**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CARINA COSTA COTRIM

**Uso intravítreo de fração mononuclear da medula
óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes
portadores de degeneração macular relacionada com
a idade na forma atrófica**

RIBEIRÃO PRETO

2016

CARINA COSTA COTRIM

Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cotrim Carina Costa

Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica. Carina Costa Cotrim / Orientador: Rubens Camargo Siqueira. Ribeirão Preto, 2016.

114p.: 33il.; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

1. DMRI. 2. Células tronco. 3. Células hematopoiéticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Carina Costa Cotrim

Título: Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Dedicatória

Aos meus pais, Ademar e Graça, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

Agradecimentos

As conquistas são frutos de dedicação, sonhos e, sem dúvida, da colaboração de pessoas especiais, que de forma direta ou não, nos ajudam a persistir até o fim. Portanto, preciso aqui deixar registrados meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira, idealizador e orientador deste estudo. Agradeço por passar todo encantamento pela pesquisa, por sonhar com um futuro melhor para os nossos pacientes da retina. Sinto-me honrada por ser sua orientanda e agradeço a oportunidade.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge e Dr. Felipe Almeida, pela oportunidade de fazer parte da equipe da Retina do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Esses anos foram muito importantes na minha vida profissional e também possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. André M. Vieira Messias, fundamental nesta pesquisa. Pessoa incrível e de conhecimento vasto. Colaborou muito, não só nas análises estatísticas, mas também nas críticas e nos conselhos.

Aos meus eternos amigos da retina do HCFMRP-USP, em especial à Monique de Souza Viana, pelo apoio emocional e por ter se tornado uma irmã. Também agradeço à Monique e minha amiga Luiza Toscano, por contribuírem na parte prática deste estudo.

A todos os funcionários do Ambulatório de Oftalmologia do HCFMRP-USP, em especial à Lucélia Albieri e Elizete Maia Gonçalves, que fazem além da sua função em prol da pesquisa. Excelentes profissionais!

Aos voluntários, que aceitaram fazer parte deste estudo, pois sem eles nada teria sido possível.

Aos colegas do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, em especial à Maria Cecília Onofre, pela sua dedicação e competência.

Aos funcionários do Setor de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP, pelo trabalho sério e fundamental colaboração.

À Dra Cláudia Nascimento, ao Dr. Ernani Garcia e ao Dr. Gabriel Puel, que me acolheram e primeiro deram a oportunidade de exercer a minha profissão em Florianópolis, permitindo honrar o meu dever e me realizar profissionalmente.

Aos meus familiares do Sul, meus sogros Nelson e Edi Alovise, minha cunhada Nelise e meu Sobrinho Leonardo, por me acolherem tão bem neste momento de muitas mudanças.

Aos meus amigos Fauner e Ana Paula Cavan, por estarem sempre presentes.

Aos meus pais, Maria das Graças e Ademar Cotrim, pela dedicação excepcional aos filhos e por me fazerem acreditar nos meus sonhos. Sem dúvidas, tudo o que conquistei devo a vocês.

À minha irmã, Carolina Cotrim, e ao meu cunhado, Luciano Pereira, por serem meus exemplos na vida acadêmica e por estarem sempre presentes.

Aos meus sobrinhos Livia e Heitor, por me trazerem a leveza e alegria da infância.

Ao meu esposo Luiz Fernando Alovise, pelo amor, pela paciência e por tantos momentos de felicidade e paz.

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Bolsa).

Epígrafe

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Resumo

COTRIM, C.C. **Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD 34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica**. 2016. 114f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2016.

