

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Humberto Cenci Guimarães

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO RANIBIZUMABE UTILIZANDO
ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Sorocaba/SP

2011

Humberto Cenci Guimarães

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO RANIBIZUMABE UTILIZANDO
ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba,
como exigência parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Professora Doutora Marli Gerenutti

Sorocaba/SP

2011

Ficha Catalográfica

Guimarães, Humberto Cenci
G978a Avaliação da segurança do Ranibizumabe utilizando ensaios
biológicos in vivo e in vitro / Humberto Cenci Guimarães. –
Sorocaba, SP, 2011.
77 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Gerenutti
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2011.

1. Medicamentos – Efeitos colaterais. 2. Degeneração macular.
Morte celular. 3. Ranibizumabe. 4. Medicamentos – Utilização. I.
Gerenutti, Marli, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Humberto Cenci Guimarães

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO RANIBIZUMABE UTILIZANDO
ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Dissertação aprovada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Sorocaba

Aprovado em 29 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Ass.: _____

Pres.: Profa. Dra. Marli Gerenutti,
Universidade de Sorocaba

Ass.: _____

1º Exam.: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud,
Universidade de Sorocaba

Ass.: _____

2º Exam.: Prof. Dr. João Alberto Holanda de
Freitas,
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais Adhemar e Vera por me concederem a vida e por serem exemplos de como se deve vivê-la, ao meu amor, minha esposa e companheira Cristiane, por seu apoio incondicional e aos filhos que Deus nos confiou Gabriela, Mauricio, Eduardo e Regina.

HOMENAGEM

Figura 1 Adelaide Judith Calegari Cenci falecida no dia 17 de setembro de 2011, com 102 anos, e Maurício Cesar Guimarães, atualmente com 6 anos na Clínica de Repouso Dr. Guerra, Sorocaba/SP, 2005.



Fonte: Elaboração própria

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração deste trabalho:

Luciana Canabarro
Maria Vilma Alves da Silva
Profa. Dra. Marli Gerenutti
Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor
Natália Mencacci Esteves-Pedro
Prof. Dr. Nelson Brancaccio dos Santos
Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes
Reginaldo de Camargo Leite
Valdir Bernardes

Resumo

A degeneração macular relacionada à idade é uma das maiores causas de redução da capacidade laborativa, devido à perda da visão central e evolução para cegueira legal, impossibilitando atividades básicas como ler, escrever, cozinhar, dirigir e reconhecer a face das pessoas. O ranibizumabe foi aprovado pelo “United States Food and Drug Administration” FDA para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade por injeção intravítrea. Este trabalho tem como objetivo geral avaliar os possíveis efeitos de sofrimento celular causado pelo ranibizumabe com o intuito de provar a sua segurança para uso em seres humanos. No ensaio biológico *in vivo*, em coelhos albinos, foram utilizados o exame de fundoscopia indireta durante 21 dias após a administração intravítrea do ranibizumabe (10 mg/mL), nos volumes de 0,03mL e 0,05mL ou de 0,05mL solução salina (grupo controle), e a avaliação histológica da retina dos olhos dos coelhos albinos com a coloração hematoxilina/eosina. O ensaio biológico *in vitro* do ranibizumabe foi realizado em cultura de células de fibroblastos murinos, nas concentrações de 0,0025mg/mL, 0,01mg/mL, 0,25mg/mL, 0,35mg/mL e 0,5mg/mL. A análise histológica do tecido retiniano indicou que a administração intravítrea do ranibizumabe não causou sofrimento ou morte celular no ensaio *in vivo*; e no ensaio *in vitro* só foi possível a determinação da IC₁₀. Os ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro* comprovam a segurança ranibizumabe para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade. O desenvolvimento de formas de liberação controlada deste fármaco poderá gerar economia em relação ao custo do tratamento e reduzir o risco da realização repetida da injeção intravítrea.

Descritores: Degeneração macular. Efeito de drogas. Inibidores de crescimento. Morte celular. Ranibizumabe.

Summary

The age-related macular degeneration is a major cause of reduction of working capacity due to loss of central vision and progression to legal blindness, making it impossible to basic activities like reading, writing, cooking, driving and recognizing faces of people. The ranibizumab was approved by the “United States Food and Drug Administration” FDA for the treatment of age-related macular degeneration by intravitreal injection. This study aims to evaluating the possible effects of cell injury of ranibizumab in biological assays *in vivo* and *in vitro* in order to prove its safety for humans use. We used to evaluate *in vivo* the indirect ophtalmoscopy for a period of 21 days after administration of intravitreal ranibizumab (10mg/mL) in rabbits, in volumes of 0.03 mL and 0.05 mL or 0.05 mL saline solution (group control), and retinal histological staining of the eyes of the rabbits with hematoxylin/eosin. The assay of ranibizumab was performed *in vitro* cell culture of murine fibroblasts at concentrations of 0.0025 mg/mL, 0.01 mg/L, 0.25 mg/mL, 0.35 mg/mL and 0.5 mg/mL. The results showed that the administration of intravitreal ranibizumab caused no suffering non cellular death observed in histological analysis of the *in vivo* assay test and the *in vitro* assay was only possible to determine the IC₁₀. These results suggest that the iatrogenic complications observed clinically after administration of intravitreal ranibizumab may be due to flaws in the technique of administration. The ranibizumab proved to be safe for the treatment of age-related macular degeneration. The development of slow-release forms of this drug could improve cost-benefit ratio of treatment and reduced risk of repeated intravitreal injections.

Keywords: Macular degeneration. Effects of drugs. Growth inhibitors. Cell death. Ranibizumab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Adelaide Judith Calegari Cenci e Mauricio Cesar Guimarães.....	5
Figura 2	Simulação da visão de pessoas com a retina normal (A) e da visão de pessoas com perda da visão central (escotoma absoluto) devido à degeneração macular relacionada à idade (B)	15
Figura 3	Esquema representativo da organização da retina de vertebrados	19
Figura 4	Desenho esquemático dos fotorreceptores, cone e bastonete, com sua divisão histológica	19
Figura 5	Aspecto da retinografia colorida da retina normal, do olho esquerdo, mostrando a localização da mácula, fóvea e nervo óptico (A) e a imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente (B), Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP	20
Figura 6	Esquema de fisiopatologia de degeneração macular relacionada à idade	24
Figura 7	Representação esquemática da etiopatogenia da degeneração macular relacionada à idade	25
Figura 8	Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho esquerdo, com drusas de coróide, do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP	28
Figura 9	Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho esquerdo, com quadro de degeneração macular relacionada à idade clássica ou seca (A) e à imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente (B), do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP	30
Figura 10	Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho esquerdo, com quadro de degeneração macular relacionada à idade oculta ou exsudativa e à imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente, do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP	31

Figura 11	Representação esquemática da produção do ranibizumabe	40
Figura 12	Genealogia do bevacizumabe e do ranibizumabe	41
Figura 13	Representação esquemática da penetração de medicações pelas diferentes barreiras oculares relacionada ao seu peso molecular	42
Figura 14	Representação geral dos ensaios biológicos utilizados para avaliação da segurança do ranibizumabe para o tratamento da DMRI	48
Figura 15	Fotografia da embalagem original de ranibizumabe (Lucentis®)	49
Figura 16	Representação das fases do processo de execução do ensaio biológico <i>in vivo</i>	52 53
Figura 17	Representação das fases do processo de execução do ensaio biológico <i>in vitro</i>	56 57
Figura 18	Corte de retina de coelho com representação esquemática das camadas da retina com 200x de aumento (Hematoxilina-Eosina) ...	61
Figura 19	Corte de retina dos coelhos submetidos à administração intravítrea de ranibizumabe com 200x de aumento (Hematoxilina-Eosina)	62
Figura 20	Porcentagem de viabilidade celular frente às diferentes concentrações do ranibizumabe (0,0025 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,35 mg/mL e 0,5 mg/mL) e do controle de células	63

SIGLAS E ABREVIações

AREDS	Age Related Eye Disease Study Research Group
ARVO	The Association for Research in Vision and Ophthalmology
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
BSS	Solução Salina Balanceada
CFH	Gene do Fator H do Complemento
CK30-PEG	Polietilenoglicol CK30
CNEN/SP	Comissão Nacional de Energia Nuclear/São Paulo
DL	Dose Letal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Polímeros de Etileno Acetato de Vinil ou Silicone
Fc	Fator de Complemento
FDA	United States Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina-Eosina
IC	Concentração Inibitória
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
iTTT	Termoterapia Transpupilar com Indocianina Verde
MTS	3- (4,5-Dimetiltiazol-2-IL) -5- (3-Carboximetoxifenil) -2- (4-Sulfofenil) - 2H- Tetrazólio
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
PBS-MCF	Solução de Tampão Fosfato, Livre de Magnésio e Cálcio
PDT	Terapia Fotodinâmica com Verteporfirina
PEDF	Fator Derivado do Epitélio Pigmentado
PLA	Ácido Poli-Lático
PLGA	Copolímeros dos Ácidos Lático e Glicólico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMS	Fenazina Metasulfato
POE	Poli(ε-Caprolactona)
PVA	Álcool Polivinílico
SD	Desvio Padrão da Média
TTT	Termoterapia Transpupilar
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Proliferação do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	O Envelhecimento	13
1.2	Patologias Oftalmológicas Associadas ao Envelhecimento	14
1.3	Histologia e Fisiologia da Retina	16
1.4	Degeneração Macular Relacionada à Idade	23
1.5	Tratamento para Degeneração Macular Relacionada à Idade	32
1.6	Ranibizumabe	39
2	OBJETIVOS	45
2.1	Objetivo Geral	45
2.2	Objetivos Específicos	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	Medicamentos	46
3.2	Animais	47
3.3	Fibroblastos Murinos	47
3.4	Ensaio Biológicos	48
3.4.1	Ensaio Biológico <i>in vivo</i>	49
3.4.2	Ensaio Biológicos <i>in vitro</i>	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A – Artigo intitulado “Longevidade e visão”, publicado no Jornal Cruzeiro do Sul.....	74
	ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética Institucional.....	75
	ANEXO C – Certificado de participação do trabalho no 36º Congresso da Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo.....	77

1 INTRODUÇÃO

1. 1 O Envelhecimento

A sociedade como um todo vem buscando o prolongamento da vida, entretanto para que exista qualidade nos anos adicionais conquistados é essencial que se evite a evolução das doenças crônicas, que de forma direta, podem ocasionar a perda da autonomia e da capacidade de decisão sobre os próprios interesses. (VERAS, 2009)

As políticas públicas na área da saúde, nos últimos 40 anos, parecem ser responsáveis pelo começo da mudança na curva demográfica brasileira, deixando de ser piramidal, o que caracteriza países de terceiro mundo. Essa mudança se deve à redução do número de nascimentos bem como à redução da mortalidade da população adulta e idosa, levando a um envelhecimento da população economicamente ativa, especialmente das mulheres. (CYPEL et al., 2006, GIATTI; BARRETO, 2003) As mudanças na curva demográfica brasileira exigem do poder público melhor aplicação de recursos no setor de saúde pública para que sejam contempladas de forma eficiente a realização de exames médicos e laboratoriais periódicos, assistência de saúde permanente e medicação contínua. (VERAS, 2009)

Em 1960, o número de idosos no Brasil estava em torno de 3 milhões de pessoas; em 1975, este número atingiu o patamar de 7 milhões e em 2008 quase 20 milhões de pessoas. Segundo Veras (2009), as projeções para 2020 indicam que haverá mais de 30 milhões de idosos no Brasil.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2004, contabilizou 1.939.405 pessoas com idade superior a 80 anos, sendo 1.133.062 do sexo feminino. (CYPEL et al., 2006)

O principal fator de risco nas doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento está na própria idade. O envelhecimento é uma fase natural, de satisfação e, dependendo da perda de capacidade de locomoção ou de relacionamento com o mundo, pode ser o estágio mais negativo da vida. Nessa fase da vida, existe a prevalência de patologias crônicas como a hipertensão arterial, artrite ou reumatismo, doenças do coração e patologias relacionadas à visão. (GIATTI; BARRETO, 2003) Medidas preventivas são necessárias para que se evite a evolução das doenças crônicas, retardando a progressão das incapacidades e melhorando a qualidade de vida das pessoas. (VERAS, 2009)

1. 2 Patologias Oftalmológicas Associadas ao Envelhecimento

Dentre as patologias associadas ao envelhecimento, destacam-se as patologias oftalmológicas, pois a diminuição da quantidade e da qualidade da visão leva à limitação da parte motora, especialmente pelo aumento do risco de acidentes, o que pode gerar dependência física ou mental, ocasionando dificuldades emocionais e aumentando, em muito, o risco de morbidade e de mortalidade. (MELLO; ROMA; MORAES JÚNIOR, 2008)

Willians et al. (1998) e Marback et al. (2007) constataram uma maior perda da qualidade de vida em pacientes portadores de deficiência visual binocular, quando comparados aos pacientes portadores de deficiência visual monocular. Constataram ainda, comparando os dois grupos portadores de deficiência com pessoas sem deficiência visual, significativa diminuição na qualidade de vida.

A perda de autonomia causada pela diminuição da visão pode elevar, de forma indireta, em até 90%, os gastos médicos com o idoso, muitas vezes, pela necessidade de internação em casas de repouso. (JAVITT; ZHOU; WILLKE, 2007)

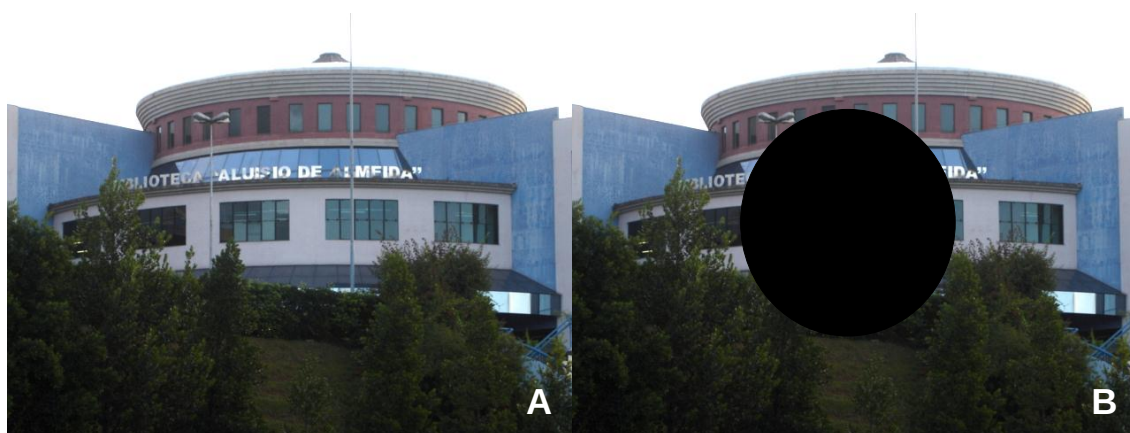
A catarata, o glaucoma, a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e a retinopatia diabética são, em ordem decrescente, as causas de maior incidência de deficiência visual. (NEHEMY, 2006)

Para os estágios mais avançados da doença retiniana, ainda são poucas as opções de tratamento. Esta patologia é responsável por aproximadamente 50% das causas de cegueira irreversível. (RODRIGUES et al., 2004)

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) apresenta prevenção satisfatória, porém tratamento não muito eficaz. O sintoma mais comum desta patologia é a distorção da imagem (micropsia e metamorforpsia), visualização de manchas (escotoma relativo) e a perda da visão central (escotoma absoluto). (BRESSLER et al., 2009; FLETCHER et al., 2008; SANTOS et al., 2005)

A figura 2 simula a visão de um olho com a retina normal e de um olho com perda da visão central (escotoma absoluto) devido a DMRI. Na DMRI, as atividades básicas como ler, escrever, cozinhar, dirigir ou reconhecer a face das pessoas fica prejudicada, evoluindo muitas vezes para cegueira legal, principalmente em mulheres a partir dos 50 anos de idade. (CONLEY; NAASH, 2010)

Figura 2 Simulação da visão de um olho com a retina normal (A) e da visão de um olho com perda da visão central (escotoma absoluto) devido à degeneração macular relacionada à idade (B).



Fonte: Elaboração própria

Das causas de cegueira irreversível às formas mais prevalentes são as degenerações retinianas, a degeneração macular relacionada à idade e a retinose pigmentar. Nos países desenvolvidos, a DMRI é a segunda maior causa de cegueira legal em pacientes entre 45 – 64 anos de idade; a causa mais comum nos pacientes entre 65 – 75 anos (com prevalência de aproximadamente 10%); a prevalência na população com idade superior a 75 anos chega a 30%. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; RODRIGUES et al., 2004)

No Brasil, Cypel et al. (2006) relatam que na população de pacientes com idade superior aos 99 anos de idade a DMRI estava, em todos os pacientes, sendo que em 70% na forma clássica, 25% na forma moderada e severa da forma clássica e em 5% na forma oculta, já cicatrizada. Santos et al. (2005) descrevem a frequência de olhos com DMRI e sua variação nas faixas etárias dos 55 – 64 anos variando entre 13 a 19 %, dos 65 – 74 anos variando entre 31 a 35%, no grupo com idade igual e superior a 75 anos, entre 27 a 60%.

Os fatores de risco para DMRI são a idade avançada, indivíduos caucasianos, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, portadores de hipercolesterolemia, aterosclerose, catarata ou pós-cirurgia de catarata, dieta pobre, falta de atividade física, obesidade, consumo de álcool e exposição à radiação solar (raios ultravioleta). (TORRES et al., 2009)

1. 3 Histologia e Fisiologia da Retina

Para o entendimento da DMRI, é essencial que se compreenda a histologia e a fisiologia da retina do olho humano que é capaz de captar fótons com comprimento de onda entre 380 e 760 nanômetros (nm). Este tecido tem como origem embriológica o tubo neural e por isso pode ser considerada como uma extensão do cérebro. (YANG, 2004)

A retina está localizada no polo posterior do globo ocular e é dividida esquematicamente em 10 camadas, da externa para a interna, conforme ilustra a figura 3. (ÁLVARO, 2008; BRUNI; CRUZ, 2006; GUYTON; HALL, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; RODRIGUES et al., 2004)

I. O epitélio pigmentado da retina forma a barreira hemato-retiniana externa entre a retina e o sistema vascular da coróide o qual é constituído por células cúbicas na parte central da retina; na parte periférica, apresenta uma forma mais alongada, com o núcleo na posição basal. A região basal do epitélio pigmentado da retina se prende fortemente à membrana de Bruch (com invaginações da membrana plasmática e muitas mitocôndrias, sugestivo de transporte iônico intenso). A região apical do epitélio pigmentado da retina apresenta microvilos (delgados e abundantes) e bainhas cilíndricas que envolvem a extremidade dos fotorreceptores. O citoplasma das células do epitélio pigmentado contém bastante retículo endoplasmático liso (responsável pelo transporte e esterificação da vitamina A utilizada pelos fotorreceptores). As células do epitélio pigmentado da retina sintetizam a melanina, armazenada em forma de grânulos, cuja função é absorver a luz que estimula os fotorreceptores. O ápice do epitélio pigmentado da retina apresenta lisossomos, resultado do processo de fagocitose e digestão na extremidade dos bastonetes.

