstein**, v. 8, n. 4, p. 495-507, 2010.

MANALLACK, D. T.; HUGHES, R. A.; THOMPSON, P. E. The next generation of phosphodiesterase inhibitors: structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3449-3462, 2005.

MARIGO, F.A.; CRONEMBERGER, S.; CALIXTO, N. Neuroproteção: situação atual no glaucoma. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 64, p. 167-171, 2001.

MCKINNON, S.J.; LEHMAN, D.M.; KERRIGAN-BAUMRIND, L.A.; MERGES, C.A.; PEASE, M.E.; KERRIGAN, D.F.; RANSOM, N.L.; TAHZIB, N.G.; REITSAMER, H.A.; LEV KOVITCH-VERBIN, H.; QUIGLEY, H.A.; ZACK, D.J. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v. 43, n. 4, p. 1077-1087, 2002.

MICHELSON, G.; LANGHANS, M.J.; HARAZNY, J.; DICHTL, A. Visual field defect and perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open-angle glaucoma. **Graefes Archieve of Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 236, n. 2, p. 80-85, 1998.

MITTAG, T.W.; DANIAS, J.; POHORENEC, G.; YUAN, H.; BURAKGAZI, E.; CHALMERS-REDMAN, R.; PODOS, S.M.; TATTON, W.G. Retinal Damage after 3 to 4 Months of Elevated Intraocular Pressure in a Rat Glaucoma Model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 11, 2000.

MOCHIDA, H.; YANO, K.; INOUE, H.; YEE, S.; NOTO, T.; KIKKAWA, K. Avanafil, a highly selective phosphodiesterase type 5 inhibitor for erectile dysfunction, shows good safety profiles for retinal function and hemodynamics in anesthetized dogs. **The Journal of Ophthalmology**, v.190, n.2, p.799-806, 2013.

MORRISON, J.C.; JOHNSON, E.; CEPURNA, W.O. Rat models for glaucoma research. **Progress in Brain Research**, v. 173, p. 285-301, 2008.

MURAKAMI, A.; OKISAKA, S. Neuronal cell death mechanism in glaucomatous optic neuropathy. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**, v. 102, n. 10, p. 645-653, 1998.

NICKELLS, R.W. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 42, n. 2, p. 278-287, 2007.

OFRI, R.; DAWSON, W.W.; FOLI, K.; GELATT, K.N. Chronic ocular hypertension alters local retinal responsiveness. **British Journal of Ophthalmology**, v.77, p. 502-508, 1993.

OFRI, R.; NARFSTROM, K. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. **The Veterinary Journal**. v.174, n.1, p.10-22, 2007.

OREJANA, L.; BARROS-MIÑONES, L.; JORDÁN, J.; PUERTA, E.; AGUIRRE, N. Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. **Neurobiology of Aging**, v.33, n.3, p.11-20, 2012.

ORUC, O.; INCI, K.; AKI, F.T.; ZEYBEK, D.; MUFTUOGLU, S.F.; KILINC, K.; ERGEN, A. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte infiltration. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 4, p. 337-344, 2010.

OZDEGIRMENCI, O.; KUCUKOZKAN, T.; AKDAG, E.; TOPAL, T.; HABERAL, A.; KAYIR, H.; OTER, S.; AKYOL, M.; UZBAY, T. Effects of sildenafil and tadalafil on ischemia/reperfusion injury in fetal rat brain. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 317-323, 2011.

PACHE, M.; MEYER, P.; PRUNTE, C.; ORGUL, S.; NUTTLI, I.; FLAMER, J. Sildenafil induces retinal vasodilatation in healthy subjects. **British Journal of Ophthalmology**, v. 86, p. 156-158, 2002.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PETER, M. Programmed cell death: apoptosis meets necrosis. **Nature**, v.417, n.7338, p. 310-312, 2011.

PETITO, C.K.; OLARTE, J.P.; ROBERTS, B.; NOWAK, T.S. Jr.; PULSINELLI, W.A. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 57, n. 3, p. 231-238, 1998.