Objetivos: Avaliar o potencial terapêutico e a segurança do uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica. **Casuística e Métodos:** Foram avaliados 10 pacientes com degeneração macular relacionada à idade (DMRI) seca e acuidade visual no pior olho $\leq 20/100$. Foi obtido aspirado da medula óssea de todos os pacientes, e após o processamento do material no hemocentro, foi injetado 0,1 ml da suspensão de FMMO intravítreo no olho com pior acuidade. Os pacientes foram avaliados no *baseline*, 1, 3, 6, 9 e 12 meses após a injeção. Todos realizaram medida da melhor acuidade visual corrigida (MAVC), microperimetria, eletroretinografia multifocal (ERGmf), autofluorescência, Tomografia de coerência óptica (OCT) e responderam o questionário VFQ-25 em todos seguimentos. Também foi realizada angiografia fluoresceínica antes da injeção, seis e doze meses após. **Resultados:** Todos os pacientes completaram o seguimento de seis meses, e seis finalizaram os doze meses. Antes da injeção, a média da MAVC foi de 1,18 logMAR ($20/320^{-1}$); variando de 20/125 a $20/640^{-2}$. Aos doze meses, a média foi de 1,0 logMAR (20/200), com melhora significativa em todos os meses de seguimento. A média do limiar de sensibilidade na microperimetria mostrou melhora significativa a partir do sexto mês ($p=0,009$). Ao se dividirem os pacientes com área de atrofia maior e menor, por meio da medida da hipoautofluorescência, observou-se que a melhora foi significativa apenas no grupo de menor atrofia. Não houve diferença significativa na ERGmf. A angiofluoresceinografia não apresentou crescimento de neovasos ou tumores. O questionário de qualidade de vida mostrou diferença significativa na saúde mental ($p=0,003$) e na visão de cores ($p=0,005$) e forte tendência à significância na análise que abordou a visão geral ($p=0,05$) e dependência ($p=0,067$). Houve declínio em relação à saúde geral ($p=0,77$). **Conclusões:** Os resultados indicam que o uso de FMMO intravítreo em pacientes com DMRI é seguro e está associado à melhora da acuidade visual e microperimetria. Pacientes com área menor de atrofia têm melhor resposta. Não é possível afirmar, mas acredita-se no resgate funcional das células em sofrimento, que ainda não se degeneraram.

Palavras-chave: DMRI, Células tronco, Células hematopoiéticas.

Abstract

COTRIM, C. C. **Intravitreal use of a bone marrow mononuclear fraction (BMMF) containing CD 34+ cells in patients with the atrophic form of age-related macular degeneration.** 2016. 114f. Master's (Thesis) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2016.

Objectives: To assess the therapeutic potential and safety of the intravitreal use of a bone marrow mononuclear fraction (BMMF) containing CD 34+ cells in patients with the atrophic form of age-related macular degeneration (AMD).

Casuistic and Methods: The study was conducted on 10 patients with the atrophic form of ARMD with worse eye visual acuity $\leq 20/100$. Bone marrow was aspirated from each patient under local anesthesia. After processing and separation of mononuclear cells, 0.1 ml of the suspension was injected intravitreally into the eye of lower acuity. The patients were evaluated at baseline and 1, 3, 6, 9 and 12 months after the injection. All were submitted to measurement of best corrected visual acuity (BCVA), microperimetry, multifocal electroretinography (ERGmf), autofluorescence, and optical coherence tomography (OCT) and all responded to the VFQ-25 questionnaire at all follow-up visits. Fluorescein angiography was performed before the injection and six and 12 months later. **Results:** All patients completed the six month follow-up and six completed the 12 month follow-up after the injection. Before the injection, mean BCVA was 1.18 logMAR ($20/320^{-1}$), ranging from $20/125$ to $20/640^{-2}$ and at 12 months it was 1.0 logMAR ($20/200$), with a significant improvement over all follow-up months. Mean perimetric threshold sensitivity improved significantly starting at the sixth month ($p=0.009$). When the patients with a larger area of atrophy measured by hypoautofluorescence were considered separately, a significant improvement was observed only in the group with lower atrophy. There was no significant difference in electroretinography. Angiofluoresceinography did not reveal neovessel or tumor growth. The quality of life questionnaire showed a significant difference in mental health ($p=0.003$) and color vision ($p=0.005$), and a strong tendency in the analysis of general vision ($p=0.05$) and dependence ($p=0.067$). There was a decline in general health ($p=0.77$). **Conclusions:** The results indicate that the use of intravitreal BMMF in patients with AMD is safe and is associated with improved visual acuity and microperimetry. Patients with a smaller atrophy area obtained a better response. The paracrine effect of these cells may explain the functional improvement observed in the present study; however, a larger series should be study to confirm these clinical findings.