II. A camada fotorreceptora é constituída por fotorreceptores conforme demonstrado na figura 4. Os fotorreceptores podem ser divididos em cones e bastonetes (células com dois polos, um deles fotossensível e o outro forma sinapse com outras células bipolares), que podem ser divididos em segmento externo pedículo ciliar, o segmento interno e os terminais sinápticos. O segmento interno é composto pelo corpo celular e o axônio. Os cones, cinco milhões na retina humana, são células alongadas que possuem segmento interno e externo, corpo basal com cílio e acúmulo de mitocôndrias. Na fóvea sua densidade gira em torno de 199.000 cones por mm^2 . O segmento interno é separado do segmento externo por uma constrição, pedículo ciliar. No segmento externo, são observados discos empilhados originados de invaginações da membrana celular e que podem atingir até 1000 discos em cada cone ou bastonete. Os bastonetes, 92 milhões na retina humana, são células finas e alongadas que possuem segmento interno e externo. No segmento interno, é rico em glicogênio, onde são observadas muitas mitocôndrias. No segmento externo, observam-se discos empilhados, constituídos por

microvesículas achatadas, dispostos como se fossem moedas. Logo abaixo da constrição há um corpúsculo basal, do qual se origina um cílio, pedículo ciliar.

III. A membrana limitante externa é uma estrutura homogênea formada por complexos juncionais entre as células fotorreceptoras e as células de Müller na qual atravessam os cones e bastonetes.

IV. A camada nuclear externa é a camada onde se localizam o núcleo dos cones e bastonetes sendo que os núcleos dos cones se colocam normalmente numa só altura perto da membrana limitante e os núcleos dos bastonetes podem ter alturas diferentes.

V. A camada plexiforme externa é a região onde ocorre a sinapse dos cones e bastonetes com os neurônios bipolares.

VI. A camada nuclear interna contém os corpos celulares das células bipolares, das células horizontais e das células amácrinas. As células bipolares são neurônios orientados radialmente, em que um ou mais dendritos fazem sinapse com fotorreceptores ou células horizontais. Os terminais nervosos fazem sinapse com células ganglionares ou células amácrinas, que por sua vez estabelecem a ligação com as células bipolares ou com as células ganglionares.

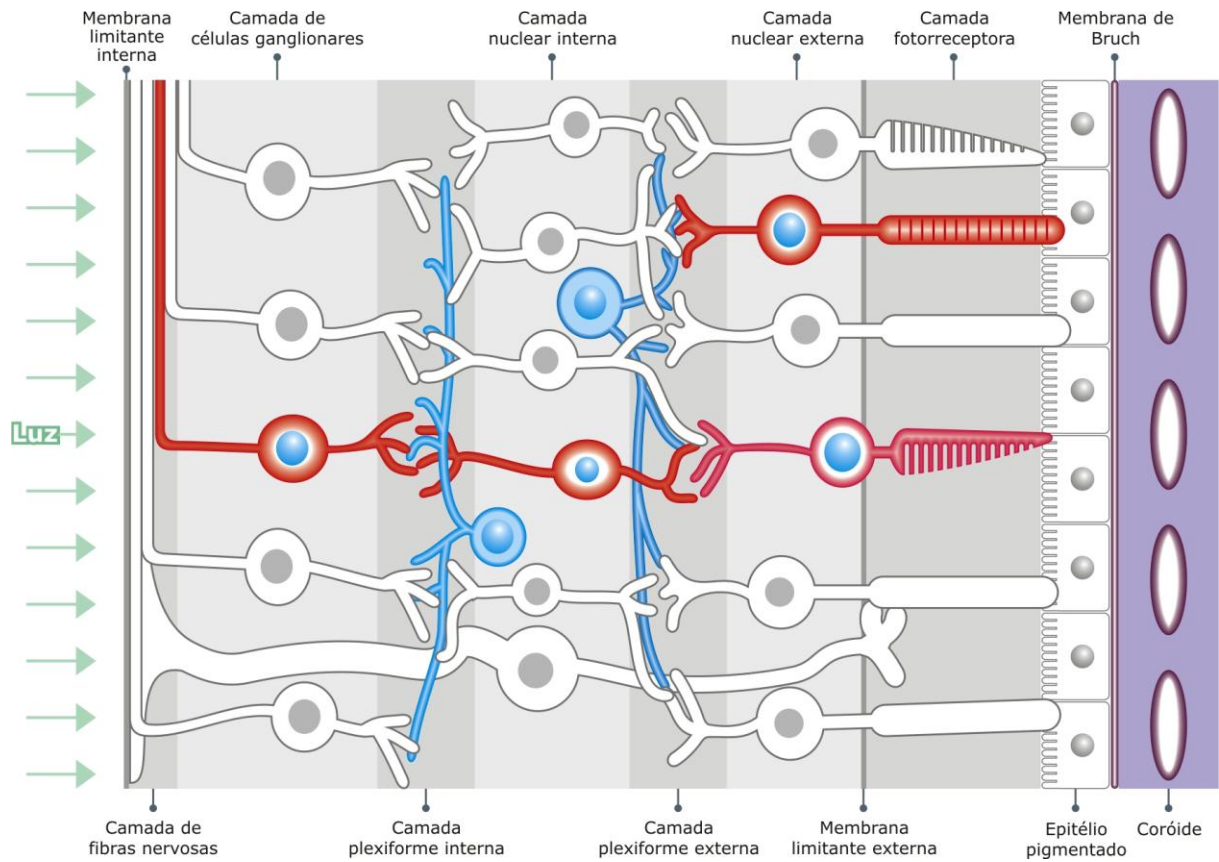
VII. Camada plexiforme interna é a região onde ocorre a sinapse das células bipolares com as células ganglionares.

VIII. Camada de células ganglionares é a camada que estabelece contato na sua extremidade externa com os neurônios bipolares e na sua porção interna com as fibras nervosas que convergem, para formar o nervo óptico. Existem 18 tipos de células ganglionares catalogadas, mas suas funções ainda não foram muito bem estabelecidas.

IX. Camada de fibras nervosas é onde ocorre a união dos axônios das células ganglionares, resultando na formação do nervo óptico que possui 1 milhão de fibras nervosas;

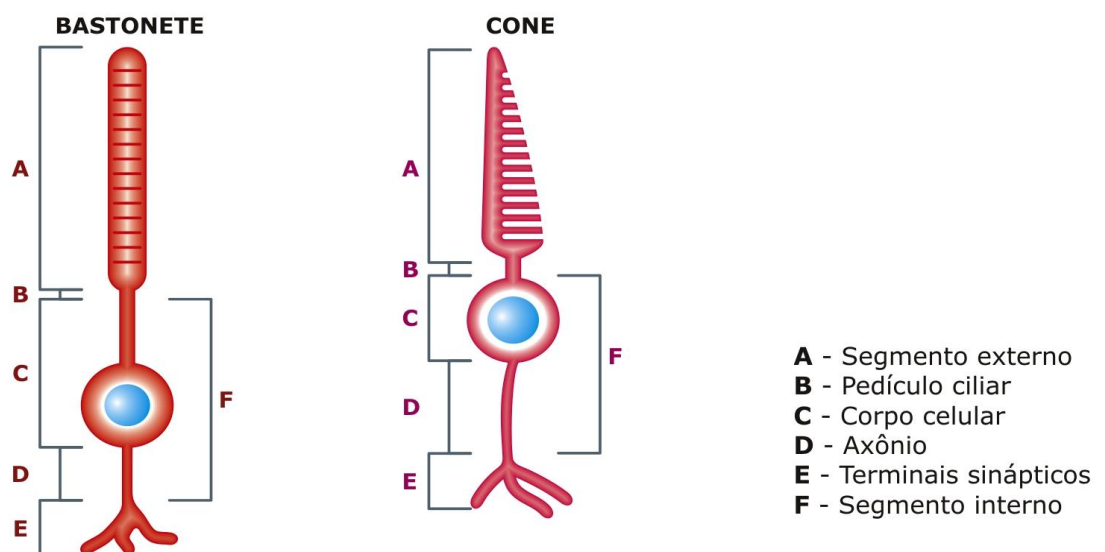
X. A membrana limitante interna possui 0,5 micra de espessura, é a camada mais interna da retina.

Figura 3 Desenho esquemático representativo da organização da retina de vertebrados.



Fonte: Adaptado de Álvaro (2008)

Figura 4 Desenho esquemático representativo dos fotorreceptores, cone e bastonete, com sua divisão histológica.



Fonte: Adaptado de Álvaro (2008)

A retina humana é o tecido que mais consome oxigênio, chegando a ter um consumo 50% maior que em tecidos como o cérebro ou os rins. Os fotorreceptores são os maiores responsáveis por este consumo de oxigênio. Um rico plexo vascular formado pela circulação da coróide está intimamente ligado à membrana de Bruch e fornece oxigênio e nutrientes para o epitélio pigmentar da retina e para os fotorreceptores. (RATNER; NATHANS, 2006)

Como pode ser observada na figura 5, a mácula tem um diâmetro de aproximadamente 5,5 mm, com a fóvea no centro. A fóvea está localizada a 4 mm temporalmente em relação ao nervo óptico (STEFÁNSSON; GEIRSDÓTTIR; SIGURDSSON, 2010) ocupando pouco mais de 1 mm², onde existem aproximadamente 199.000 cones de forma isolada. (BRUNI; CRUZ, 2006) A luz atinge as células fotorreceptoras diretamente, sem atravessar as outras camadas da retina, contribuindo para uma maior nitidez das imagens formadas nesta região. Nesta região existe o afastamento dos vasos, das células bipolares e das células ganglionares para a periferia, ficando no centro da fóvea somente os cones. (CHOPDAR; CHAKRAVARTHY; VERMA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008)

Figura 5 Aspecto da retinografia colorida da retina normal, do olho esquerdo, mostrando a localização da mácula, fóvea e nervo óptico (A) e a imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente (B), Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP.



Fonte: Elaboração própria

Os cones são os responsáveis pela visão diurna e das cores, interligam-se com as células bipolares que por consequência se ligam às células ganglionares. (BRUNI; CRUZ, 2006)

Os cones têm como pigmento as fotopsinas e podem ser classificados em: cones sensíveis ao vermelho são estimulados por comprimentos de onda longos, da ordem de 570 nm; cones sensíveis ao verde são estimulados por comprimentos de onda na faixa de 540 nm; cones sensíveis ao azul são estimulados por comprimentos de onda curtos, da ordem de 440 nm. (BRUNI; CRUZ, 2006)

Por outro lado, os bastonetes que são responsáveis pela visão noturna e em preto e branco, cujo pico de absorção de luz gira em torno de 505 nm, têm como pigmento a rodopsina. A rodopsina, em contato com a claridade de baixa intensidade, transforma-se em batorrodopsina, que se degrada em lumirrodopsina; que por sua vez, transforma-se em metarrodopsina I e depois, decompõe-se em metarrodopsina II (rodopsina ativa). A metarrodopsina II, sob a ação da enzima rodopsina quinase, é degradada em escotopsina e todo-trans retinal. A todo-trans retinal, pela ação da isomerase, se transforma-se em 11-cis-retinal, a rodopsina pode ser resintetizada com a ligação da escotopsina com a 11-cis-retinal.

Existe uma via alternativa onde o todo-trans retinal se transforma em todo-trans retinol (vitamina A), que pela ação da isomerase, transforma-se em 11-cis-retinol. A 11-cis-retinol converte-se em 11-cis-retinal, que, ao se combinar com a escotopsina, forma nova rodopsina. (GUYTON; HALL, 2002)

Os fotorreceptores transmitem os sinais gerados até a camada plexiforme externa onde se ligam as células horizontais e as células bipolares.

As células horizontais transmitem sinais horizontalmente a partir dos fotorreceptores até as células bipolares. As células bipolares transmitem sinais verticalmente a partir dos fotorreceptores e células horizontais para a camada plexiforme interna onde se ligam às células ganglionares e às células amácrimas. Os sinais transmitidos pelas células bipolares podem ser excitatórios ou inibitórios. O sinal recebido pelas células bipolares na via vertical resulta não só da transmissão direta dos fotorreceptores. Na camada plexiforme interna, as células amácrimas transmitem sinais diretamente das células bipolares para as células ganglionares ou horizontalmente dos axônios das células bipolares e dos dendritos das células ganglionares e para outras células amácrimas. (ÁLVARO, 2008)

Uma célula ganglionar reflete a atividade de várias centenas de fotorreceptores (BRUNI; CRUZ, 2006) e pode ser dividida em três grupos chamados de células W, X e Y e sua função é enviar os sinais da retina através do nervo óptico para os centros visuais no cérebro.

A função das células W é a transmissão da visão periférica, recebendo a maior parte da excitação dos bastonetes, estando presente principalmente na periferia da retina. As células X são responsáveis por toda a visão em cores, recebendo as informações de pelo menos um cone. As células Y informam ao sistema nervoso central, de forma instantânea, qualquer evento anormal, sem localizar com precisão a localização do ocorrido, fornecendo pistas para que os olhos se movimentem e seja utilizada a visão central. (GUYTON; HALL, 2002)

Existem também as células interplexiformes que transmitem sinais em sentido oposto ao descrito acima e que possuem ação inibitória, controlando o contraste das imagens geradas pelos sinais transmitidos.

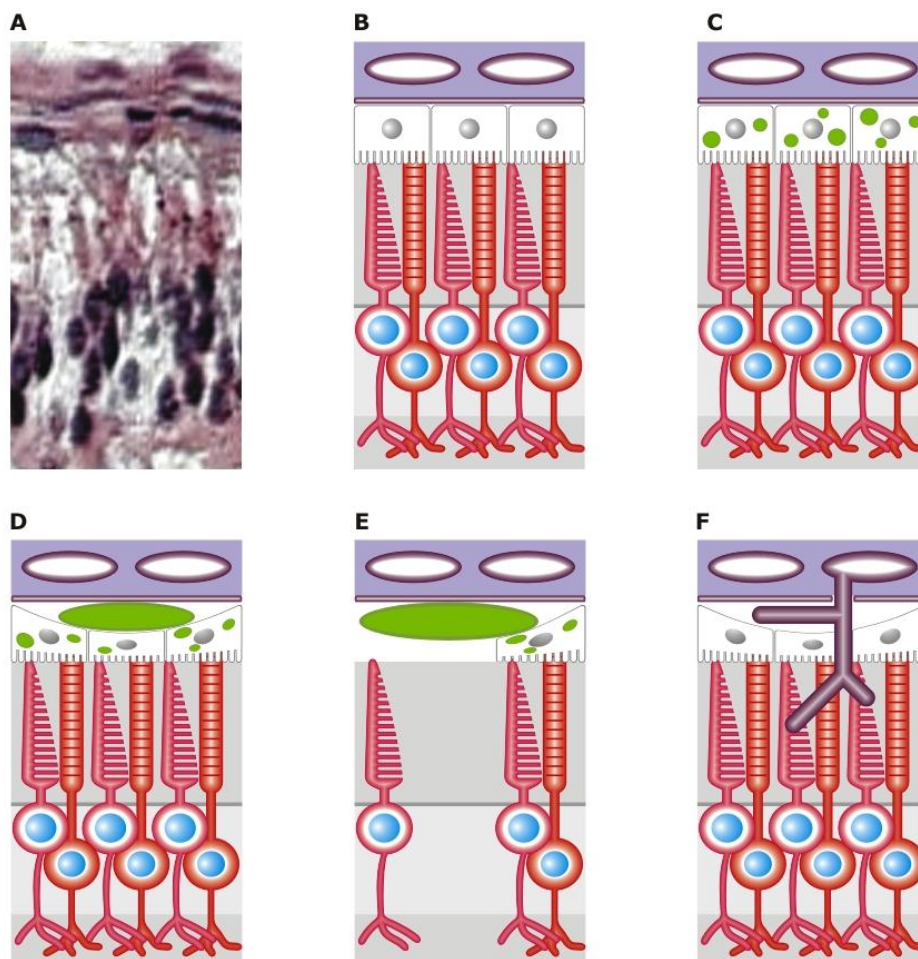
As células de Müller estão presentes em toda a espessura da retina e têm a função de manter a homeostase retiniana, secretando neurotransmissores e fatores tróficos e fornecendo metabólitos aos neurônios. As células da microglia também podem ser encontradas em todas as camadas da retina e têm a capacidade de fagocitar neurônios em degeneração. (ÁLVARO, 2008)

A expressão de receptores dos fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF) está relacionada à homeostase retiniana. Esta expressão é maior no endotélio da coriocapilar que está voltado para o epitélio pigmentado da retina e é responsável pela manutenção da integridade coriocapilar. A secreção dos fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF) em condições normais é polarizada nas células do epitélio pigmentado da retina (EPR) sendo que na porção basal a secreção é 2 a 7 vezes maior que a da porção apical, e sob hipóxia essa razão é muito maior. (DAMICO, 2007)

1. 4 Degeneração Macular Relacionada à Idade

Na fisiopatologia da DMRI, a retina normal, representada na figura 6, apresenta dificuldade da eliminação dos resíduos gerados. O acúmulo de resíduo gera reação inflamatória, causando encapsulamento dos restos celulares com proteínas e lipídios entre a membrana de Bruch e o epitélio pigmentar da retina, caracterizado por depósitos insolúveis de lipofucsina. As drusas dificultam a difusão de oxigênio e nutrientes para a retina, gerando hipoxemia, que evolui com neovascularização e esta causa comprometimento da membrana de Bruch na região macular, o que justifica o comprometimento da visão central, como pode ser observado na figura 2. (IU; KWOK, 2007)

Figura 6 Esquema de fisiopatologia de degeneração macular relacionada à idade: (A) corte histológico da retina de coelho (corado com Hematoxilina-Eosina), (B) retina normal, (C) depósitos insolúveis no epitélio pigmentar da retina, (D) depósitos insolúveis na membrana de Bruch, (E) morte de fotorreceptores devido à hipoxemia, (F) neovascularização retiniana.