PINAZO-DURÁN, M.D.; ZANÓN-MORENO, V.; GARCÍA-MEDINA, J.J.; GALLEGOPINAZO, R. Evaluation of resumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 98–107, 2013.

PEPIN, S.; PITHA-ROWE, I. Stepwise decline in visual field after serial sildenafil use. **Journal Neuroophthalmology**, v. 28, n. 1, p. 76-77, 2008.

PLUMMER, C.E.; REGNIER, A.; GELATT, N. The Canine Glaucomas. In: **Veterinary Ophthalmology**. GELLAT, K.N.; GILGER, B.C.; KERN, T.J.vol.2, cap.19, p. 1053-1054, 2013.

POLAK, K.; WIMPISSINGER, B.; BERISHA, F.; GEORGOPOULOS, M.; SCHMETTERER, L. Effects of sildenafil on retinal blood flow and flicker-induced retinal vasodilatation in healthy subjects. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, v.44, n.11, p. 4872-4876, 2003.

PORTER, A.G.; JANICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.6, n. 2, p.99-104, 1999.

PORST, H. Fosfodiesterase type-5 inhibitors: a critical comparative analysis. **EAU Update Series**, v. 2, n. 2, p. 56-63, 2004.

PRASAD, S.; WILKINSON, J.; GATZOULIS, M. A. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 18, p. 1342, 2000.

QU, J.; WANG, D.; GROSSKREUTZ, C.L. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 1, p. 48-53, 2010.

QUIGLEY, H.A.; BROMAN, A.T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. **British Journal of Ophthalmology**, v. 90, n. 3, p. 262-267, 2006.

QUIGLEY, H.A. Glaucoma. **Lancet**, v. 377, p.1367-1377, 2011.

REICHSTEIN, D.; REN, L.; FILIPPOPOULOS, T.; MITTAG, T.; DANIAS, J. Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. **Experimental Eye Research**, v. 84, n. 1, p. 13-21, 2007.

REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? **Cardiovascular Research**, London, v. 83, p. 204-212, 2009.

RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 405-413, 2007.

ROSA, M.P.; BARONI, G.V.; PORTAL, V.L. Contribuição na prevenção da isquemia cerebral pelo cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase III: revisão de literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 7, n. 1, p. 49 – 55, 2008.

ROSENBAUM, D.M.; DEGTEREV, A.; DAVID, J.; ROSENBAUM, P.S.; ROTH, S.; GROTTA, J.C.; CUNY, G.D.; YUAN, J.; SAVITZ, S.I. Necroptosis, a Novel Form of Caspase- Independent Cell Death, Contributes to Neuronal Damage in a Retinal Ischemia-Reperfusion Injury Model. **Journal of Neuroscience Research**, v.88, p.1569–1576, 2010.

SALLOUM, F.N.; ABBATE, A.; DAS, A.; HOUSER, J.E.; MUDRICK, C.A.; QURESHI, I.Z.; HOKE, N.N.; ROY, S.K.; BROWN, W.R.; PRABHAKAR, S.; KUKREJA, R.C. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 3, p. H1398–H1406, 2008

SANDALON, S.; KÖNNECKE, B.; LEVKOVITCH-VERBIN, H.; SIMONS, M.; HEIN, K.; SÄTTLER, M.B.; BÄHR, M.; OFRI, R. Functional and structural Evaluation of lamotrigine treatment in rat models of acute and chronic ocular hypertension. **Experimental Eye Research**, v. 115, p. 47-56, 2013.

SASTRY B. K.; NARASIMHAN, C.; REDDY, N. K. A study of clinical efficacy of sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. **Indian Heart Journal**, v. 54, n. 4, p. 410-415, 2000.

SCHWARTZ, M. Lessons for glaucoma from other neurodegenerative diseases: can one treatment suit them all? **Journal of Glaucoma**, v.14, p. 321-323, 2005.