Key-words: AMD, Stem cells, Hematopoietic cells.

Lista de Figuras

Figura 1:	Retinografia colorida do olho esquerdo demonstrando drusas.....	27
Figura 2:	Imagem em <i>infrared</i> mais tomografia de coerência óptica do paciente em estudo, demonstrando elevação do EPR por drusa (seta amarela).....	28
Figura 3:	Estratificação de risco para evolução para doença avançada em cinco anos. (Fonte: Alezzandrini et al., 2012)	30
Figura 4:	Células do EPR derivadas de células embrionárias. (A) colônias de células embrionárias indiferenciadas. (B) células pigmentares aparecem em 1-2 semanas. (C e D) a cultura do EPR se expande e mostra marcadores característicos desse tipo de célula. A presença de células binucleadas é uma característica do EPR maduro de mamíferos. (Fonte: Vugler et al., 2007).....	38
Figura 5:	Imagem de <i>infrared</i> do olho esquerdo no <i>baseline</i> em estudo	53
Figura 6:	Imagem de autofluorescência do paciente em estudo.....	54
Figura 7:	Imagem angiográfica na fase de recirculação do olho direito no <i>baseline</i>	55
Figura 8:	Exemplo de OCT normal com as denominações presumidas das camadas visíveis (imageck.com).....	56
Figura 9:	Exame de OCT mostrando características típicas da DMRI como elevações arredondadas do EPR hiperreflectivas compatíveis com drusas, atrofia do EPR e camadas retinianas externas na região macular.....	57
Figura 10:	Protocolo de aquisição da OCT	57
Figura 11:	Representação do ERGmf com estímulo de 61 hexágonos. (Fonte: Hood et al., 2012)	59
Figura 12:	Diagrama evidenciando a resposta do ERGmf e as características de suas ondas. (Fonte: Hood et al., 2012)	60
Figura 13:	Mapa de respostas da ERGmf. (A) As respostas elétricas. (B) O mapa tridimensional, em que a altura e a cor das células são proporcionais à densidade das respostas, ou seja, amplitude dividida pela área do hexágono; e essa grandeza pode ser correlacionada com a densidade de cones na retina	60
Figura 14:	Imagem à esquerda representa em cores os cinco anéis concêntricos. Para cada anel, foram calculadas as ondas N1 e	

	P1 (Tabela à direita). No protocolo, foi utilizada a média das ondas P1 em nanovolt (nV).....	61
Figura 15:	Exame de microperimetria de olho direito. (A) Imagem em <i>infrared</i> do fundo de olho, (B) medida 36 pontos de sensibilidade em decibéis	62
Figura 16:	Análise da microperimetria de um paciente com distribuição em decibéis.....	63
Figura 17:	Área das elipses formadas por meio dos pontos de fixação (bivariate contour ellipse área).....	64
Figura 18:	Esquematização da coleta da medula óssea na crista ilíaca posterior. (Fonte: http://www.chsp.org.br/?page_id=26)	66
Figura 19:	(A) Imagem mostrando a coleta da medula óssea; (B, C e D) Sequência de imagens mostrando separação de células mononucleares usando centrifugação por gradiente de Ficoll Hystopaque. (Fonte: Siqueira et al., 2010)	67
Figura 20:	Representação gráfica mostrando evolução da acuidade visual em logMAR em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p)	70
Figura 21:	Exame de <i>infrared</i> e o tamanho da área de atrofia do paciente #1, à esquerda, e #4, à direita	72
Figura 22:	Representação gráfica mostrando evolução da média da amplitude da onda P1 na ERGmf em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).....	73
Figura 23:	Representação gráfica mostrando evolução da média do limiar de sensibilidade na microperimetria em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).....	74
Figura 24:	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de três pacientes(#1, #2, #3) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.....	75
Figura 25:	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de dois pacientes (#4, #5,) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada	