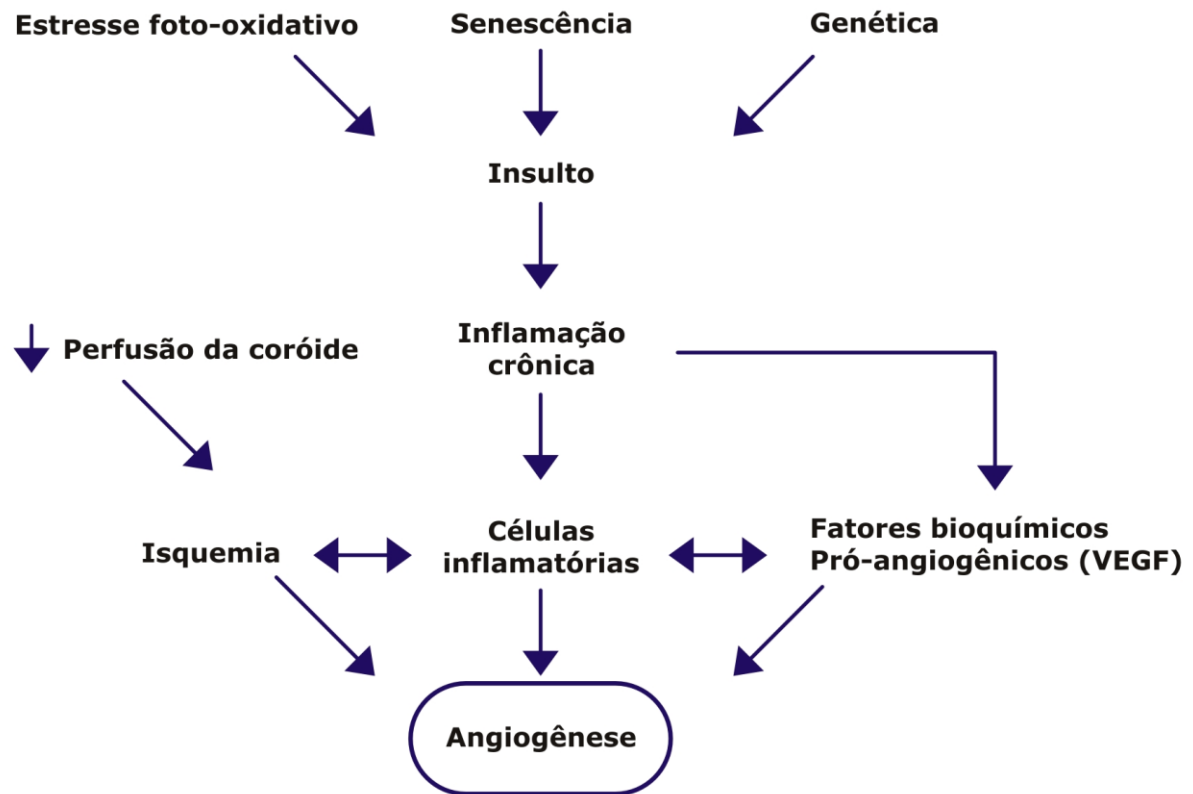


Fonte: Adaptado de Ratner e Nathans (2006)

Os fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF) são produzidos pelo epitélio pigmentar da retina, células do endotélio vascular, pericitos, neurônios da retina, células de Müller e astrócitos. (TOLENTINO, 2011)

Como pode se observar na figura 7, com a hipoxemia, as células do epitélio pigmentado da retina (EPR) aumentam a produção dos fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF). O desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos é fundamental para compreensão da fisiopatologia da DMRI. (FUNK, 2009; TOLENTINO, 2011)

Figura 7 Representação esquemática da etiopatogenia da degeneração macular relacionada à idade.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006)

Na fisiopatologia da DMRI, os neovasos da coróide, com constituição anatômica alterada, invadem a retina avascular levando a sangramentos exsudação que são reabsorvidos, gerando reação inflamatória, evoluindo com quadro de cicatrização, e induzindo a morte dos fotorreceptores da região macular e a perda de visão central. Três fatores impulsionam a cascata de reações que levam a angiogênese, a hipoxemia, o estresse foto-oxidativo e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A). (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; HO; KUO, 2007)

Os genes que produzem os fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF-A) no seres humanos, são compostos de oito exons, produzindo 6 isoformas de 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos. (TOLENTINO, 2011) Destas iso-

formas biologicamente ativas, pelo menos 4, apresentam um papel diferente no processo de angiogênese: VEGF₁₂₁ – contendo 121 aminoácidos ativos parece ser essencial para o funcionamento normal da vasculatura retiniana; VEGF₁₆₅ – contendo 165 aminoácidos ativos é a forma predominante no olho humano, sendo considerada a responsável pela angiogênese patogênica e possui toda a informação necessária para o desenvolvimento e a organização da rede vascular retiniana normal; VEGF₁₈₉ – contendo 189 aminoácidos ativos não parece exercer papel na neovascularização patológica; VEGF₂₀₆ – contendo 206 aminoácidos ativos não parece exercer papel na neovascularização patológica. (DAMICO, 2007; FERRARA, 2006; HO; KUO, 2007; REGATIERI, 2010; TOLENTINO, 2011)

Estes fatores são responsáveis pela formação de neovasos no espaço sub-retiniano, causando exsudação e hemorragia na região macular. A reação inflamatória induzida pela cicatrização causa lesão irreversível nos fotorreceptores e perda funcional do tecido retiniano. As boas condições das células do epitélio pigmentado da retina (EPR), da membrana de Bruch e da coriocapilar são fundamentais para a homeostase e sobrevivência desse complexo. A destruição de qualquer uma dessas camadas retinianas cursa, invariavelmente, com atrofia das outras duas. Outros fatores de crescimento também influenciam o balanço entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos: o fator de crescimento de fibroblastos ("basic fibroblast growth factor", bFGF); as angiopoetinas; o fator derivado do epitélio pigmentado ("pigment epithelium-derived factor", PEDF); e os fatores de adesão relacionados à matriz extracelular. (DAMICO, 2007)

Apesar da fisiopatologia da DMRI ainda não ser completamente conhecida, o tabagismo é um dos mais importantes fatores de risco, podendo estar relacionado à diminuição dos níveis plasmáticos de antioxidantes o que contribui para o desenvolvimento da aterosclerose. (TORRES, 2009)

Por outro lado, a exposição crônica aos raios ultravioletas (UV) A ou B não está associada diretamente à DMRI. A córnea protege a retina dos raios ultravioletas menores que 300 nm, e o cristalino bloqueia raios UV entre 300 e 400 nm. Entretanto comprovou-se que a exposição à luz azul e à luz violeta pode contribuir para o desenvolvimento da DMRI. A luz violeta apresenta pouco efeito na visão escotópica enquanto que a luz azul, além de desempenhar importantes funções biológicas retinianas, é essencial para este tipo de visão. É importante ressaltar que

a luz violeta apresenta comprimentos de onda entre 400 – 440 nm e a luz azul entre 440 – 500 nm. (TORRES, 2009)

Os fótons alto-energéticos, no espectro da luz violeta, azul e a radiação UVA criam espécies reativas de oxigênio, que são nocivas a várias organelas celulares, particularmente o DNA mitocondrial. Estas espécies reativas de oxigênio resultam em apoptose, danificando a estrutura e a função celular dos fotorreceptores e epitélio epirretiniano. Os cones e bastonetes apresentam sofrimento oxidativo quando expostos à radiação, com comprimento de onda entre 470 - 490 nm, exigindo a ativação da rodopsina. (TORRES, 2009)

Todos os fatores acima descritos levam ao acúmulo de lipofucsina na região macular, com aspecto de drusas moles, confluentes ou não, maiores que 63 micra, sendo considerada uma das primeiras manifestações clínicas da DMRI. (BISHT; DHASMANA; BIST, 2010; DAMICO, 2007; OSHIMA et al., 2009; RATNER; NATHANS, 2006) A figura 8 ilustra a retina com drusas de coróide. O acúmulo de lipofucsina na membrana de Bruch, após os 40 anos, faz com que a permeabilidade a substâncias hidrossolúveis do plasma e o transporte de aminoácido diminuam e, conseqüentemente ocorre a redução do fluxo de detritos pelo epitélio pigmentar da retina através desta membrana. (WONG; DURNIAN, 2007)

Figura 8 Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho esquerdo, com drusas de coróide, do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP.



Fonte: Elaboração própria

Existe uma enorme preocupação clínica quando um dos olhos apresenta lesão subfoveal em relação ao desenvolvimento da doença no olho contra lateral. Os fatores de risco para tal acontecimento são em ordem decrescente: a presença de cinco ou mais drusas, a hiperpigmentação foveal, a hipertensão arterial, a presença de drusas moles (com diâmetro maior que 63 micra). Em cinco anos de doença num dos olhos a incidência do acometimento do olho contra lateral pode variar de 7% quando não existe nenhum dos fatores de risco, a 87% quando temos presentes estes quatro fatores de risco. (FARAH et al., 2001; MAGUIRE et al., 1997)

Atualmente, fatores genéticos também estão sendo correlacionados ao desenvolvimento da DMRI, sendo que o principal fator é a substituição de uma base no par do códon 1277 do gene fator H do complemento (CFH). Existem também

genes associados à DMRI com menor intensidade como: LOC387715, CFB / C2, VEGF, APOE, CX3CR1 e outros (ALMEIDA et al., 2009; CONLEY; NAASH, 2010; DONOSO; VRABEC; KUIVANIEMI, 2010; MITCHEL et al., 2010). Entretanto existem várias dúvidas sobre o mecanismo de neovascularização nas doenças da retina que ainda não foram completamente explicadas. (DAMICO, 2007)

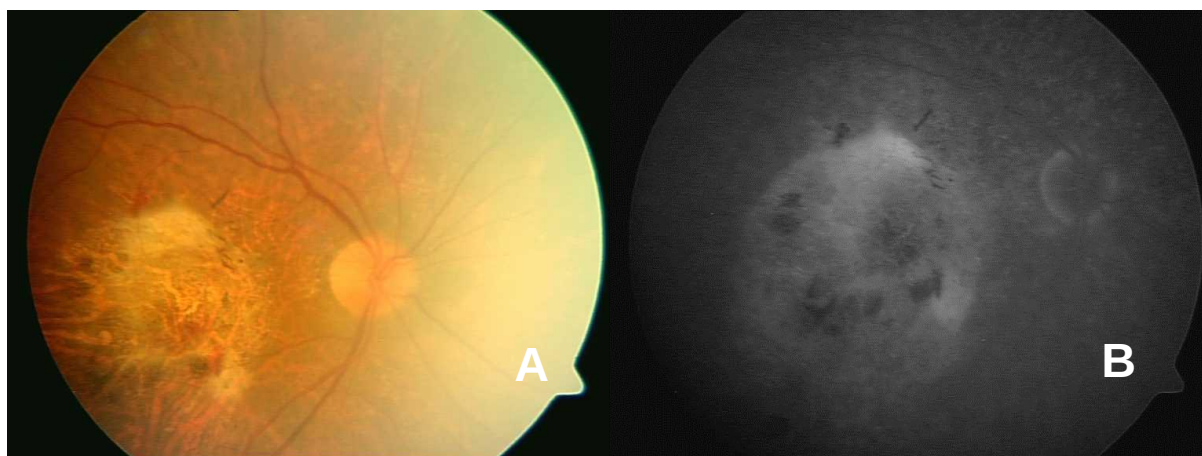
A prevenção da DMRI deve ser feita através de consultas oftalmológicas com regularidade onde a propedêutica deve conter a medida da acuidade visual com a melhor correção para longe e perto, biomicroscopia, tonometria, oftalmoscopia indireta e o mapeamento dos escotomas com a Grade de Amsler para realização do diagnóstico diferencial. Na oftalmoscopia indireta é possível observar alterações pigmentares, atrofia do epitélio pigmentado da retina (EPR), roturas traumáticas da coróide, estrias angióides e degeneração miópica. (DAMICO, 2007; KAISER et al., 2007; MITCHEL et al., 2010)

Atualmente na propedêutica armada três exames permitem a classificação e o seguimento da DMRI, de forma precisa: a angiografia com fluoresceína ou com indocianina verde; o uso da tomografia de coerência óptica (OCT); e a eletrorretinografia focal. (BORDON et al., 2008; GAUDREULT et al., 2005; IU; KWOK, 2007; OSHIMA et al., 2009)

Segundo os autores Nehemy (2006), Gaudreault et al. (2005) e Iu; Kwok (2007), pelo aspecto da angiografia fluorescente, a DMRI pode ser classificada em:

I. forma clássica ou seca caracterizada por áreas bem demarcadas de hiperfluorescência e que revelam o processo neovascular propriamente dito, aparecem mais intensas nas fases iniciais da angiografia e reaparecem nas fases mais tardias do exame. Esta forma é caracterizada pela presença de drusas e alterações de EPR, membrana de Bruch e coriocapilar; levando à atrofia secundária dos fotorreceptores e perda gradativa da visão (figura 9).

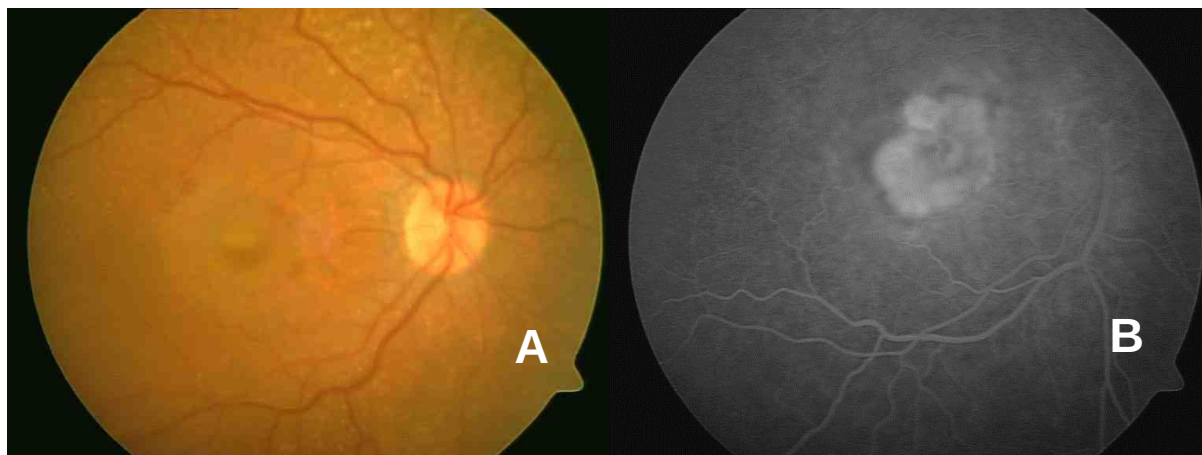
Figura 9 Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho direito, com quadro de degeneração macular relacionada à idade clássica ou seca (A) e a imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente (B), do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP.



Fonte: Elaboração própria

II. forma oculta ou exsudativa onde se reconhecem duas formas de lesões: o descolamento fibrovascular de epitélio pigmentar da retina e o vazamento tardio de fonte indeterminada onde as imagens aparecem menos intensas nas fases iniciais do exame e reaparecem nas fases mais tardias do exame. Há o aparecimento de forma não demarcada da membrana neovascular sub-retiniana, que altera a anatomia macular, incluindo a interface do fotorreceptor-EPR, permitindo o extravasamento de soro e/ou sangue, e levando à perda irreversível dos fotorreceptores adjacentes, com consequente baixa visão (figura 10).

Figura 10 Aspecto da retinografia colorida da retina, do olho direito, com quadro de degeneração macular relacionada à idade oculta ou exsudativa e a imagem correspondente no exame de angiografia fluorescente, do Serviço de Oftalmologia do Conjunto Hospitalar de Sorocaba/SP.



Fonte: Elaboração própria

A prevenção da DMRI tem se demonstrado eficiente pelo uso de antioxidantes obtidos pela ingestão de alimentos ou vitaminas. As substâncias antioxidantes inibem o início da hiperoxidação, sequestrando radicais livres ou quelando íons metálicos, ou seja, protege o organismo do estresse oxidativo. (SERRACARBASSA, 2006)

O Age Related Eye Disease Study Research Group (AREDS), demonstrou que a ingestão de uma combinação de vitamina C (500mg), beta caroteno (15mg), vitamina E (400 UI), Zinco (80mg) e Cobre (2 mg), traz benefícios para alguns portadores de DMRI. (TORRES et al., 2009)

Os pacientes que podem se beneficiar com esse tratamento são aqueles que apresentam: drusas de tamanho intermediário (entre 63 e 125 micra); pelo menos uma drusa grande (maior ou igual a 125 micra); atrofia geográfica não central em um ou ambos os olhos (categoria 3 classificação do AREDS); pacientes que apresentem DMRI avançada ou perda da visão devido à DMRI em um olho (categoria 4 classificação do AREDS). A terapia antioxidante reduz em 25% o risco de progressão para DMRI avançada, onde há membrana neovascular sub-retiniana ou atrofia geográfica no centro da mácula. (ENG; KERTES, 2006; NEHEMY, 2006, SERRACARBASSA, 2006)

1. 5 Tratamento para Degeneração Macular Relacionada à Idade

No tratamento de patologias da retina existem várias vias de escolha para a administração de fármacos: a via sistêmica, a via tópica, a via periocular, utilizando implantes esclerais (biodegradáveis ou não biodegradáveis), a iontoforese e através de sistemas usando micro ou nanopartículas por meio de injeção intravítrea. Sendo assim, abaixo estão descritas as vantagens e desvantagens de cada uma destas vias, que o clínico pode enfrentar na escolha do tratamento apropriado para as patologias retinianas.