SCHMETTERER, L.; POLAK, K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. **Progress in Retina and Eye Research**, v.20, n.6, p.823-847, 2001.

SCHMID, H.; RENNER, M.; DICK, H.B.; JOACHIM, S.C. Loss of Inner Retinal Neurons After Retinal Ischemia in Rats. **Retina**, v.55, n. 4, p. 2777-2787, 2014.

SCHMIER, J.K.; HALPERN, M.T.; JONES, M.L. The economic implications of glaucoma: a literature review. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 4, p. 287-308, 2007.

SCHUMAN, J.S.; HEE, M.R.; ARYA, A.V.; PEDUT-KLOIZMAN, T.; PULIAFITO, C.A.; FUJIMOTO, J.G.; SWANSON, E.A. Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v.6, n.2, p. 89-95, 1995.

SCOTT, E.M.; BOURSIQUOT, N.; BELTRAN, W.A.; DUBIELZIG, R.R. Early histopathologic changes in the retina and optic nerve in canine primary angle-closure glaucoma. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, n. 1, p. 76-86, 2013.

SEFTEL, A. D. Phosphodiesterase type 5 inhibitor differentiation based on selectivity, pharmacokinetic, and efficacy profiles. **Clinical Cardiology**, New York, v. 27, sup. I, p. I14-I19, 2004.

SERARSLAN, Y.; YÖNDEN, Z.; OZGIRAY, E.; OKTAR, S.; GÜVEN, E.O.; SÖĞÜT, S.; YILMAZ, N.; YURTSEVEN, T. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 349-352, 2010.

SHAPIRO, S.; TRAIGER, G.; HILL, W.; ZHANG, L.; DORAN, A.K. Safety, tolerability, and efficacy of overnight switching from sildenafil to tadalafil in patients with pulmonary arterial hypertension. **Cardiovascular Therapeutic**, v.31, n.5, p.274-279, 2013.

SHEKERDEMIAN, L. S.; RAVN, H. B. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.165, p.1098-1102, 2002.

SIU, K.; GRUNWALD, J. E.; JACOB, S. S.; DUPONT, J. Effect of Viagra on ocular circulation. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 41, p. 98, 2000.

SOMMER, A. Intraocular pressure and glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, v. 107, p.186-188, 1989.

SOYDAN, G.; SÖKMENSÜER, C.; KILINÇ, K.; TUNCER, M. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 87-92, 2009.

SPONSEL, W. E.; SANDOVAL, S.; CHEN, N.; KAVANAGH, J.; KHEMSERA, V.; SHARMA, S. Effects of sildenafil (Viagra) on ocular perfusion and contrast sensitivity. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v. 41, p. 98, 2000.

STILLITANO, I. G.; LIMA, M. G.; RIBEIRO, M. P.; CABRAL, J.; BRANDT, C. T. **Economic impact of eyedrop cost in glaucoma treatment**. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v.68, n.1, 2005.

STOCKMAN, A.; SHARPE, L.T.; TUFAIL, A.; KELL, P.D.; RIPAMONTI, C.; JEFFERY, G. The effect of sildenafil citrate (Viagra) on visual sensitivity. **Journal of Vision**, v.7, n.8, p.4, 2007.

STROM, A.R.; HÄSSIG, M.; IBURG, T.M.; SPIESS, B.M. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 1: Congenital and primary glaucoma (4 and 123 cases). **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.2, p.121-126, 2011.

STROM, A.R.; HÄSSIG, M.; IBURG, T.M.; SPIESS, B.M. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009. Part 2: secondary glaucoma (217 cases). **Veterinary Ophthalmology**, v.14, n.2, p.127-132, 2011.

SWARTZ, M.M.; LINN, D.M.; LINN, C.L. Tropisetron as a neuroprotective agent against glutamate-induced excitotoxicity and mechanisms of action. **Neuropharmacology**, v.73, p. 111-121, 2013.

SUGIYAMA, T.; OKU, H.; IKARI, S.; IKEDA, T. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on optic nerve head circulation in conscious rabbits. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, n. 5, p. 1149-1152, 2000.