	imagem, a acuidade visual pela tabela de snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.....	76
Figura 26:	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de três pacientes(#6, #7, #8,), na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.....	76
Figura 27:	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de dois pacientes(#9, #10) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.....	77
Figura 28:	Microperimetria do paciente #9, pré-injeção, e um e seis meses após	78
Figura 29:	Representação gráfica mostrando a evolução do BCEA (microperimetria) em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p)	78
Figura 30:	Representação gráfica dos doze subdomínios analisados pelo questionário VFQ-25, comparando os resultados pré-injeção e seis meses após	79
Figura 31:	Representação gráfica da correlação da acuidade visual aos seis meses, com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 ($p=0,03$).....	80
Figura 32:	Representação gráfica da correlação da média no limiar de sensibilidade aos seis meses, com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 ($p=0,005$).....	80
Figura 33:	Representação gráfica da correlação entre o tamanho da área de hipoafluorescência , com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 em seis meses após IV ($p=0,005$).....	81

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Resumo dos últimos estudos clínicos realizados para DMRI seca. (Adaptada de Taskintuna et al., 2016).....	36
Tabela 2 -	Acuidade visual medida antes da injeção IV e três meses após. Descrição do número de letras ganhas por paciente (paciente #1 ao #10)	71
Tabela 3 -	Resultado da microperimetria nos dez pacientes estudados. Em vermelho, destacam-se os pacientes que melhoraram a média do limiar de sensibilidade no primeiro e sexto meses, comparados com o <i>baseline</i>	74

Lista de Siglas e Abreviaturas

AG-	Atrofia geográfica
AREDS-	<i>Age Macular Eye Disease Study</i>
asb-	<i>apostilb</i>
AT-	<i>Average threshold</i>
AV-	Acuidade visual
B12-	Cianocobalamina
B6-	Piridoxina
B9-	Ácido folínico
CD34-	<i>Cluster of Differentiation 34</i>
CHMO-	Células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea
CPEs-	Células progenitoras endoteliais
dB-	Decibéis
DHA-	Ácido Docosaexaenoico (do inglês Docosaexaenoico Acid)
DMRI-	Degeneração macular relacionada à idade
DNA-	Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
BCEA-	<i>Bivariate contour ellipse area</i>
EGF-	<i>Epidermal growth factor</i>
EPR-	Epitélio pigmentar da retina
EPCs-	Células progenitoras da medula óssea
ERG-	Eletrorretinograma
ERGmf-	Eletrorretinografia multifocal
ESC-	Células tronco embrionárias (do inglês Embryonic Stem Cells)
ETDRS-	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
FGF-2-	Fator de crescimento de fibroblasto

FMMO-	Fração mononuclear da medula óssea
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDL-	<i>Hight density lipoproteins</i>
HGF-	Fator de crescimento de hepatócitos
HSC-	Células tronco hematopoiéticas (do inglês Hematopoietic stem cell)
IBGE-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC-	Intervalo de confiança
IL-	Interleucina
iPS-	Células tronco pluripotentes induzidas (do inglês Induced pluripotent stem cells)
IR-	<i>Infrared</i>
IV-	intravítreo
LED-	<i>Light emitting diode</i>
Lin-	Linhagem negativa
Lin+-	Linhagem positiva
MAVC-	Melhor acuidade visual corrigida
MB-	Membrana de Bruch
MLI-	Membrana limitante interna
MSC-	Células mesenquimais (do inglês Mesenchymal stem cell)
NEI-	<i>National Eye Institute</i>
nV-	Nanovolt
OCT-	Tomografia de coerência óptica (do inglês Optical coherence tomography)
PAP-	Perimetria automatizada