Níveis satisfatórios intravítreo de um fármaco podem ser conseguidos através da via sistêmica, mas é necessário administrar doses elevadas de medicação, aumentando em muito o risco de efeitos colaterais. A barreira hemato-ocular, que é composta pela barreira hematoaquosa e hematorretiniana. A barreira hematorretiniana pode ser dividida em barreira hematorretiniana externa, formada, pelo epitélio pigmentado da retina e barreira hematorretiniana interna, pelas, aderências intercelulares do endotélio vascular dos capilares retinianos. Esta barreira é a responsável pela baixa absorção dos fármacos administrados por via sistêmica. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2004; GAUDANA et al., 2009)

A via tópica de administração de fármaco para a retina, também parece ser ineficaz, uma vez que apresenta uma absorção muito pequena para câmara anterior (1 a 5% da dose administrada) sendo o restante absorvido pela conjuntiva ocular e pela mucosa nasal, atingindo a circulação sanguínea e uma rápida eliminação pela lágrima. A absorção de fármacos pode seguir dois caminhos: a rota corneana (da córnea para o humor aquoso e em seguida, para os tecido intraoculares) ou a rota não corneana (da conjuntiva para a esclera, em seguida para a coróide e epitélio pigmentar da retina). Os fármacos, cujas moléculas são lipofílicas e com massa molar menor, penetram com mais facilidade quando utilizados por via tópica. Atualmente existem estudos utilizando o pazopanib, o TG100801 e a mecamilamina, para o tratamento da DMRI, na forma de colírios, pois apresentam propriedades inertes, são pequenos, apresentam estrutura lipofílica, possibilitando a absorção através da membrana celular lipofílica epitelial (transcelular) e entre as células

epiteliais (paracelular). (CONLEY; NAASH, 2010; FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007)

A via periocular de administração de fármacos para retina, pode ser realizada por injeção subconjuntival, subtenoniana, justa escleral posterior ou retrobulbar. Por esta via, conseguem-se concentrações de fármaco na cavidade vítrea superior às vias sistêmica e tópica. A esclera tem permeabilidade semelhante à do estroma corneano e seu alto grau de hidratação facilita o transporte de substâncias hidrossolúveis e usa hipocelularidade. Quanto maior a massa molecular e o raio do soluto, menor a permeabilidade escleral. Entretanto, os principais riscos relacionados a esta técnica são a perfuração do globo ocular, a fibrose dos músculos extraoculares e a endoftalmite. Essa via de administração de fármacos para retina se mostra mais segura em comparação à injeção intravítrea, mas a aderência por parte do paciente ainda é menor. (GAUDANA et al., 2009; MELLO FILHO et al., 2010)

Outra via de administração de fármaco que pode ser utilizada é o implante escleral que apresenta a vantagem de aumentar o tempo de ação do fármaco durante o tratamento sem alterar a transparência do meio ocular, mas dependem do procedimento cirúrgico de implantação, que pode ser considerado uma desvantagem, pois aumenta o risco de descolamento de retina, hemorragias, infecções. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007). Estes sistemas de implantes poliméricos de transporte de drogas têm sido muito estudados e utilizados no que diz respeito aos sistemas de transporte prolongado de droga para os tecidos oculares, podendo ser biodegradáveis ou não biodegradáveis. No implante não biodegradável é necessária a realização de segundo procedimento cirúrgico para serem removidos. (BOCHOT et al., 2011)

O reservatório de implantes biodegradáveis são compostos de polímeros como os poliésteres, a poli(ϵ -caprolactona) (POE), o ácido poli-lático (PLA) e os copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA). (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010) O reservatório de implantes não biodegradáveis contém um núcleo, onde está a medicação, rodeado por uma membrana semipermeável, composta pelo EVA (polímeros de etileno acetato de vinil ou silicone) ou o PVA (álcool polivinílico), com uma abertura que permite a liberação do fármaco, fazendo com que esta liberação seja mais linear, ou seja, permite a liberação de uma quantidade constante de fármaco por pelo menos um ano. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007)

A utilização de micro e nanopartículas, que são polímeros da poli(ϵ -caprolactona) (POE), o ácido poli-lático (PLA), o polimetilmetacrilato (PMMA) e os copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA), classificados pelo tamanho, sendo que as micropartículas apresentam tamanho entre 1 – 1000 micrômetros de diâmetro e as nanopartículas com tamanho entre 1 – 1000 nanômetros, sendo 1000 nanômetros igual a 1 micrômetro, para encapsular a medicação, permitem um maior controle da liberação da droga, são mais fáceis de serem fabricadas que os lipossomas, podem ser administradas por meio de injeção intravítrea, mas as partículas suspensas podem causar baixa visão após serem injetadas no polo posterior. (SHORT, 2008)

O uso de nanopartículas, utilizando o polipropilenoglicol, em especial o CK30-PEG, é ótima opção na terapia gênica das doenças retinianas, tendo boa distribuição pelo tecido, sendo bem tolerado e seguro. (CONLEY; NAASH, 2010) Outro exemplo é o uso de copolímeros dos ácidos lático e glicólico (PLGA) na confecção de microesferas utilizado como reservatório para o pegaptanibe sódico e recentemente a Genentech/Roche assinaram um contrato de parceria com a SurModics para utilizar micropartículas biodegradáveis na liberação controlada do ranibizumabe. Teoricamente o conceito parece ser viável, mas é necessário conseguir estabilidade da droga no processo de fabricação das micropartículas e o maior desafio é incorporar o ranibizumabe na matriz da micropartícula sem perder a sua atividade funcional numa produção em grande escala. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; GAUDANA et al., 2009)

O lipossomo é considerado como um tipo de nanopartícula ou micropartícula sendo uma boa opção para obter-se a liberação controlada de um medicamento e seu tamanho pode variar de 0,025 micrômetro a 2,5 micrômetros. Formado por uma dupla camada de lipídeos separados por uma fase aquosa e um componente aquoso interno, proporcionando maior concentrações de medicação no vítreo potencializando o efeito do medicamento na retina sem causar efeito tóxico causado pelo aumento da concentração. Os lipossomos podem ser classificados em vesículas multilamelares, vesículas grandes, vesículas unilamelares grandes e vesículas unilamelares pequenas. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007)

Os fármacos lipofílicos ficam ligados à membrana da vesícula, já os fármacos lipofóbicos ficam presos na porção interna do lipossomo. Tecnicamente seu preparo

é complexo e quando aplicados no vítreo interferem na sua transparência, causando baixa visão e dificultam a avaliação da retina até por 21 dias. Como exemplo de formulação lipossomal utilizada para o tratamento da DMRI temos o Visudine[®], cujo princípio ativo é a verteporfirina, fabricada pela Novartis (EUA) e outro exemplo é o Macugen[®], cujo princípio ativo é o pegaptanibe sódico (aprovado em dezembro de 2004, pelo Food and Drugs Administration (FDA) para o tratamento de DMRI por injeção intravítrea). (BOCHOT et al., 2011)

Lipossomas PEGlados contendo anticorpo antinucleotídeo resultam numa alta presença, em torno de 30% do total da dose, após 2 semanas da injeção intravítrea. (GAUDANA et al., 2009)

A iontoforese não é um método de liberação de droga, mas um processo que modifica a permeabilidade das células, facilitando a transferência de drogas ionizadas através de membranas biológicas, dependente de uma força eletromotiva, que repele íons de um eletrodo de uma mesma carga fazendo com que eles migrem para um eletrodo com carga oposta (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2004; SHORT, 2008)

A iontoforese ocular pode ser dividida em iontoforese corneana e iontoforese transescleral. A iontoforese transescleral apresenta vantagens, pois apresenta maior área para absorção do medicamento em relação à área da córnea. (DEHGHAN; MOUZAM, 2008)

O sistema é composto por um aplicador, um eletrodo dispersivo e um controlador de dose para iontoforese. (GAUDANA et al., 2009) Na iontoforese, a droga deve estar em estado ionizado e deve ser colocada no eletrodo de mesma carga; o local onde se quer a ação da droga deve estar próximo da região onde foi realizada a aplicação. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010) Esta técnica por ser não invasiva apresenta baixos riscos na sua execução, pode ser repetida quantas vezes forem necessárias e faz com que exista um acúmulo de medicação na úvea e na retina o que torna esta modalidade terapêutica muito conveniente para o tratamento da DMRI. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007) A vantagem desta técnica é que a absorção sistêmica da droga é muito pequena quando o tratamento é realizado por períodos curtos. Elimina os riscos e o desconforto da realização das injeções intravítreas. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2004) Entretanto existe o risco de queimaduras e choques elétricos quando se utilizam correntes elétricas elevadas e

por longos períodos. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007)

Estudo *in vitro* comprova o transporte de dextran de 40 kD através da esclera pelo sistema de iontoforese. O peso molecular de dextran está próximo do pegaptanibe sódico (50 kD), do ranibizumabe (48 kD) ou do fator derivado do epitélio pigmentado (55 kD). (PESCINA et al., 2011)

A via intravítrea de administração de fármacos, um dos objetos deste estudo, para o tratamento de doenças retinianas disponibiliza altas doses de solução aquosa ou suspensão do medicamento no vítreo, que chegam de forma eficiente nas células ganglionares e plexiforme interna sem apresentar riscos de efeitos adversos da droga utilizada, relacionada ao aumento da concentração na circulação sanguínea. (FIALHO; CUNHA JUNIOR, 2007; MELLO FILHO et al., 2010)

Deve-se ressaltar que os fármacos hidrofílicos, como o ranibizumabe, injetados no vítreo, são eliminados através da hialóide anterior e drenados pelo trabeculado. E que os fármacos lipofílicos, embora tenham maior penetração no tecido retiniano e sejam eliminados pela coróide e esclera, também são eliminados através da hialóide anterior e drenados pelo trabeculado, considerando-se que período de ação do fármaco depende da sua meia-vida e normalmente é necessária a realização de várias aplicações. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010)

A injeção intravítrea deve ser realizada a 3,5 mm do limbo no quadrante temporal inferior utilizando agulha de 31 ou 32 gauge e as principais complicações deste procedimento são a endoftalmite (devido a falhas na assepsia); a hemorragia vítrea (devido ao trauma causado pela agulha na pars plicata quando a injeção intravítrea é realizada mais anterior do olho); e rupturas retinianas, que podem resultar em descolamento de retina, quando a injeção intravítrea é realizada numa região mais posterior do olho. Existe a descrição de picos de aumento da pressão intraocular pós injeção intravítrea sendo necessário, as vezes, o controle pressórico através do uso de medicamentos e casos de redução do fluxo sanguíneo retro ocular levando ao quadro de isquemia. (BOCHOT et al., 2011; ENG; KERTES, 2006; TOLENTINO, 2011)

Normalmente a origem de endoftalmite pós-operatória infecciosa, quando se realiza a injeção intravítrea, está relacionada à flora local da conjuntiva e da pálpebra, justificando medidas profiláticas antibacterianas, como o uso do iodo-

povidona tópico a 5%. A limpeza mecânica dos cílios, da pálpebra, e da pele palpebral, com solução de iodo-povidona 10%, também é recomendada. (BAKRI et al., 2009)

Já foi demonstrado que em pacientes submetidos à injeção intravítrea de repetição, a flora bacteriana ocular apresenta maior resistência à cefalosporina de terceira e quarta geração aumentando, ainda mais, os riscos de endoftalmite. (KIM et al., 2010) Além disto, a injeção intravítrea, muitas vezes, por falhas técnicas pode resultar em hemorragia vítrea, rasgos retinianos, descolamento de retina, catarata traumática e o desenvolvimento de resistência à droga. (CONLEY; NAASH, 2010; ENG; KERTES, 2006; GAUDANA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008) Por outro lado, a cobertura deste tipo de tratamento, por parte do Estado ou pelas operadoras de saúde, ainda é restrita e, muitas vezes, o paciente sente-se obrigado a acionar o Ministério Público para conseguir a medicação.

Além das vias de administração de fármacos, acima descritas, com suas vantagens e desvantagens, deve-se considerar as diversas formas de tratamento da DMRI. Neste contexto, atualmente o principal tratamento para DMRI é a terapia anti-angiogênica, a qual pode ser feita com o uso de fatores de inibição de proliferação vascular (VEGF) pela via de administração intravítrea. Os fármacos de escolha para o tratamento da DMRI na forma oculta são atualmente o pegaptanibe sódico (aprovado em dezembro de 2004, pelo Food and Drugs Administration, FDA, para o tratamento de DMRI por injeção intravítrea), o bevacizumabe (aprovado em dezembro de 2004, pelo FDA, para o tratamento de câncer colo-retal por infusão endovenosa e utilizado para o tratamento de DMRI por injeção intravítrea, mesmo sem a devida liberação pelos órgãos reguladores) e o ranibizumabe (aprovada em junho de 2006 pelo FDA para o tratamento de DMRI por injeção intravítrea). (RODRIGUES et al., 2006, IP et al., 2008) Além dos fármacos acima citados, o uso de corticosteróides como a acetato de triancinolona, acetato de anecortave e a esqualamina, também podem ser uma escolha no tratamento da DMRI. (GAUDREAULT et al., 2007; HO; KUO, 2007; IU; KWOK, 2007)

A terapia antiangiogênica pode ser administrada uni ou bilateralmente tomando-se os cuidados de assepsia, utilizando-se blefarostatos separados, seringas e agulhas separadas para afastar os possíveis quadros infecciosos. (BAKRI et al., 2009) Para este procedimento, recomenda-se o uso de quinolona de quarta

geração, a cada 6 horas, três dias antes; visualização do fundo de olho após a injeção onde a pupila deve ser dilatada, desde que não haja contraindicações para este fim. A anestesia pode ser tópica, utilizando-se colírio, gel anestésico, ou através de bloqueio peribulbar. Recomenda-se a utilização de frascos novos de colírio para prevenir infecções. (RODRIGUES et al., 2008)

A associação da terapia antiangiogêncica com a terapia fotodinâmica apresenta resultados mais promissores em relação à terapia fotodinâmica isolada. (HEIER et al., 2006; HUSAIN et al. 2005; KAISER, 2006; LUCENA; MILLER, 2000)

Por outro lado, no tratamento da DMRI na forma oculta, ou seja, na forma ativa desta patologia, já foi utilizada uma série de técnicas como a fotocoagulação com laser argônio, cirurgia submacular, translocação de mácula, transplante autólogo do epitélio epiretiniano, protrombose mediada por terapia fotodinâmica com a verteporfirina (PDT), termoterapia transpupilar (TTT) e a termoterapia transpupilar mediada pela indocianina verde (iTTT). (BRESSLER et al., 2009; FARAH et al., 2001; IU; KWOK, 2007; RODRIGUES et al., 2006; SANTOS et al., 2005; SIQUEIRA, 2009)

A fotocoagulação com laser argônio, laser de pulso curto, utilizando miras de tamanho menores, com tempo de exposição menos prolongado e portanto maior irradiação retiniana. Como o aumento da temperatura é maior nos tecidos adjacentes apresenta efeito fototérmico menos específico levando a maior dano dos tecidos subjacentes à lesão e é utilizada nas membranas neovasculares sub-retinianas com localização extrafoveal. O laser tem por função ocluir os neovasos por efeito fototérmico não específico, ou seja, lesa tanto a retina doente, como a retina sadia, e por isso não tem indicação para o tratamento das membranas subfoveais. (NEHEMY, 2006, IU; KWOK, 2007)

A remoção da membrana neovascular sub-retiniana e a translocação de mácula são alternativas para correção cirúrgica, mas o alto índice de complicação como proliferação vítreo retiniana e a hipotonia, associado a resultados pobres em relação ao prognóstico visual desestimulam estas estratégias de tratamento. (RODRIGUES et al., 2004; YAMADA et al., 2010)

A terapia fotodinâmica com a verteporfirina (PDT) é realizada em duas etapas. Na primeira, a verteporfirina é injetada por via endovenosa e em seguida é

realizada a irradiação à luz num comprimento de onda de 689 nm. (FARAH et al., 2001; LUCENA; MILLER, 2000)

A termoterapia transpupilar (TTT) é feita através da fotocoagulação a laser de pulso longo, com laser diodo com comprimento de onda de 810 nm, no espectro vermelho, utilizando miras de tamanho maior, com tempo de exposição mais prolongado e portanto menor irradiação retiniana. Como o aumento da temperatura dos tecidos adjacentes é discreto, apresenta efeito fototérmico mais específico, levando a menor dano dos tecidos subjacentes à lesão. Atualmente existe indicação para um pequeno subgrupo de membrana neovascular, o que restringe em muito esta terapêutica (IU; KWOK, 2007; NEHEMY, 2006; POLO et al., 2004)

A termoterapia transpupilar pode ser associada à injeção endovenosa de indocianina, recebe o nome de iTTT, tendo resultados um pouco superiores ao TTT. (NEHEMY, 2006)

Contudo, considera-se que atualmente não existe tratamento eficaz para a DMRI na forma clássica. Na tentativa de restabelecer algum tipo de visão útil aos pacientes, existem pesquisas com o uso de próteses retinianas e a cirurgia de translocação de mácula, tem sido avaliada, mas considera-se que esses resultados são ainda muito limitados. (RODRIGUES et al., 2004; WONG; DURNIAN, 2007; YAMADA et al., 2010)

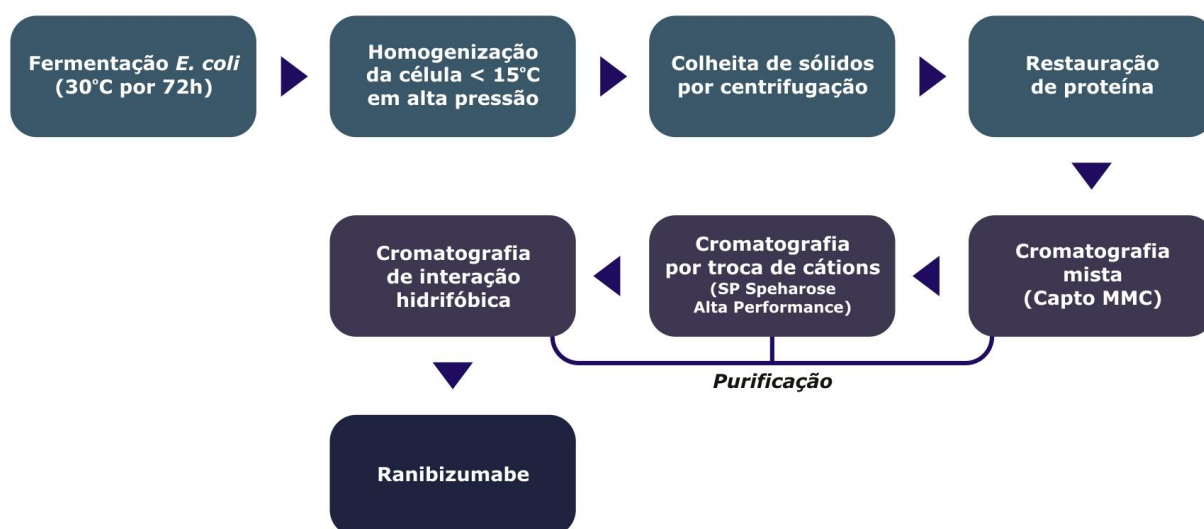
1. 6 Ranibizumabe

O ranibizumabe (rhuFabV2, Lucentis[®]; Genentech, South San Francisco, CA) Registro no Ministério da Saúde: 1.0068.1056.002-4, fabricado pelo laboratório Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça, é uma imunoglobulina monoclonal recombinante humana G1 (Ig G1), cuja molécula tem 48 kilodalton, fragmento isotipo k que inibe o fator de proliferação vascular, ou seja, neutraliza todas as isoformas do

VEGF. Como fragmento de anticorpo monoclonal recombinante humanizado, o ranibizumabe atua contra o fator de crescimento endotelial vascular humano A (VEGF-A) (VAN WIJNGAARDEN; QURESHI, 2008)

A aparência do ranibizumabe varia de incolor a amarelo pálido, sendo sintetizado, conforme apresentado na figura 11, por um sistema de expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*, onde genes para produção do ranibizumabe são inseridos em bactérias para produção da proteína ativa não glicosilada, num meio de cultura contendo tetraciclina, não detectáveis no produto final. (CARTER, 2011; KOURLAS; ABRAMS, 2007; SINGH; KAISER, 2007; PIZARRO et al. 2010)

Figura 11 Representação esquemática da síntese do ranibizumabe.