TATTON, W.; CHEN, D.; CHALMERS-REDMAN, R.; WHEELER, L.; NIXON, R.; TATTON, N. Hypothesis for a common basis for neuroprotection in glaucoma and alzheimer's disease: anti-apoptosis by alpha-2 adrenergic receptor activation. **Survey of Ophthalmology**, v. 48, Suppl. 1, p. 25–37, 2003.

TAYLOR, R.E.; SHOWS, K.H.; ZHAO, Y.; PITTLER, S.J. A PDE6A promoter fragment directs transcription predominantly in the photoreceptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, n.2, p.543-547, 2001.

THANOS, S.; NASKAR, R. Correlation between retinal ganglion cell death and chronically developing inherited glaucoma in a new rat mutant. **Experimental Eye Research**, v. 79, p. 119–129, 2004.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 233-266, 2005.

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.

TSUMAMOTO, Y.; YAMASHITA, K.; TAKUMIDA, M.; OKADA, K.; MUKAI, S.; SHINYA, M.; YAMASHITA, H.; MISHIMA, H.K. In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of ON production in rat retinal ganglion cells. **Brain Research**, v.933, n.2, p. 118-129, 2002.

UTHAYATHAS, S.; KARUPPAGOUNDER, S.S.; THRASH, B.M.; PARAMESHWARAN, K.; SUPPIRAMANIAM, V.; DHANASEKARAN, M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacological Reports**, Smetna, v. 59, p. 150-163, 2007.

VIGNESWARA, V.; BERRY, M.; LOGAN, A.; AHMED, Z. Pharmacological Inhibition of Caspase-2 Protects Axotomised Retinal Ganglion Cells from Apoptosis in Adult Rats. **Plos One**, v.7, n.12, 2012.

WALDMAN, S.A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacological Reviews**, v. 39, n. 3, p. 163-196, 1987.

WAX, M.B.; TEZEL, G. Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. **Experimental Eye Research**, v. 88, n.4, p. 163-196, 2009.

WEINREB, R.N.; KHAW, P.T. Primary open-angle glaucoma. **Lancet**, v. 363, n.9422, p.1711-1720, 2004.

WEINREB, R.N. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? **Canadian Journal of Ophthalmology**, v.42, p.396-398, 2007.

WIGGS, J.L. Genetic etiologies of glaucoma. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 1, p. 30-37, 2007.

WILKENS, H.; GUTH, A.; KONIG, J.; FORESTIER, N.; CREMERS, B.; HENNEN, B.; BÖHM, M.; SYBRECHT, G.W. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 104, n. 11, p. 1210-1222, 2001.

WRIGHT, P. J. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**, Oxford, v. 60, p. 967–975, 2006.

YAMAZAKI, Y.; DRANCE, S.M. The relationship between progression of visual field defects and retrobulbar circulation in patients with glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, v. 124, n. 3, p. 287-295, 1997.

YANG, Y.; DUAN, J.Z.; GUI, D.M.; YANG, H.W.; GAO, D.W. Effect of aminoguanidine on caspase-3 expression in rat retina after ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Ophthalmology**, v.4, n.3, p.259-261, 2011.

YÍLDÍZ, H.; DURMUS, A.S.; SIMŞEK, H.; YAMAN, M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 1, p. 137-142, 2011.

YIN, Z.Q.; VAEGAN, MILLAR, T.J.; BEAUMONT, P.; SARKS, S. Widespread choroidal insufficiency in primary open-angle glaucoma. **Journal of Glaucoma**, v. 6, n. 1, p. 23-32, 1997.

ZHANG, R.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; LU, M.; LAPOINTE, M.; CHOPP, M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. **Annals of Neurology**, v.50, n.5, p. 602-611, 2001.

ZHANG, R.L.; ZHANG, Z.; ZHANG, L.; WANG, Y.; ZHANG, C.; CHOPP, M. Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 7, p. 1213-1219, 2006.