PDGF-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE 1-	Prostaglandina E1
POS-	Potencial Oscilatório
PRL-	Local preferido pela retina (do inglês Preferred retinal locus)
PVPI-	Iodopovidona
RN66-	Anticorpo monoclonal humano
RP-	Retinose pigmentar
RPC-	Células progenitoras da retina (do inglês retina progenitor cells)
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFα-	Fator alfa de necrose tumoral
VEGF-	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular endothelial grow factor)
VFQ-25-	<i>Visual Function Questionnaire</i>
VVPP-	Vitrectomia via <i>pars plana</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. CAUSÍSTICA E MÉTODOS	48
3.1. Casuística	49
3.2. Considerações éticas	49
3.3. Critérios de inclusão	50
3.4. Critérios de exclusão	50
3.5. Exclusão de pacientes do estudo	51
3.6. Avaliações clínicas	51
3.6.1. MAVC.....	51
3.6.2. Exame oftalmológico	51
3.6.3. Angiofluoresceinografia	52
3.6.4. Tomografia de coerência óptica (OCT).....	55
3.6.5. Eletroretinograma (ERG).....	58
3.6.6. Microperimetria (MAIA Centervue- Itália).....	61
3.6.7. Questionário de qualidade de vida; NEI- VFQ-25	64
3.6.8 Coleta do material	65
3.6.9. Processamento das células.....	66
3.6.10 Injeção intravítrea	67
3.7. Análise estatística	68
4. RESULTADOS	69
4.1. Acuidade visual.....	70
4.2. Angiofluoresceinografia, <i>infrared</i> e autofluorescência	71
4.3. Tomografia de coerência óptica	72
4.4. Eletroretinografia multifocal	72
4.5. Microperimetria.....	73
4.6. Questionário de qualidade de vida; NEI- VFQ-25	79
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8. ANEXOS	105

1. Introdução

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é uma doença ocular degenerativa e incapacitante, padecendo de um tratamento preventivo e curativo efetivo (Centurion et al., 2004). A DMRI foi descrita primeiramente por Oeller, em 1903. Em 1926, Junius e Kunt apontaram-na como a principal causa de cegueira legal em pessoas com mais de 55 anos de idade (Ávilla, 2003). É uma doença de início tardio e multifatorial, que se caracteriza pela formação de depósitos extracelulares ricos em lipídios, inflamação localizada e neurodegeneração da parte central da retina, denominada mácula lútea (Akuffo et al., 2015). Sua principal manifestação é a perda progressiva e irreversível da visão central em indivíduos acima de 50 anos de idade (Fritsche et al., 2014; Khan et al., 2014; Mavija et al., 2014), afetando mundialmente 8,7% dos idosos (Cascella et al., 2014), com estimativa de 196 milhões em 2020, e 288 milhões em 2040 (Wong et al., 2014).

No Brasil, são escassos os estudos epidemiológicos sobre a DMRI. Medina (1997) relatou prevalência de 13,9% em idosos moradores da cidade de São Paulo. Já Klein et al. (2007) detectaram 15,1% de casos em 478 descendentes de japoneses no Paraná.

A prevalência da DMRI varia entre os diferentes grupos étnicos, entretanto todas as formas da doença destacam-se em populações caucasianas (1,9% a 3,5%), comparadas a não brancos (0,19% a 1,4%) (Colak et al., 2012), sendo até nove vezes maior em brancos do que em afro-americanos (Friedman et al., 1999). Na população latino-americana, estudos mostram prevalência de 2,4% a 16,4% em indivíduos com idade superior a 50 anos (Furtado et al., 2012).

Estima-se que três milhões de brasileiros, acima de 65 anos, sofram de DMRI em variados estágios de evolução. O total de cegos no Brasil em 2011, baseando-se também no fator socioeconômico, era de 1.158.000. A cegueira aumenta exponencialmente em relação à idade e chega de 15 a 30 vezes maior na população maior que 80 anos quando comparada à de Taleb et al. (2012).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), a estrutura populacional, por grupos etários e sexo no Brasil, manteve em 2013 a tendência de envelhecimento (Ávila et al., 2015).

Tendo como referência a revisão das projeções da população brasileira até 2050, realizada pelo IBGE em 2008, nota-se que mantidas as tendências, em 2030 o número de idosos já superará o de crianças e adolescentes (menores de 15 anos de idade), em cerca de quatro milhões, diferença esta que aumenta para 35,8 milhões, em 2050 (64,1 milhões de idosos contra 28,3 milhões de crianças e adolescente) (Ávila et al., 2015).