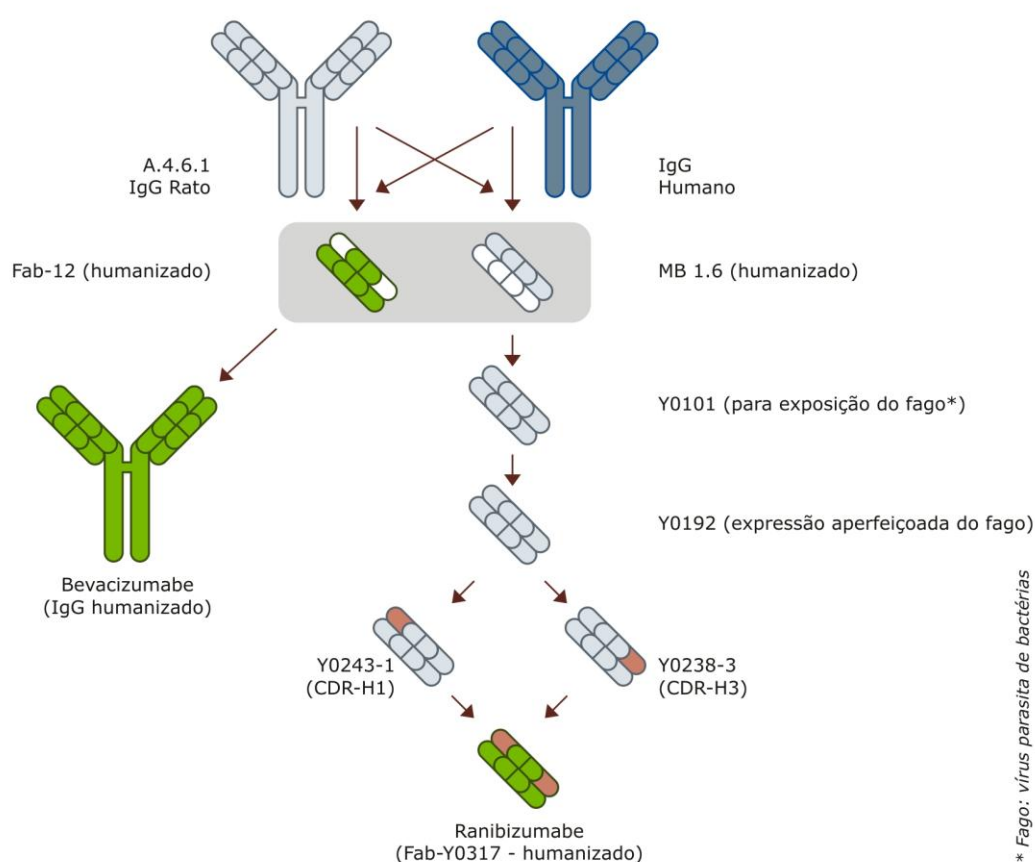
Fonte: Adaptado de Pizarro (2010)

Conforme pode ser observado na figura 12 o ranibizumabe é um anticorpo recombinante constituído por uma molécula quimérica, podendo ser dividida em

duas porções: uma sequência humana não ligante conferindo ao anticorpo menor antigenicidade e um epítipo ligante de alta afinidade derivado do camundongo que serve para ligação ao antígeno. (FERRARA, 2009; RODRIGUES et al. 2006).

A sequência de ligação derivada do camundongo é o que torna o ranibizumabe menos antigênico para o ser humano. Os fatores de proliferação do endotélio vascular (VEGF-A) forma humanizada desta molécula é conhecida como o bevacizumabe. A Fab forma de A.4.6.1 foi humanizado e referida como rhuFab V1 (Fab-12) pela recombinação de aminoácidos das variantes de alta afinidade Y0243-1 e Y0238-3 gerou-se a variante Y0317, também conhecido como ranibizumabe (rhuFab V2). (KAISER, 2006; KAISER, 2007; HO; KUO, 2007)

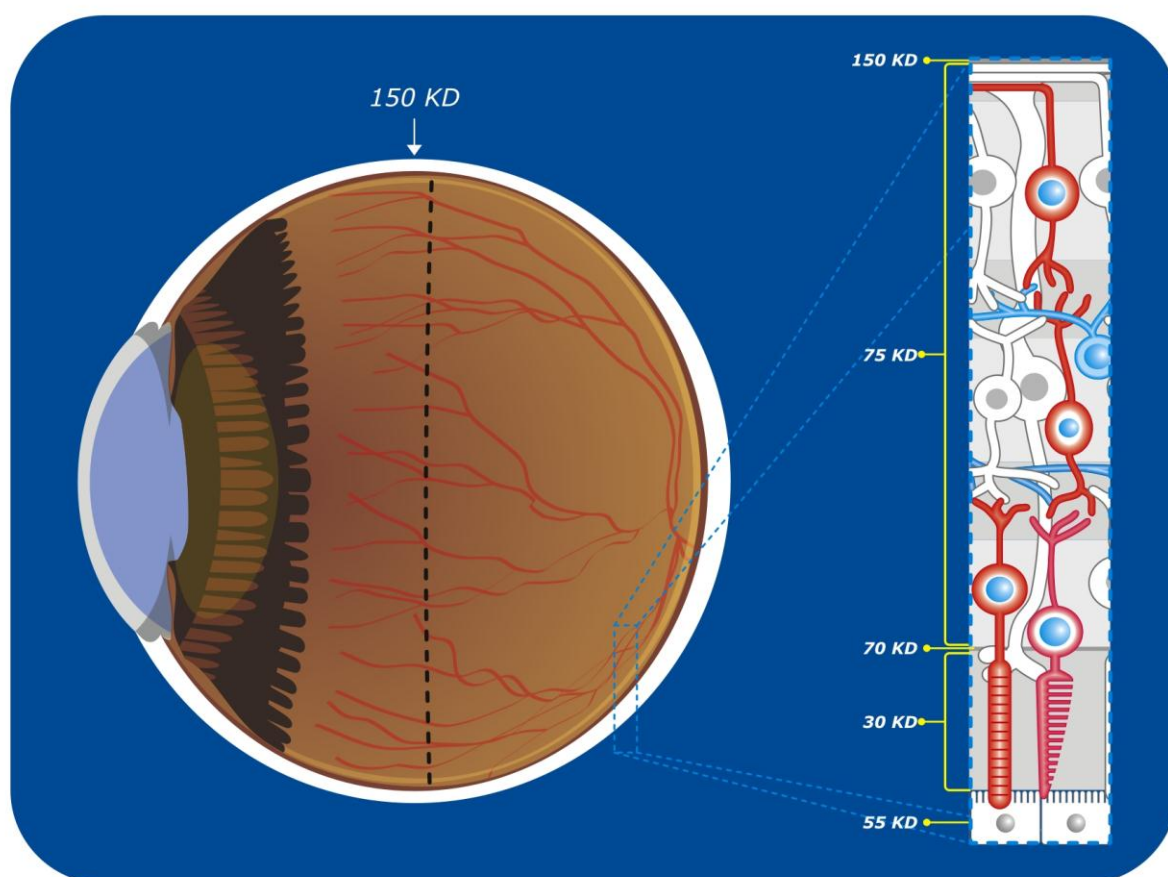
Figura 12 Genealogia do bevacizumabe e do ranibizumabe.



Fonte: Adaptado de Ferrara (2009)

Ao contrário do pegaptanibe, o ranibizumabe se liga e inibe a atividade biológica de todas as formas ativas de VEGF-A, bem como os produtos ativos de sua degradação, VEGF 110. A forma Fab foi desenvolvida, uma vez que os estudos anteriores indicaram que os anticorpos maiores não penetravam na retina e, sua forma menor permitiu a penetração na totalidade da retina, conforme pode ser observado na figura 13. (EL SANHARAMI et al., 2010; KAISER, 2006; KAISER, 2007)

Figura 13 Representação esquemática da penetração de fármacos pelas diferentes barreiras oculares relacionada ao seu peso molecular.



Fonte: Adaptado de El Sanharami e outros (2010)

O ranibizumabe foi efetivo com o limite de exclusão da retina (aproximadamente 76,5 kD), fato que impede moléculas maiores de passar através das camadas plexiforme interna e externa. Seguidos usando a administração da injeção intravítrea de ranibizumabe em coelhos, demonstraram a penetração em todas as camadas da retina. O ranibizumabe não possui a região Fc e não se liga à região complementar C1q ou receptores Fc gama, portanto, não promove reação mediada pelo complemento das respostas imunes, reduzindo o risco da criação de resistência ao fármaco caso seja administrado por várias vezes.(EL SANHARAMI et al., 2010; KAISER, 2006)

O ranibizumabe é utilizado para evitar a progressão da DMRI uma vez que se liga com alta afinidade às isoformas do VEGF-A (VEGF 110, VEGF 121 e VEGF 165) deste modo inibindo a ligação do VEGF-A aos seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 e impedindo a proliferação das células endoteliais e à neovascularização, assim como ao vazamento vascular. (BAKRI et al., 2007; BROWN et al., 2008; ENG; KERTES, 2006; NEHEMY, 2006; REGATIERI et al., 2010)

A penetração do ranibizumabe na retina se dá pela rede coriocalilar onde se encontram as lesões iniciais da DMRI e a neovascularização da coróide. A presença sistêmica do ranibizumabe quando injetado no vítreo não chega a 0,01%, sendo sua eliminação feita tanto pela rede coriocalilar, como pelo segmento anterior através da drenagem do humor aquoso (GAUDREAULT et al., 2007; KAISER, 2006). O Ranibizumabe apresenta meia-vida no vítreo de 2 a 4 dias, podendo estar presente em dose mínima após 29 dias. (BAKRI et al., 2007; GAUDREAULT et al., 2007; LAUDE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2006; TOLENTINO, 2011)

O protocolo de tratamento da DMRI é feito pela administração intravítrea de 0,05 mL de ranibizumabe, na concentração de 10 mg/mL. Esta administração é realizada uma vez por mês, durante três meses consecutivos, podendo ser repetida uma nova série de três injeções após seis meses de intervalo, conforme a necessidade. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; BAKRI et al., 2007; CONLEY; NAASH, 2010)

Entretanto, o tratamento pela administração intravítrea do ranibizumabe para a DMRI apresenta algumas desvantagens em relação ao custo/benefício. O custo aproximado por aplicação gira em torno de U\$1.800,00 até U\$2.000,00. Este tratamento, no decorrer de um ano, muitas vezes, chega a ser composto por seis

aplicações, o que pode ocasionar a prática do fracionamento de uma ampola, pelo médico, para a realização da administração intravítrea em mais de um paciente. A prática de fracionamento pode ocasionar o aumento do risco de endoftalmite. (ANDERSON; BAINBRIDGE; SHIMA, 2010; LAVINSKY et al., 2010; IP et al., 2008)

2 OBJETIVOS

2. 1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vivo* e *in vitro*, os efeitos do ranibizumabe sobre o sofrimento celular.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o sofrimento celular do tecido retiniano normal de coelhos após a administração intravítrea de ranibizumabe.
- Avaliar a citotoxicidade do ranibizumabe em cultura de fibroblastos murinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo (UNIFESP), número 1436/10, em 20 de agosto de 2010.

3.1 Medicamentos

- Lucentis® (marca registrada de Genentech, Inc), cujo princípio ativo é o ranibizumabe na concentração de 10 mg/mL em solução para injeção, acondicionado em frascos ampola contendo 0,23 mL de solução. Lotes S0025A, S0025B, S0038, S0041, S0042.
- Anasedan® Injetável, cujo princípio ativo é a xilasina, na apresentação de frasco ampola com 10 mL, fabricado pelo laboratório Vetbrands.
- Dopalen® injetável, cujo princípio ativo é o cloridrato de ketamina, na apresentação de frasco ampola com 10 mL, fabricado pelo laboratório Vetbrands.
- Hypnol®, cujo princípio ativo é o pentobarbital sódico 30 mg/mL, na apresentação de frasco ampola com 50 mL, fabricado pelo laboratório Syntec.
- Mydriacyl® colírio, cujo princípio ativo é a tropicamida 1%, na apresentação de frasco com 5 mL, fabricado pelo laboratório Alcon.
- Cloridrato de Fenilefrina 10% colírio na apresentação de frasco com 5 mL, fabricado pelo laboratório Allergan.
- Anestésico® colírio, cujo princípio ativo é o cloridrato de tetracaína 1% e o cloridrato de fenilefrina 0,1%, na apresentação de frasco com 10 mL, fabricado pelo laboratório Allergan.

- Tobramicina 3 mg, Dexametasona 1 mg colírio, na apresentação de frasco com 5 mL, fabricado pelo laboratório Biossintética.
- Ciclolato® colírio, cujo princípio ativo é o cloridrato de ciclopentolato 1%, na apresentação de frasco com 5 mL, fabricado pelo laboratório Latinofarma.

3.2 Animais

Foram utilizados treze coelhos albinos da Nova Zelândia, gênero *Oryctolagus*, espécie *cuniculus*, machos, com peso variando entre 1.800 e 2.900 g e aproximadamente 6 meses de vida. Os animais foram alojados no Biotério da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - PUC-SP, campus Sorocaba, Centro de Ciências Médicas e da Saúde. O manejo dos animais foi realizado conforme preconiza o regulamento para uso de animais em Oftalmologia e estudos sobre a visão (ARVO). (MACKY et al., 2003).

3.3 Fibroblastos Murinos

Células CCL 92, obtidas a partir de células NIH/3T3, da American Type Culture Collection (ATCC), cultivadas pelo laboratório coordenado pela Prof Dra Mônica Beatriz Mathor, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN/SP). (ATCC, 2008)

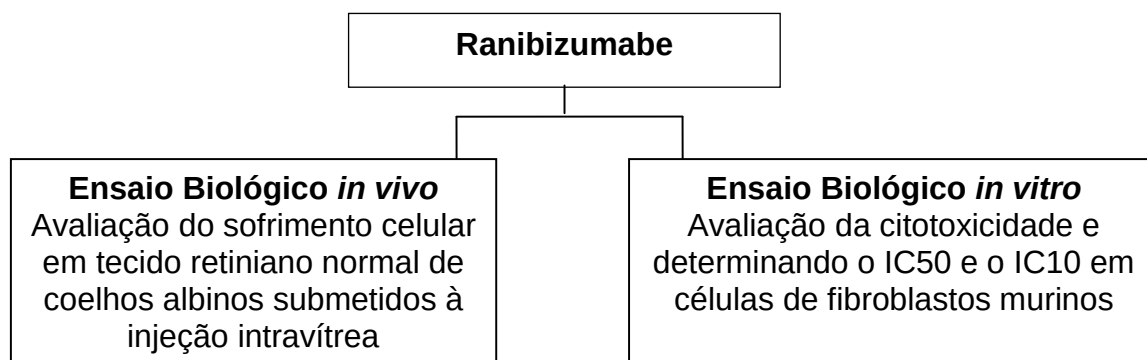
3.4 Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos realizados neste estudo com o intuito de avaliar a segurança do ranibizumabe, representados na figura 14, sendo para isso utilizados dois ensaios biológicos:

I. O ensaio biológico *in vivo* onde foi realizada a avaliação do sofrimento celular em tecido retiniano normal de coelhos albinos submetidos à injeção intravítrea do ranibizumabe 10 mg/mL no volume de 0,03 mL, 0,05 mL em relação ao grupo controle. Este estudo foi realizado através do exame de fundoscopia óptica, antes e após a injeção intravítrea, por um período de 21 dias. Em seguida, foi realizada a análise histológica do tecido retiniano, corado pela técnica de Hematoxilina-Eosina, onde foram analisados sinais de sofrimento ou morte celular nos diferentes grupos estudados.

II. O ensaio biológico *in vitro* onde foi avaliada a citotoxicidade, visando à determinação da IC₅₀ e da IC₁₀ em células de fibroblastos murinos, para as concentrações de 0,07mg/mL, 0,13mg/mL, 0,25mg/mL, 0,50mg/mL de ranibizumabe em relação ao controle. Este estudo foi realizado pela medição da quantidade de formazana, tornando possível a determinação do número de células vivas na cultura de células CCL 92, através da espectrofotometria.

Figura 14 Representação geral dos ensaios biológicos utilizados para avaliação da segurança do ranibizumabe para o tratamento da DMRI.



Fonte: Elaboração própria

3.4.1 Ensaio Biológico *in vivo*

O ranibizumabe, foi fracionado em seringas, contendo 8 doses de 0,03 mL e 8 doses de 0,05 mL, através da técnica onde se utiliza agulha de 21 Gauge (BD PrecisionGlide® 21G; 0.80 mm x 25 mm) e a agulha-seringa de 29 Gauge (BD Ultra-Fine® 29G, Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ). Este método difere do que é preconizado pelo fabricante do fármaco onde a aspiração é feita com a agulha de 18 Gauge (BD® Blunt Fill Needle-Filter, 1,2 mm x 40 mm) e a injeção é realizada com a agulha de 30 Gauge (BD Microlance®3, 0,3 mm x 13 mm) conectada à seringa de tuberculina de 1 mL. Para aspiração com esta técnica, utilizamos a agulha de 21 Gauge, colocada sobre a seringa de 1mL que deve estar acoplada numa agulha de 29 Gauge. Depois da aspiração, a agulha de 21 Gauge é removida e a injeção intravítrea é realizada com a agulha de 29 Gauge. A técnica de injeção proposta tem por função minimizar a perda do fármaco durante aplicação de injeção intravítrea, o que é de grande importância devido ao alto custo deste medicamento. Na figura 15, pode ser observada a forma de apresentação na qual o ranibizumabe é comercializado. (RIBEIRO et al., 2009)

Figura 15 Fotografia da embalagem original de ranibizumabe (Lucentis®).



Fonte: Elaboração própria

A figura 16 indica todos os procedimentos realizados no ensaio biológico *in vivo*, conforme metodologia descrita anteriormente por Bakri et al. (2007), Ferreira et al. (2002), Freitas (1990), Galera et al. (2005), Gaudreault et al. (2007), Hagigit et al. (2010), Macky et al. (2003), Manzano et al. (2009), Oliveira Neto et al. (2002), Pezzutti et al. (2001), Tolosa et al. (2003).

A midríase dos olhos dos animais foi obtida com instilação de tropicamida a 1% e de cloridrato de fenilefrina a 10%. Após a midríase, os animais foram anestesiados com o uso de xilasina (1 mg/Kg) e ketamina (5 mg/Kg) administrados por injeção subcutânea e antes da injeção intravítrea foi realizada a anestesia local com instilação de colírio anestésico.

Todos os animais foram submetidos ao exame de fundoscopia indireta, utilizando o oftalmoscópio indireto da marca Topcon modelo ID-5 e com o auxílio da lente de +20 Dioptrias, marca Nykon, que apesar de ser tecnicamente mais difícil, fornece visão panorâmica do polo posterior invertida, antes da injeção intravítrea realizada via pars plana a 1 mm posterior ao limbo no quadrante temporal com a agulha direcionada ao centro do olho.

No pós-operatório foi administrado colírio contendo Tobramicina 3 mg, Dexametasona 1 mg, 3 vezes ao dia, por 1 semana e Cloridrato de Ciclopentolato 1% colírio, 1 vez ao dia, por 1 semana.

Os grupos foram randomizados, sendo que: no grupo I (n= 10 olhos), foi injetado 0,05mL de solução salina balanceada (BSS); no grupo II (n= 8 olhos), foi injetado 0,03mL de ranibizumabe e o grupo III, (n= 8 olhos), foi injetado 0,05mL de ranibizumabe. Todos os animais foram submetidos ao exame de oftalmoscopia indireta imediatamente após a injeção intravítrea; 1 hora depois do procedimento; no terceiro; no sétimo; no décimo; no décimo quarto; no décimo sétimo e vigésimo primeiro dia após a injeção intravítrea.

Os animais foram mantidos em ciclo de luz controlado, receberam água e comida *ad libitum*; foram sacrificados por meio de administração intravenosa de pentobarbital sódico, na dose de 12,5 mg/Kg em bolus, no vigésimo primeiro dia pós-operatório da injeção intravítrea.

Os olhos destes animais foram enucleados e imersos na solução de

Karnovsky's (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 2,5% e fosfato tampão 0,2 M com pH de aproximadamente 7,2) a temperatura ambiente por 7 dias, para a fixação das proteínas e inativação das enzimas proteolíticas, evitando-se desta forma o processo de autólise.

O tecido fixado foi lavado em água corrente por meia hora e, a seguir, foi submetido a um processo de desidratação em série crescente de álcoois: álcool 80% num período de 1 hora por 2 vezes, e álcool absoluto num período de 1 hora por 3 vezes.

O globo ocular do coelho sofreu o processo de clareamento através da diafanização com o uso de xilol por 1 hora; e em seguida emblocado em parafina por 5 minutos, em estufa a 56°C, passando por um novo banho por mais 5 minutos. Após este processo, o material foi colocado no fundo do molde, o qual foi completado com parafina derretida a 56-58 °C.

O bloco foi deixado para esfriar à temperatura ambiente e aparado para melhor fixação no micrótomo. A peça de parafina, resfriada em geladeira, foi cortada no micrótomo rotativo numa espessura de 5 micrômetros e colocada sobre a lâmina albuminizada de vidro aquecida com o auxílio de um pincel. As lâminas foram colocadas em estufa para secar.

Os cortes histológicos foram desparafinados e hidratados com exposição ao Xilol por 2 minutos; colocados em álcool absoluto por 1 minuto; álcool a 95% por 1 minuto; álcool a 70% por 1 minuto; água de torneira por 1 minuto e água destilada por 1 minuto.

Para análise histológica, os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) pelo método regressivo, onde o núcleo de células foi corado pela Hematoxilina de Harris e o citoplasma foi corado pela Eosina.

Na análise da retina à microscopia óptica, num aumento de 200x, observou-se a camada de cones e bastonetes, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, de células ganglionares e camada de fibras nervosas.

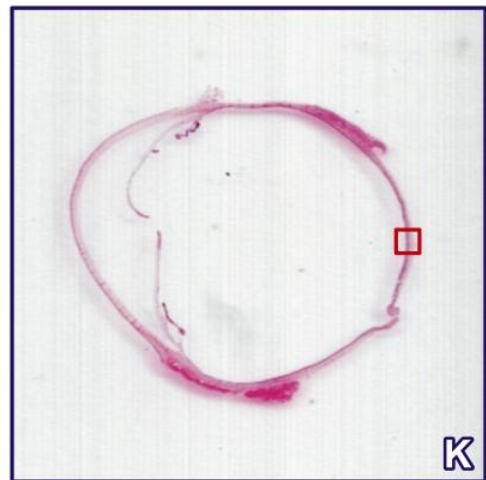
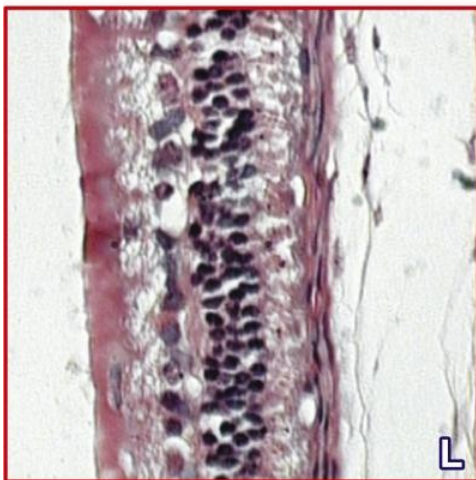
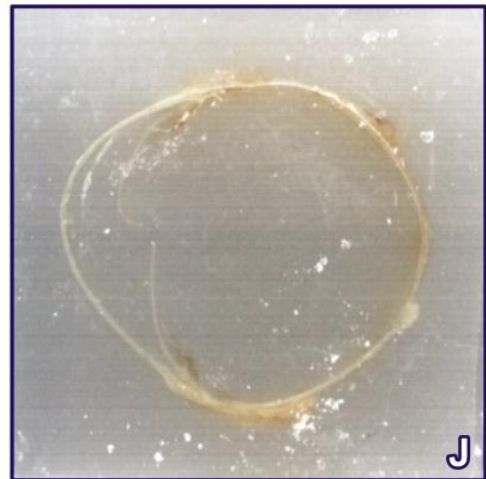
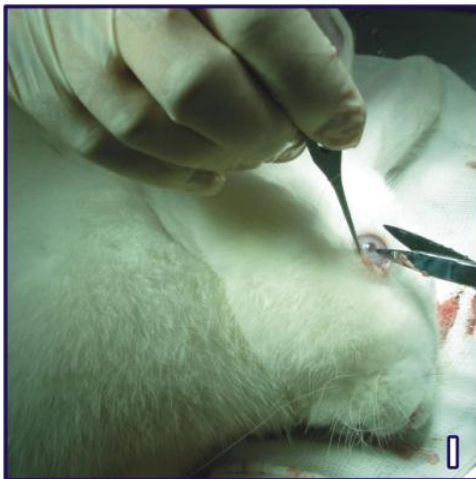
As amostras foram avaliadas de acordo com a presença ou ausência de sofrimento celular da retina, ou seja, pela presença de células em necrose ou degeneração e aspecto do núcleo e citoplasma.

Figura 16 Representação das fases do processo de execução do ensaio biológico *in vivo* com ranibizumabe: (A) midríase medicamentosa, (B) anestésicos utilizados para sedação, (C) coelhos albinos sedados, (D) instilação de colírio anestésico, (E) oftalmoscopia indireta antes da injeção intravítrea, (F) injeção intravítrea,



continua na próxima página

(G) instilação de colírio de tobramicina e dexametasona, (H) oftalmoscopia indireta após a injeção intravítrea, (I) enucleação dos olhos dos coelhos, (J) bloco de parafina, (K) lâmina corada pela técnica de Hematoxilina-Eosina, (L) corte histológico da retina a microscopia óptica, aumento de 200x.



Fonte: Elaboração própria

3.4.2 Ensaios Biológicos *in vitro*

O ensaio biológico *in vitro* foi realizado no laboratório, coordenado pela Prof. Dra. Mônica Beatriz Mathor, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN/SP), localizado na Avenida Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária, São Paulo, SP.

O método foi descrito por Baltrop e Owen (1991), Doyle e Griffiths (2000), Fresney (2005), Promega Corporation (2001) e reproduzido por Gianelli et al. (2008), Hagigit et al. (2010), Hidalgo e Dominguez, (2001).

Este ensaio biológico está esquematizado na figura 17. As células de fibroblastos murinos, CCL 92, foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10%, glutamina (4 mmol/L), penicilina-estreptomicina (50 U.I./mL). As células foram incubadas a 37°C em 97% de umidade do ar, contendo 5% de CO₂ em frascos de plásticos para cultura celular.

Após a confluência em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução de tampão fosfato, livre de magnésio e cálcio (PBS-MCF). Para a remoção das células, foi utilizada uma solução de tripsina a 0,25%. Após a tripsinização, as células foram transferidas para um tubo cônico e lavadas, duas vezes, com PBS-MCF.

As células foram centrifugadas por 5 minutos em 1600 rotações por minuto e suspensas novamente em meio DMEM suplementado e ajustadas de forma a conterem 30.000 células/mL.

Estas células de fibroblastos murinos foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO₂ (37°C em 97% de umidade do ar contendo 5% de CO₂) por 24 horas, de forma a propiciar a adesão das células.

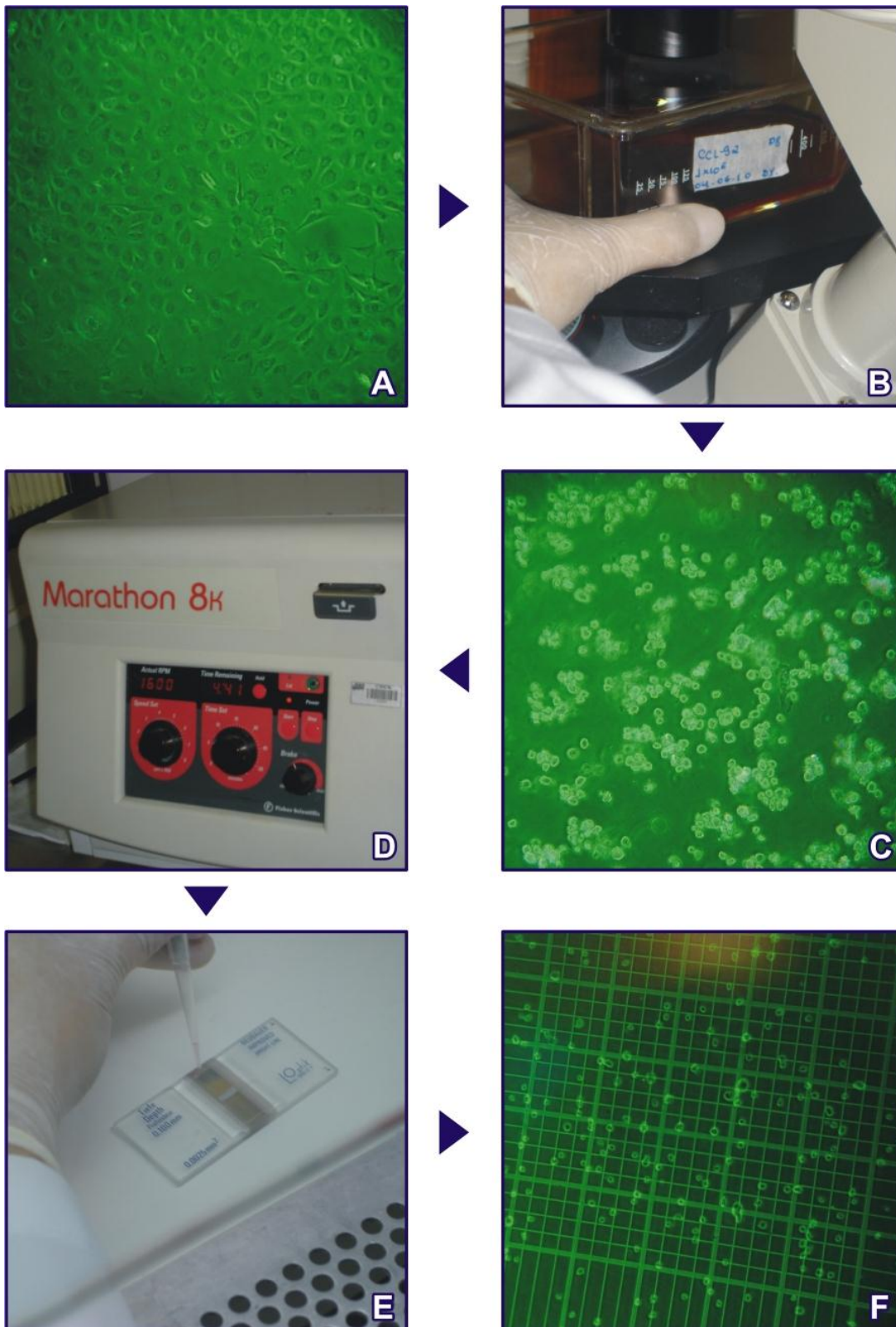
Após 24 horas de incubação, seis poços foram deixados como controle, 0,07 mg/mL de ranibizumabe foram adicionados em três poços e o mesmo foi feito com as concentrações de 0,13mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,50mg/mL. Após este procedimento, a placa foi incubada novamente por 24 horas.

Com o intuito de se quantificar a proliferação das células, aplica-se o método colorimétrico intitulado Cell Titer 96[®] - Ensaio Aquoso não radioativo de proliferação

celular, que tem o seguinte princípio: o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) é biorreduzido pelas enzimas desidrogenases, encontradas nas células ativas, a um produto (formazana) que é solúvel no meio de cultura celular e que absorve fortemente a 490 nm. Desta forma, a absorbância da formazana pode ser medida diretamente nos poços da placa Multiwell 96, sem nenhum processo adicional. A quantidade de formazana medida pela absorbância da solução a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células vivas, em cultura e lido no espectrofotômetro de Elisa (modelo Spectramax 190[®]).

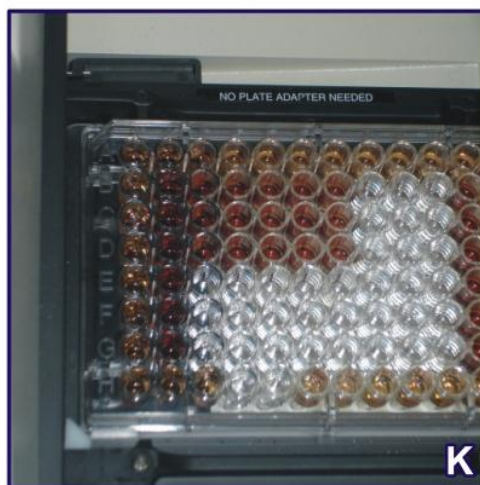
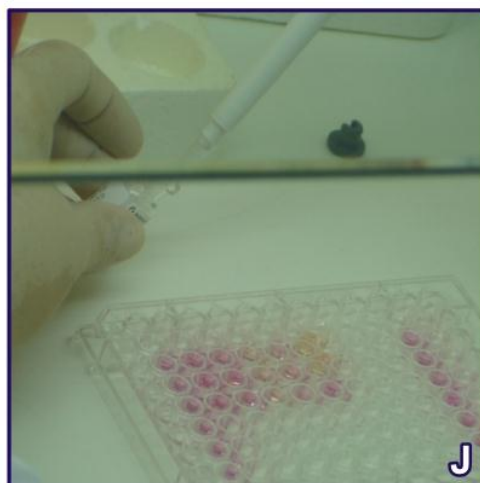
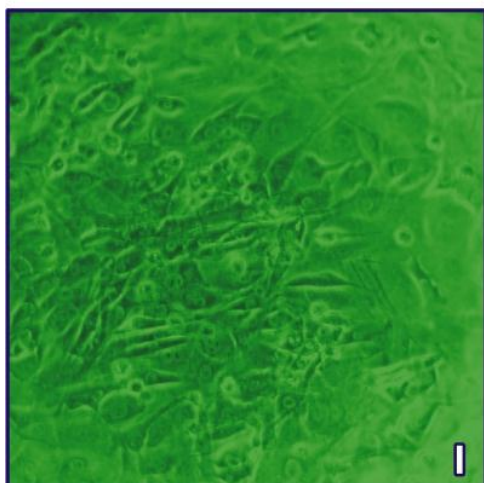
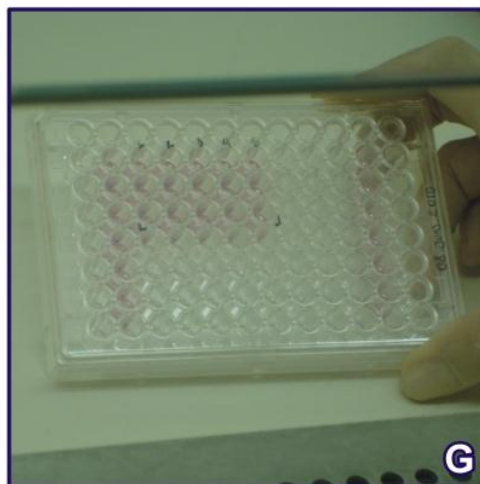
Após 48 horas de contato, o meio foi aspirado dos poços e adicionou-se alíquotas de 120 µL da solução MTS / PMS em DMEM suplementado em todos os poços da placa, que foram imediatamente acondicionadas em estufa de atmosfera controlada por 2 horas. Decorrido este período inicial, foram realizadas medidas de absorbância, a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA acoplado à impressora, onde se determinou o número de células vivas em cada um dos poços em relação à média dos poços deixados como controle. A determinação do potencial do ranibizumabe em matar 50 por cento das células (IC 50) ou 10 por cento (IC 10) das várias células foi um indicativo de DL50 e DL 10 respectivamente.

Figura 17 Representação das fases do processo de execução do ensaio biológico *in vitro* com ranibizumabe: (A) fibroblastos murinos, (B) células em processo de tripsinização, (C) fibroblasto murino após a tripsinização, (D) processo de centrifugação das células, (E) células suspensas novamente sendo colocadas em lâmina para recontagem, (F) contagem das células à microscopia óptica,



continua na próxima página

(G) colocação das células na placa de 96 poços, (H) colocação da placa em estufa de CO₂ para incubação, (I) aspecto das células após 24 horas de incubação, (J) ranibizumabe em diferentes concentrações adicionado aos poços, (K) placa de 96 poços sendo colocado no espectrofotômetro para realização da leitura, (L) espectrofotômetro realizando medidas de absorvância a 490 nm.



Fonte: Elaboração própria

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume de 0,03 mL de ranibizumabe foi utilizado, neste ensaio biológico *in vivo*, com base na proporcionalidade entre o volume do vítreo do coelho albino raça Nova Zelândia, cujo volume é de aproximadamente 1,5 mL, e o volume do vítreo do ser humano, onde o volume é 3 vezes maior; portanto quando utilizamos 0,03 mL de ranibizumabe, estamos injetando um volume 2 vezes maior que o administrado terapeuticamente em humanos. (FERREIRA et al., 2002; LAUDE et al., 2010)

O volume do ranibizumabe, a 10mg/mL, preconizado para injeção intravítrea, no tratamento da DMRI é de 0,05 mL; portanto foi decidido também pela utilização do volume de 0,05 mL, de ranibizumabe a 10mg/mL, o que corresponde a aproximadamente um volume 3 três vezes maior que o utilizado no tratamento da DMRI. (FERREIRA et al., 2002; LAUDE et al., 2010)

A midríase medicamentosa pré injeção intravítrea descrita por Manzano et al. (2009) foi eficaz.

A sedação dos animais descrita por Hagigit et al. (2010) foi eficiente sendo necessário a utilização da dose máxima por peso tanto da xilasina quanto da ketamina para uma sedação satisfatória.

A análise fundoscópica, através do exame de mapeamento de retina, em coelhos no pré e pós injeção intravítrea possibilitou o monitoramento de possíveis complicações deste procedimento.

O uso da tobramicina associado à dexametasona e do cloridrato de ciclopentolato, conforme preconizou Pezzutti et al. (2001), mostrou-se eficaz sem qualquer sinal de endoftalmite no pós operatório.

Como já descrito por Kim et al. (2008), o aumento do volume no polo posterior do olho, com consequente aumento da pressão vítrea sobre o tecido retiniano, causa redução do fluxo sanguíneo nos vasos retinianos. Esta redução no fluxo sanguíneo justifica o aspecto esbranquiçado na retina (Tabela 1), como demonstrado neste experimento e que pode ser classificado como leve, moderado ou grave.

A presença de retina esbranquiçada no ensaio biológico *in vivo* foi observado somente no grau leve nos três grupos estudados e moderado no grupo III, no período entre o exame de fundoscopia indireta imediatamente após a injeção

intravítrea e na avaliação 1 hora após o procedimento.