Seguindo essa mesma linha de projeção, o Brasil será o sexto país com maior população maior que 60 anos em 2025, ficando atrás apenas de países como China, Índia, Rússia, Estados Unidos e Japão, respectivamente. Considerando apenas esse grupo etário de 60 anos ou mais, observa-se que este contingente populacional duplicará, em termos absolutos, no período de 2000 a 2020, ao passar de 13,9 para 28,3 milhões, elevando-se, em 2050, para 64 milhões (Taleb et al., 2012; Ávila et al., 2015). O envelhecimento da população brasileira traz consequências como o aumento da prevalência de patologias oculares como a DMRI, catarata e glaucoma. Essas doenças contabilizam as três principais causas de cegueira no Brasil (Ávila et al., 2015). Diante dessa realidade, faz-se necessária a busca por algum tipo de tratamento para a DMRI seca.

A patogênese da DMRI não é completamente esclarecida (AREDS2 et al., 2013). Os estudos sugerem que a oxidação e inflamação desempenham papéis importantes na sua patogênese. O ácido decosaheptaenoico (DHA) é um dos componentes estruturais principais da retina humana. A retina, em especial a mácula, vive em um ambiente altamente permissivo para o dano oxidativo devido a presença constante de luz e altas concentrações de oxigênio que oxidam esse importante ácido, gerando a lipofuscina, um pigmento amarelo-castanho que representa o material não digerido, que se acumula no citoplasma das células do epitélio pigmentar da retina (EPR) durante a vida, comprometendo a sua função como a fagocitose e consequente renovação dos segmentos externos dos fotorreceptores.

A membrana de Bruch (MB) tende a aumentar a sua espessura ao longo dos anos. Esse fato se deve a vários fatores, como a diminuição da atividade das metaloproteinases que catabolizam as proteínas da matrix extracelular. Ocorre

também diminuição da densidade coriocalilar com redução do *clearance* dos detritos. O acúmulo de detritos extracelulares alteram a composição da MB e sua permeabilidade, gerando um ciclo de destruição. Esse processo ocorre naturalmente com a idade, no entanto em pacientes com predisposição genética associada a fatores ambientais, é maior a sua magnitude.

As alterações da membrana basal do EPR afetam o movimento de moléculas entre a coriocalilar e o espaço sub-retiniano. Esse desequilíbrio também gera a formação de drusas. Há uma variedade de compostos que constituem as drusas, como vitronectina, apoliproteínas banda E, componentes amiloides e reagentes de fase aguda, que sugerem que o processo inflamatório pode ser um dos fatores desencadeantes da doença. As drusas são depósitos extracelulares de proteínas, lipofuscina, amiloide e lipídios (incluindo os componentes do complemento), que se formam entre a lâmina basal do EPR e a camada interna colagenosa da MB. São visualizados como pontos amarelados ao exame de fundoscopia e variam de tamanho, forma e localização (Kawa et al., 2014). O aparecimento das drusas é o sinal clínico visível mais precoce da DMRI (Figura 1).

Figura 1: Retinografia colorida do olho esquerdo mostrando as drusas.

As drusas são classificadas, morfologicamente, em duras ($<63\ \mu\text{m}$ de diâmetro) e moles ($>125\ \mu\text{m}$ de diâmetro com bordas indistintas) (Queiroz et al., 2010; Cougnard-Grégoire et al., 2014; Akuffo et al., 2015). A presença de poucas drusas duras não é, necessariamente, um fator de risco, podendo ser encontradas em pacientes com mais de 30 anos, entretanto em grande quantidade podem resultar em DMRI (Ferris et al., 2013). Assim, o tamanho e número de drusas podem ser correlacionados com a progressão da doença e utilizados como parâmetro na evolução da doença (Nowak et al., 2013). As drusas moles são depósitos na lâmina basal da MB, e à microscopia de luz aparecem como placas extensas em camadas de material granular mole. Deslocam, nesse caso, o EPR da superfície interna da MB (Figura 2) e interferem nas trocas metabólicas da coriocapilar e do EPR (Queiroz et al., 2010). O marco característico da DMRI é o aparecimento das drusas "moles" ou "indistintas".