Bakri et al. (2007) estudando o tempo de meia vida biológica do ranibizumabe intravítrea, correlacionando com seu peso molecular (48 kD), observou que este fármaco tem um tempo de meia vida de 2,88 dias no modelo animal com coelhos.

Gaudreault et al. (2007) descreve que após a injeção intravítrea de ranibizumabe em olho de coelhos, o vítreo fica claro em aproximadamente 3 dias após a realização do procedimento. Considerando-se que o ranibizumabe e o vítreo do olho possuem densidades distintas, quando se injeta o ranibizumabe no polo posterior, observa-se uma alteração de densidade do vítreo chamada de condensação vítrea.

Como observado na tabela 1, a presença de condensação vítrea foi observada nos grupos I e III, imediatamente após a injeção intravítrea; nos três grupos, 1 hora após o procedimento e somente no grupo III, três dias após o procedimento.

Waisbourd et al. (2007) concluiu que o ranibizumabe se distribui rapidamente para a retina, demorando de 6 até 24 horas, sendo que a concentração na retina é de aproximadamente de um terço do existe no humor vítreo.

Os resultados obtidos na tabela 1 não se mostram diferentes dos obtidos por Oliveira Neto et al. (2002).

Tabela 1 Achados fundoscópicos em coelhos após a administração intravítrea de solução salina balanceada no volume de 0,05 mL (grupo I; n=10) e de ranibizumabe (10mg/mL) nos volumes de 0,03mL (grupo II; n=08), 0,05 mL (grupo III; n=08).

Imediatamente após a injeção intravítrea						
	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Retina Esbranquiçada	n	%	n	%	n	%
Leve	2	20	4	50	3	37,5
Moderada	-	-	-	-	2	25
Grave	-	-	-	-	-	-
Condensação Vítrea	3	30	-	-	4	50
1 hora após o procedimento						
Retina Esbranquiçada	n	%	n	%	n	%
Leve	2	20	3	37,5	4	50
Moderada	-	-	-	-	1	12,5
Grave	-	-	-	-	-	-
Condensação Vítrea	4	40	3	37,5	1	12,5
Três dias após o procedimento						
Retina Esbranquiçada	n	%	n	%	n	%
Leve	-	-	-	-	-	-
Moderada	-	-	-	-	-	-
Grave	-	-	-	-	-	-
Condensação Vítrea	-	-	-	-	1	12,5
Sete dias após o procedimento						
Retina Esbranquiçada	n	%	n	%	n	%
Leve	-	-	-	-	-	-
Moderada	-	-	-	-	-	-
Grave	-	-	-	-	-	-
Condensação Vítrea	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaboração própria

A figura 18 mostra o corte histológico da retina onde a coróide, a camada fotorreceptora, a camada celular nuclear interna e externa e a camada de células ganglionares onde foi analisada a presença de necrose ou morte celular conforme Ferreira et al. (2002).

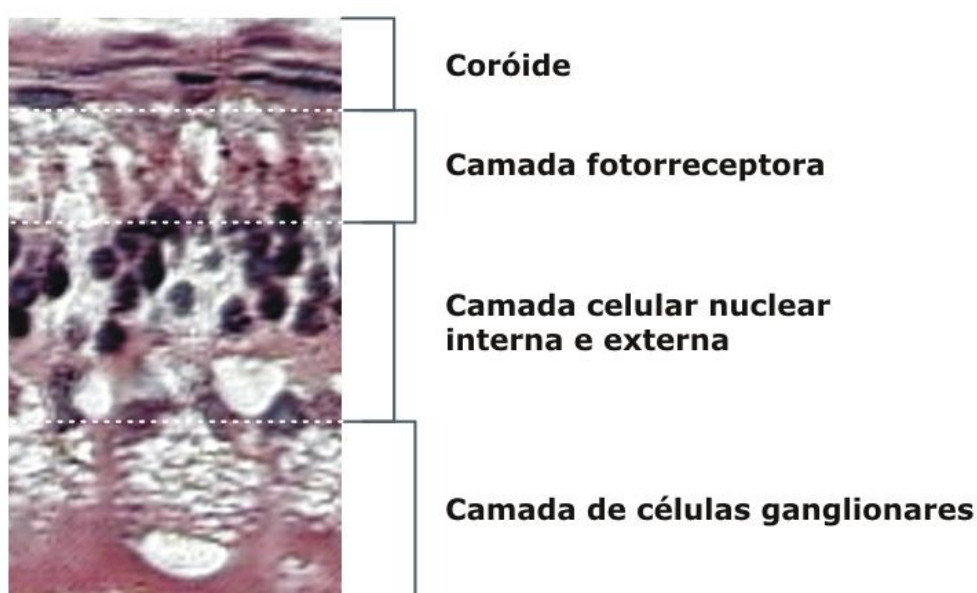
A figura 19 mostra cortes histológicos do tecido retiniano de coelhos albinos, corados com Hematoxilina-Eosina, técnica histológica consagrada, descrita por Tolosa et al. (2003), num aumento de 200x, após 21 dias da injeção intravítrea de ranibizumabe 10 mg/mL, nos volumes de 0,03 mL, 0,05 mL e solução salina balanceada num volume de 0,05 mL.

Na análise da retina através da microscopia óptica, foi observada a camada de cones e bastonetes, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna,

plexiforme interna, de células ganglionares e camada de fibras nervosas. O tecido retiniano, nos três grupos, apresentou o mesmo aspecto histológico, demonstrando que não existem sinais de morte ou sofrimento celular mesmo duplicando ou triplicando o volume utilizado no ser humano.

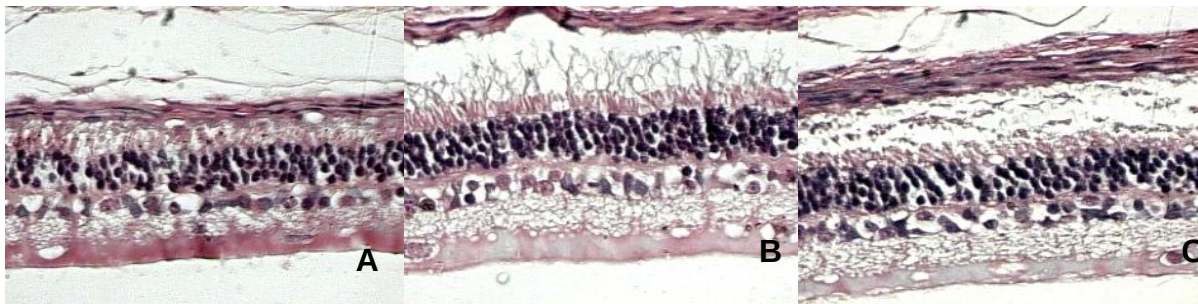
Em nossos resultados, observa-se que tanto o aumento no volume como o aumento na dose de ranibizumabe não promovem alterações histológicas no tecido retiniano de coelhos. Oliveira Neto et al. (2002) encontrou os mesmos resultados após a injeção intravítrea de bupivacaína em olhos de coelhos albinos.

Figura 18 Corte de retina de coelho com representação esquemática das camadas da retina. 200x de aumento (Hematoxilina-Eosina).



Fonte: Elaboração própria

Figura 19 Corte de retina dos coelhos submetidos à administração intravítrea de ranibizumabe (10mg/mL) nos volumes de 0,03mL (A), 0,05 mL (B) e de solução salina balanceada no volume de 0,05 mL (C). 200x de aumento (Hematoxilina-Eosina).



Fonte: Elaboração própria

O volume vítreo do coelho é de aproximadamente 1,4 mL e o volume do vítreo humano é de aproximadamente 3,9 mL. O clearance do vítreo é inversamente proporcional ao volume, ou seja, quanto maior o volume do vítreo, menor o seu clearance. O clearance do vítreo do coelho é o dobro do clearance do vítreo do ser humano. (LAUDE et al., 2010). No modelo experimental *in vivo* realizado neste estudo, observaram-se alterações de densidade no polo posterior dos animais, imediatamente após o procedimento, 1 hora e três dias após o procedimento. (tabela 1) Neste sentido, pode se afirmar que a condensação vítrea observada neste experimento é decorrente de alterações fisiológicas do vítreo, não sendo considerada um efeito adverso do ranibizumabe.

A tabela 2 e a figura 20 mostram os resultados obtidos no ensaio biológico *in vitro* em células de fibroblastos murinos. Os resultados encontrados indicam que a concentração mínima inibitória de ranibizumabe para matar 10% das células (IC 10) foi atingida numa concentração próxima a 0,01 mg/mL. Por outro lado, a concentração inibitória mínima de ranibizumabe para matar 50% das células (IC 50) não chegou a ser atingida. Devemos considerar que a técnica descrita por Baltrop e

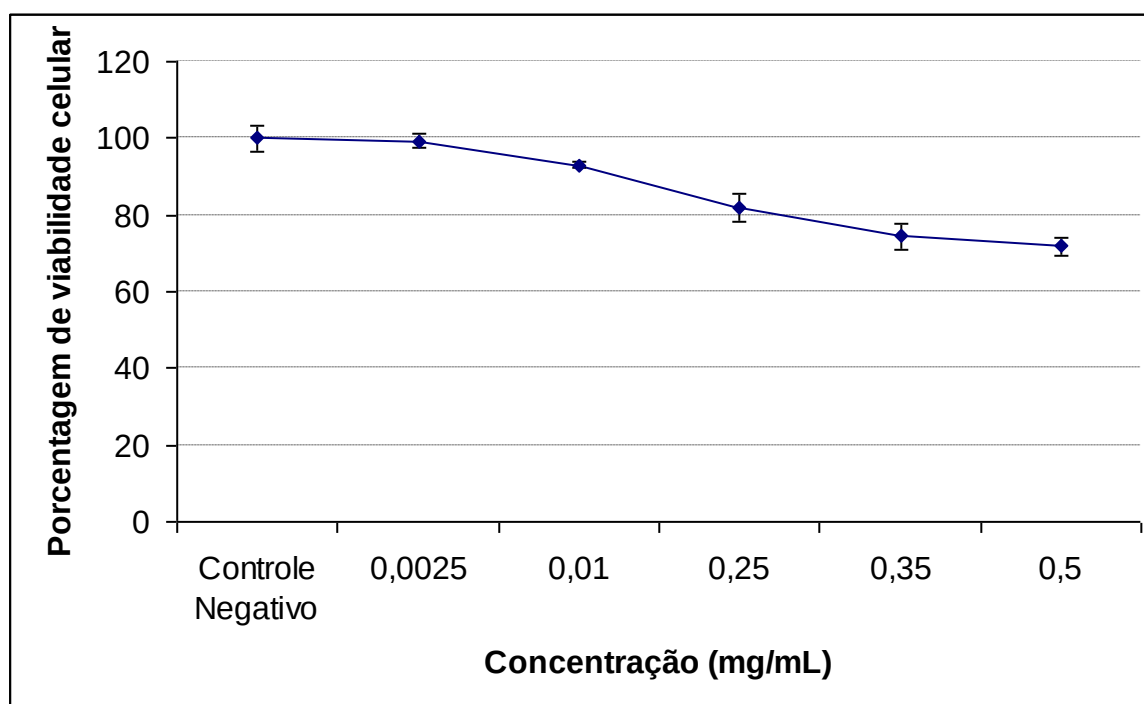
Owen (1991) e reproduzida por Gianelli et al. (2008), Hidalgo e Domingues (2001) se mostrou bem reprodutível, exigindo experiência prévia para que a metodologia fosse realizada de forma correta.

Tabela 2 Média do corante MTS absorvido a 490 nm; desvio padrão da médio (SD); porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle e desvio padrão da viabilidade celular (SD viabilidade).

Parâmetros	Controle	0,07mg/mL	0,13mg/mL	0,25mg/mL	0,50mg/mL
MTS	1,388	1,179	1,085	1,071	0,965
SD	0,06	0,06	0,08	0,05	0,06
Porcentagem	100	84,9	78,11	77,16	69,51
SD Viabilidade	4,15	4,88	7,21	4,28	6,31

Fonte: Elaboração própria

Figura 20 Porcentagem de viabilidade celular frente às diferentes concentrações do ranibizumabe (0,0025 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,35 mg/mL e 0,5 mg/mL) e do controle de células.



Fonte: Elaboração própria

Spitzer et al. (2007) afirmam que quando se realiza o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, com uma concentração de 0,125 mg/mL de qualquer fármaco em estudo, equivale à dose total de 0,5 mg no volume do vítreo.

A concentração de 0,5mg/mL, utilizada no protocolo da administração do ranibizumabe em seres humanos, o que equivale a 2mg/mL, ou seja, dose quatro vezes maior que a utilizada em seres humanos em contato direto com as células de fibroblastos murinos, resultou numa porcentagem de viabilidade celular de aproximadamente 69,51%.

Estes resultados indicam que o ranibizumabe apresenta muito baixa citotoxicidade, reforçando sua segurança para que seja administrado no tratamento da degeneração macular relacionado à idade, porque mesmo após a exposição dos fibroblastos murinos a uma dose 4 vezes maior que a dose utilizada na terapêutica atual do ranibizumabe, apenas 31,49% das células sofreram morte celular.

A escolha do tipo celular, no caso fibroblastos murinos, não comprometeu o resultado do experimento uma vez que em estudo semelhante de citotoxicidade do ranibizumabe, reproduzido por Spitzer et al. (2007) através de ensaios experimentais *in vitro*, utilizando-se células endoteliais da coróide de porcos, ou epitélio pigmentar da retina humana ou células ganglionares da retina de ratos, a morte celular foi muito próxima ao grupo controle nos três casos.

5 CONCLUSÃO

A DMRI é considerada uma patologia contemporânea, devido ao aumento de tempo de vida da população mundial, causando diminuição significativa da qualidade de vida das pessoas pela perda da visão necessária à realização de atividades básicas do dia-a-dia.

O ranibizumabe trouxe uma nova perspectiva no tratamento dos pacientes portadores de DMRI na forma ativa, evitando sua evolução o que, em alguns casos, pode ser devastador em relação à perda da visão central e à qualidade de vida destes pacientes.

O investimento em pesquisa na prevenção e no tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), por parte do poder público é essencial para que o desafio de vencer esta patologia seja alcançado.

O uso da terapia antiangiogênica na DMRI parece ser, na atualidade, o tratamento mais eficaz, devido a sua alta especificidade, pois atua de forma direta no desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos.

O ensaio biológico *in vitro* durou 3 dias, o que o torna muito mais rápido que o ensaio biológico *in vivo* que durou aproximadamente 30 dias.

O ensaio biológico *in vitro* demonstrou a segurança do ranibizumabe em contato com as células de fibroblastos murinos; e o ensaio biológico *in vivo* demonstrou a segurança do ranibizumabe quando aplicado por meio de injeção intravítrea em olhos de coelhos albinos.

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro* do presente estudo, somados, reforçam ainda mais que o ranibizumabe apresenta baixa citotoxicidade tanto no tecido retiniano normal dos olhos de coelhos albinos, quanto em cultura celular de fibroblastos murinos, CCL 92, reforçando sua segurança para que seja administrado no tratamento da degeneração macular relacionado à idade.

O protocolo de tratamento da DMRI com o uso do ranibizumabe é feito por injeção intravítrea, podendo chegar a 6 injeções intravítreas no período de 1 ano. No ensaio biológico *in vivo*, não ocorreu nenhum efeito adverso relacionado ao

trauma mecânico induzido por esse procedimento, reafirmando a segurança do ranibizumabe quando aplicado por meio de injeção intravítrea.

Este estudo comprova a segurança do protocolo de tratamento do ranibizumabe, utilizado até o momento e pretende lançar o desafio futuro de se estudar formas de liberação controlada deste fármaco em tais protocolos, melhorando ainda mais a segurança e a relação custo/benefício do tratamento em pacientes portadores de DMRI na forma ativa. A terapia molecular utilizando drogas antiangiogênicas só será eficiente se conseguirmos disponibilizar a medicação no tecido alvo, em concentração correta e pelo tempo necessário para que a angiogênese retiniana seja controlada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Luciana Negrão Frota de et al. The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 567-72, 2009.
- ÁLVARO, Ana Rita Costa Silva. **O Neuropeptídeo Y e os seus receptores na retina: da proliferação celular à neuroprotecção**. 2008. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias da Saúde, na especialidade de Biologia Celular e Molecular) – Centro de Neurociências e Biologia Celular da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra 2008.
- ANDERSON, O. A.; BAINBRIDGE, J. W. B.; SHIMA, D. T. Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease. **Drug Discovery Today**, London, v. 15, n. 7/8, p. 272-82, 2010.
- American Type Culture Collection (ATCC). Disponível em: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-92&Template=cellBiology> . Acesso em: 01 abril 2011.
- BAKRI, Sophie J. et al. Bilateral simultaneous intravitreal injections in the office setting. **American Journal of Ophthalmology**, Jacksonville, v. 148, n. 1, p. 66-9, 2009.
- BAKRI, Sophie J. et al. Pharmacokinetics of Intravitreal Ranibizumab (Lucentis). **Ophthalmology**, Baltimore, v. 114, n. 12, p. 2179-82, 2007.
- BALTROP, J. A.; OWEN, T. C. 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 615-8, 1991.
- BISHT, M; DHASMANA, D. C.; BIST, S. S. Angiogenesis: future of pharmacological modulation. **Indian Journal of Pharmacology**, Uttarakhand, v. 42, n. 1, p. 2-8, 2010.
- BOCHOT, Amelie et al. Potentiel des liposomes pour l'injection intravitréenne de molécules thérapeutiques. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 69, n. 2, p. 100-7, 2011.
- BORDON, Arnaldo Furman et al. Avaliação da tomografia de coerência óptica em pacientes portadores de degeneração macular relacionada à idade tratada com terapia fotodinâmica com verteporfirina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 799-804, 2008.
- BRESSLER, Neil M et al. Improved vision-related function after ranibizumab vs photodynamic therapy. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 127, n. 1, p. 13-21, 2009.
- BROWN, Melissa M et al. A Value-Based Medicine Analysis of Ranibizumab for the Treatment of Subfoveal Neovascular Macular Degeneration. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 115, n. 6, p. 1039-1045.e5, 2008.

- BRUNI, L. F.; CRUZ, A. A. V. Sentido cromático: tipos de defeitos e testes de avaliação clínica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 5, p. 766-75, 2006.
- CARTER, Paul J. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. **Experimental Cell Research**, v.317, n. 9, p. 1261-69, 2011.
- CHOPDAR, A; CHAKRAVARTHY, U; VERMA, D. Age related macular degeneration. **British Journal of Medicine**, v. 326, n. 1, p. 485-8, 2003.
- CONLEY, S. M.; NAASH, M. I. Nanoparticles for retinal gene therapy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 25, n. 5, p. 376-97, 2010.
- CYPEL, Marcela Colussi et al. Achados oculares em pacientes com mais de 99 anos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 5, p. 665-9, 2006.
- DAMICO, Francisco Max. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 547-53, 2007.
- DEHGHAN, M.; MOUZAM M. Advances in iontophoresis for drug delivery. **International Journal of Health Research**, v. 1, n. 3, p. 115-27, 2008.
- DONOSO, L. A.; VRABEC, T.; KUIVANIEMI, H. The role of complement factor H in age-related macular degeneration: a review. **Survey of ophthalmology**, Plymouth, v. 55, n. 3, p. 227-45, 2010.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS. J. B. **Cell and Tissue Culture for Medical Research**, New York, Willey-Liss, 2000, 468 p.
- EL SANHARAMI, M. et al. Protein delivery for retinal diseases: From basic considerations to clinical applications. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 6, p. 443-65, 2010.
- ENG, Kenneth T.; KERTES, Peter J. Ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. **Clinical Interventions in Aging**, Treviso, v. 1, n.4, p. 451-66, 2006.
- FARAH, Michel Eid et al. Degeneração macular relacionada à idade: modalidades terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 64, n. 6, p. 583-8, 2001.
- FERRARA, Napoleone et al. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Retina**, v. 26, n. 8, 859-70, 2006.
- FERREIRA, Marcos Antônio et al. Estudo histopatológico da retina de coelhos após injeção intravítrea de lidocaína. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 49-52, 2002.
- FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. S. Iontoforese no transporte ocular de drogas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 5, p. 839-45, 2004.
- FIALHO, S. L.; CUNHA JUNIOR, A. S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 173-9, 2007.

FLETCHER, Emily C. et al. Computerized model of cost-utility analysis for treatment of age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 115, n. 12, p. 2192-8, 2008.

FREITAS, João Alberto Holanda de. **Oftalmologia Básica**. Rio de Janeiro: Colina, 1990. 284 p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5. ed. New Jersey, Wiley-Liss, 2005. 672 p.

FUNK, Marion et al. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 116, n. 12, p. 2393-99, 2009.

GALERA, Paula Diniz et al. Avaliação clínica e histopatológica do bulbo do olho de cães, após aplicação de flunixin meglumine por via subconjuntival. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 12, n. 1/3, p. 27-32, 2005.

GAUDANA, Ripal et al. Recent perspectives in ocular drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1197-216, 2009.

GAUDREAULT, Jacques et al. Pharmacokinetics and retinal distribution of Ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. **Retina**, v. 27, n. 9, p. 1260-66, 2007.

GAUDREAULT, Jacques et al. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 2, p. 726-33, 2005.

GIANELLI, Marco et al. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 308-17, 2008.

GIATTI, L.; BARRETO, S. M. Saúde, trabalho e envelhecimento no Brasil, **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 759-71, 2003.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 632 p.

HAGIGIT, Tal et al. Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 297-305, 2010.

HEIER, Jeffrey S. et al. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 124, n. 11, p. 1532-42, 2006.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4/5, p. 271-6, 2001.

HO, Q. T.; KUO, C. J. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1349-57, 2007.

HUSAIN, Deeba et al. Safety and efficacy of intravitreal injection of ranibizumab in combination with verteporfin PDT on experimental choroidal neovascularization in the monkey. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 123, n. 4, p. 509-16, 2005.

- IP, Michael S. et al. Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 115, n. 10, p. 1837-46, 2008.
- IU, L. P. L.; KWOK, A. K. H. An update of treatment options for neovascular age-related macular degeneration. **Hong Kong Medical Journal**, Hong Kong, v. 13, p. 460-70, 2007.
- JAVITT, J. C.; ZHOU, Z.; WILLKE, R. J. Association between vision loss and higher medical care cost in medicare beneficiaries. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 114, n. 2, p. 238-45e1, 2007.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 528 p.
- KAISER, P. K. et al. Angiografic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, Baltimore, v. 114, n. 10, p. 1868-75e4, 2007.
- KAISER, Peter K. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. **American Journal of Ophthalmology**, Jacksonville, v. 142, n. 4, p. 660-8, 2006.
- KIM, Judy E. et al. Short-term Intraocular Pressure Changes Immediately After Intravitreal Injections of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents. **American Journal of Ophthalmology**, Jacksonville, v. 146, n. 6, p. 930-4.e1, 2008.
- KOURLAS, H.; ABRAMS, P. Ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 1850-61, 2007.
- LAUDE, Augustinus et al. Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, n. 6, p. 466-75, 2010.
- LAVINSKY, Daniel et al. Terapia anti-VEGF e corticóides: uso atual e sistema de liberação controlada. **Revista da Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo**, Porto Alegre, v. 21, p. 14-8, 2010.
- LUCENA, E. G.; MILLER, J. W. Benzoporphyrin (Verteporfin) photodynamic therapy for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 63, n. 6, p. 511-8, 2000.
- MACKY, Tamer A et al. Part II: Toxicity to intraocular structures after phacoemulsification in rabbit model. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, p. 556-62, 2003.
- MAGUIRE, Maureen G. et al. Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 115, p. 741-7, 1997.
- MANZANO, Roberta Pereira de Almeida et al. Testing intravitreal toxicity of rapamycin in rabbit eyes. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 18-22, 2009.

MARBACK, Roberta Ferrari et al. Quality of life in patients with age-related macular degeneration with monocular and binocular legal blindness. **Clinics**, São Paulo, v. 62, n. 5, p. 573-8, 2007.

MELLO FILHO, Paulo Augusto de Arruda et al. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 294-9, 2010.

MELLO, P. R. A. A. P.; ROMA, A. C.; MORAES JÚNIOR, H. V. Análise da qualidade de vida de portadores de uveítes de causas infecciosas e não infecciosas pelo questionário NEI-VFQ-25. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 847-54, 2008.

MITCHEL, P. et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. **British Journal of Medicine**, v. 94, n. 1, p. 2-13, 2010.

NEHEMY, Marcio Bittar. Degeneração macular relacionada à idade: novas perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 6, p. 955-8, 2006.

OLIVEIRA NETO, Hermelino Lopes de et al. Estudo da retina de coelhos após injeção intravítrea de bupivacaína. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 4, p. 451-5, 2002.

OSHIMA, Akiyoshi et al. Avaliação da função macular por eletrorretinografia focal e por angiofluoresceinografia em pacientes com degeneração macular relacionada à idade neovascular submetidos à terapia fotodinâmica com verteporfirina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 23-7, 2009.

PESCINA, S et al. Effect of formulation factors on trans-scleral iontophoretic and post-iontophoretic transports of a kDa dextran in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 503-8, 2011.

PEZZUTTI, Simone et al. Politetrafluoroetileno e esclera humana no tratamento cirúrgico de perfuração escleral em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 64, n. 6, p. 563-7, 2001.

PIZARRO, Shelly A. et al. High-yield expression of human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *Escherichia coli* and purification for therapeutic applications. **Protein Expression and Purification**, v. 72, p. 184-93, 2010.

POLO, Jhony de et al. Satisfação do paciente com degeneração macular relacionada à idade após terapia térmica transpupilar. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 255-8, 2004.

PROMEGA CORPORATION. Technical Bulletin nº 169: Cell titer 96[®] aqueous non-radioactive cell proliferation assay. Disponível em: <http://www.promega.com/products/cell-health/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay- mts /> . Acesso em 01 abril. 2011.

RATNER, A.; NATHANS, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. **Neuroscience**, v. 7, p. 860-72, 2006.

REGATIERI, Caio et al. Anticorpos monoclonais em oftalmologia: realidades e perspectivas para retina e vítreo. **Revista da Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo**, Porto Alegre, v. 21, p. 5-10, 2010.

RIBEIRO, Jefferson Augusto Santana et al. Alterantive technique for reducing compound waste during intravitreal injections. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 5, p. 641-4, 2009.

RODRIGUES, Eduardo Büchele et al. Implantes eletrônicos para restabelecimento da visão em cegos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 359-69, 2004.

RODRIGUES, Eduardo Büchele et al. Técnica para injeção intravítrea de drogas no tratamento de doenças vítreoretianas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 71, n. 6, p. 902-7, 2008.

RODRIGUES, Eduardo Büchele et al. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 5, p. 756-65, 2006.

SANTOS, Laura Patrícia Ferreira et al. Degeneração macular relacionada à idade: prevalência e fatores de risco em dois centros oftalmológicos de referência em Pernambuco. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 229-33, 2005.

SERRACARBASSA, Pedro Durães. Vitaminas e antioxidantes na degeneração macular relacionada à idade. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 443-5, 2006.

SHORT, Brian G. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 49-62, 2008.

SINGH, R. P.; KAISER, P. K. Role of ranibizumab in management of macular degeneration. **Indian Journal of Ophthalmology**, Mumbai, v. 55, n. 6, p. 421-5, 2007.

SIQUEIRA, Rubens Camargo. Transplante Autólogo do epitélio pigmentado da retina na degeneração macular relacionada com a idade. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 123-30, 2009.

SPITZER, Martin S. et al. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cell. **Graef's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 245, n. 12, p. 1837-42, 2007.

STEFÁNSSON, E.; GEIRSDÓTTIR, A.; SIGURDSSON, H. Metabolic physiology in age related macular degeneration. **Progress in Retinal and Eye Research**, Reykjavík, v. 30, n. 1, p. 72-80, 2010.

TOLENTINO, Michael. Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. **Survey of ophthalmology**, v. 56, n. 2, p. 95-113, 2011.

TOLOSA, Erasmo Magalhães Castro de et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**, 1. ed. São Paulo: Manole, 2003. 341 p.

TORRES, Rogil José de Almeida et al. Fatores modificáveis de degeneração macular relacionada a idade. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 406-12, 2009.

VAN WIJNGAARDEN, P.; QURESHI, S. H. Inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the management of neovascular age-related macular degeneration: a review of current practice. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 91, n. 5, p. 427-37, 2008.

VERAS, Renato. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 548-54, 2009.

WAISBOURD, Michael et al. Targeting Vascular Endothelial Growth Factor. **Drugs Aging**, v. 24, n. 8, p. 643-62, 2007.

WILLIAMS, Rebecca A. et al. The psychosocial impact of macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 116, p. 514-20, 1998.

WONG, D; DURNIAN, J. M. Surgical treatment of age-related macular degeneration: will there be a role in the future?. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 35, p. 167-73, 2007.

YAMADA, Yoshihisa et al. Long-term follow-up of full macular translocation for choroidal neovascularization. **American Journal of Ophthalmology**, Jacksonville, v. 149, n. 3, p. 453-7, 2010.

YANG, Xiong-Li. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Progress in Neurobiology**, v. 73, p. 127-50, 2004.

CRUZEIRO DO SUL

FATOS E OPINIÕES

SOROCABA • TERÇA-FEIRA • 6 DE JULHO DE 2010

Artigo

Longevidade e visão

Humberto Cenci Guimarães

O desenvolvimento das ciências médicas e biológicas almeja o prolongamento da vida e para que se tenha qualidade nestes anos adicionais, é essencial que se evite a evolução das doenças crônicas que de forma direta ocasionam a perda da autonomia e da capacidade de decisão sobre os nossos interesses.

O principal fator de risco nas doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento está na própria idade. Devido às políticas públicas na área da saúde, o Brasil começou a apresentar uma redução nos índices de nascimentos e de mortalidade da população adulta e idosa, levando a um envelhecimento da população economicamente ativa, em especial, das mulheres. Tais mudanças exigem do poder público, investimentos mais altos na execução de exames periódicos, cuidados constantes e medicação contínua.

O envelhecimento é uma fase natural, que pode significar satisfação ou, dependendo da perda de capacidade de locomoção ou de relacionamento com o mundo, pode ser o estágio mais negativo da vida. As doenças crônicas mais comuns são hipertensão arterial, artrite ou reumatismo, doenças do coração e patologias relacionadas à visão.

A diminuição da quantidade e da qualidade da visão leva a limitações da parte motora pelo aumento do risco de acidentes, podendo gerar dependência física ou mental, ocasionando dificuldades emocionais e aumentando, em muito, o risco de mortalidade.

A catarata, o glaucoma, a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia diabética são, em ordem decrescente, as causas mais comuns de deficiência visual.

A catarata é a principal causa de deficiência visual na atualidade, sendo uma patologia muito presente na população com idade avançada, podendo existir também na infância, e é causada pela perda de transparência do cristalino, cuja função é semelhante a uma lente objetiva de uma câmera fotográfica. O tratamento da catarata é cirúrgico, eficiente, e de bom prognóstico.

O glaucoma não é simplesmente pressão alta no olho, como se diz popularmente, e sim uma doença do nervo óptico que pode estar associada a um aumento de pressão intraocular causando, a perda progressiva do campo de visão periférica e levando à cegueira completa, caso não seja diagnosticada precocemente e tratada.

Hoje, sua evolução é bastante favorável, pois existe um arsenal terapêutico eficiente, permitindo que a patologia seja controlada.

As doenças crônicas mais comuns são hipertensão arterial, artrite ou reumatismo, doenças do coração e patologias relacionadas à visão

A retinopatia diabética é causada por um quadro de falta de oxigenação da retina, que leva à formação de novos vasos, estes com anatomia anormal geram sangramentos que de forma repetida, podem evoluir para um descolamento de retina e cegueira total. Esta é uma patologia relacionada ao tempo de evolução da doença; à predisposição genética para que a retinopatia

diabética se desenvolva de forma mais ou menos agressiva; e ao controle glicêmico, sendo que alguns pacientes apesar de realizarem o acompanhamento da doença, continuam a ingerir o açúcar livre, de forma direta ou indireta na sua alimentação. Realizado o diagnóstico, o tratamento é feito através da fotocoagulação a laser.

A degeneração macular relacionada à idade é causada por processos degenerativos no tecido retiniano, fazendo com que ocorra falta de oxigenação deste tecido e a formação de neovasos. Devido a sua anatomia falha, os neovasos apresentam áreas de vazamento, evoluindo para edema do tecido retiniano que, ao cicatrizar, leva à morte dos fotorreceptores, que são os responsáveis pela formação das imagens na retina, causando a perda da capacidade laborativa, devido à perda da visão central. Embora não leve à cegueira total, evolui para cegueira legal, impossibilitando atividades básicas como ler, escrever, cozinhar, dirigir e reconhecer a face das pessoas.

Os fatores de risco para degeneração macular relacionada à idade são a idade avançada, características caucasianas, tabagismo, hipertensão arterial, diagnósticos de hipercolesterolemia e aterosclerose, pós-cirurgia de catarata, dieta pobre em vitaminas, falta de atividade física, obesidade, consumo de álcool e exposição à radiação solar.

Um fator complicador dessa patologia está relacionada ao tempo de evolução, pois, no Brasil, muitas vezes o diagnóstico é feito já num estágio avançado da doença, o que compromete o prognóstico visual. A Terapia Antiangiogênica é, atualmente, o melhor tratamento para degeneração macular relacionada à idade, em fase ativa, podendo ser feita com o uso de fatores de inibição de proliferação vascular ou com o uso de corticosteróides, através da injeção desses medicamentos no vítreo, ou seja, dentro do olho.

A qualidade de vida deve andar junto com a quantidade de anos conquistados, e a expectativa é que, com a evolução tecnológica na oftalmologia, possamos proporcionar à população com idade mais avançada, resultados mais promissores na prevenção e tratamento dessas patologias que são as principais causas de cegueira no mundo.

Humberto Cenci Guimarães é médico oftalmologista, professor assistente voluntário no Centro de Ciências Médicas e Biológicas FUC/SP e aluno do Mestrado em Ciências Farmacéuticas da Uniso, orientando da professora doutora Marli Geronutti. (humbertocenci@ig.com.br)



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de Outubro de 2010.
CEP 1436/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) PATRICIA SANTOS LOPES
Co-Investigadores: Humberto Cenci Guimarães; Marli Gerenutti (orientadora)
Disciplina/Departamento: Controle Biológico e Microbiológico de Medicamentos e Cosméticos da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Avaliação da segurança do Ranibizumabe (Lucentis®) utilizando modelos experimentais in vivo e in vitro”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental in vitro e in vivo (coelhos New Zealand).

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os possíveis efeitos do Ranibizumabe sobre o sofrimento celular em modelos in vivo e in vitro.

RESUMO: Modelo in vitro, será realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, Cidade Universitária, São Paulo. Serão semeadas células, cultivadas e incubadas em meio específico e após 24 horas de incubação, serão deixados 6 poços para controle e adicionadas às células diferentes concentrações do Ranibizumabe e incubadas novamente por 24 horas. A determinação da proliferação celular será realizada pelo método colorimétrico, onde o corante MTS na presença de enzimas desidrogenases das células viáveis são biorreduzidas formazana.

O modelo in vivo, serão utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, criados nos Biotérios da Faculdade de Medicina de Sorocaba, PUC/SP, machos, com peso aproximado de 1,750g, de 4 meses. Os animais serão anestesiados com xilasina e ketamina por via intramuscular. Depois de anestesiados, serão submetidos à injeção intravítrea, os dois olhos (um controle e um experimental) utilizando-se agulha com 30 gauges. Aos dez olhos experimental (olho direito) serão administrados 0,05mL de Ranibizumabe e nos dez olhos controle (olho esquerdo) serão administrados 0,05 solução salina na pars plana a 1mm posterior ao limbo no quadrante temporal com a agulha direcionada ao centro do olho. No pós-operatório será administrado colírio contendo tobramicina 3mg, dexametasona 1mg, 3 vezes ao dia por 1 semana e ciclopentolato colírio 1 vez ao dia por 1 semana. Os animais serão mantidos, e após abatidos no 30º dia pós injeção intravítrea, tempo necessário para eliminação do ranibizumabe do interior do olho, com uso de injeção endovenosa de pentobarbital. Os 20 olhos destes animais serão enucleados e fixados em parafina para análise histológica e corados pelas técnicas de HE.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Serão utilizados os modelos experimentais, como forma de avaliar se o Ranibizumabe (inibidor da VEGF A) é capaz de causar sofrimento celular no tecido retiniano normal em coelhos da Nova Zelândia, modelo in vivo, e se existe citotoxicidade com a determinação do IC50 e IC10 do Ranibizumabe frente às células de fibroblastos murinos, in vitro..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais que serão realizados.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 47 249,00.

CRONOGRAMA: 24 Meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 26/09/11 e 25/09/12.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1436/10



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO RANIBIZUMABE UTILIZANDO ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VIVO E IN VITRO

participou do 36º Congresso da SBRV - Sociedade Brasileira de Retina e Vítreo, realizado no Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil Camilo, em Campo Grande - MS, de 20 a 22 de abril de 2011, na qualidade de **PÔSTER**

Autores: HUMBERTO CENCI GUIMARÃES, NATÁLIA MENCACCI ESTEVES-PEDRO, NELSON BRANCACCIO SANTOS, PATRÍCIA SANTOS LOPES, MARLI GERENUTTI

Campo Grande, 22 de abril de 2011.

Proteção e Patenteado



Apelo



CONSELHO BRASILEIRO DE OFTALMOLOGIA

Alvaro H. Hilgert
Presidente do Congresso

Mario Martins dos Santos Motta
Presidente da SBRV