Figura 2: Imagem em *infrared* da tomografia de coerência óptica do paciente em estudo, mostrando elevação do EPR por drusa (**seta amarela**).

No estudo *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS), os autores desenvolveram um sistema de classificação de fotografias estereoscópicas de

grande complexidade (medição de drusas e áreas com alterações de pigmentação) (Davis et al., 2005; Ferris et al., 2005).

Classificação AREDS:

- AREDS1: sem doença, sem alterações maculares, ou drusas escassas menores que 63 microns.
- AREDS2 Precoce: drusas intermediárias, de 63 a 124 microns, ou alterações de pigmentação.
- AREDS3 Intermédiária: abundantes drusas intermediárias, ou ao menos uma drusa grande (maior que 125 microns), ou atrofia geográfica (AG), que não compromete a fóvea.
- AREDS4 Avançada: uma ou mais AG, que compromete o centro da fóvea, neovascularização coroidal, descolamento seroso ou hemorrágico do EPR, ou cicatriz disciforme.

Posteriormente, essa classificação foi simplificada estratificando o risco de evoluir para doença avançada em cinco anos. É considerada a presença de drusas grandes e alterações pigmentares (Figura 3). Devem ser somados os fatores de risco para ambos os olhos (risco 0 a 4) (Alezzandrini et al., 2012).

0 fator de risco = 0,5%

1 fator de risco = 3%

2 fatores de risco = 12%

3 fatores de risco = 25%

4 fatores de risco = 50%

Figura 3: Estratificação de risco para evolução para doença avançada em cinco anos. (Fonte: Alezzandrini et al., 2012).

A classificação da DMRI em seca ou exsudativa é consequência de dois processos que causam disfunção nos fotorreceptores. A forma exsudativa ocorre com menor frequência (15%) do que a seca (85%), mas é responsável por dois terços de perda visual significativa (Siqueira et al., 2011; Kawa et al., 2014). A DMRI seca pode evoluir para AG, caracterizada por áreas bem delineadas de hipopigmentação ou de despigmentação devido a ausência ou atenuação do EPR subjacente. Nessas áreas, é possível observar os grandes e profundos vasos coroideanos. Seu mecanismo se deve ao espessamento da MB ao longo dos anos, acumulando depósitos extracelulares lipídicos e proteínas (drusas); dificultando, assim, a difusão de oxigênio e nutrientes às camadas externas da retina (Medina, 1997). Mecanismos para o desenvolvimento da AG incluem isquemia, senescência, danos oxidativos e foto-oxidativos e inflamação, seja diretamente ou por mecanismos apoptóticos (Siqueira et al., 2011; Schwartz et al., 2012). Já na DMRI exsudativa (também conhecida como neovascular), se observa o crescimento de novos vasos oriundos da coriocapilar abaixo do EPR, invadindo a retina, com alteração no balanço entre a produção de fatores que

estimulam a angiogênese como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF-2) e o fator alfa de necrose tumoral (TNF α), com os fatores antiangiogênicos (Aiello et al., 1994; Wong et al., 2008).

Esses neovasos friáveis e fenestrados permitem o extravasamento de fluidos, lipídios e sangue dentro e abaixo da retina, resultando na exsudação, hemorragia e, conseqüentemente, formação de tecido fibroso (denominado de cicatriz disciforme), que define o estágio final da doença, ocasionando a perda da visão central em pacientes com DMRI (Medina, 1997; Kawa et al., 2014). Os sintomas clínicos dessa doença incluem perda gradual da visão com presença de áreas borradas e escuras na visão central, distorção de imagens e linhas retas, além da diminuição da sensibilidade ao contraste. Desse modo, provoca impacto na qualidade de vida dos pacientes por comprometer as atividades cotidianas, como ler e dirigir (Queiroz et al., 2010; Cascella et al., 2014; Gopnath et al., 2014). Apesar de a etiologia não ter sido ainda determinada, evidencia-se que fatores ambientais e genéticos podem estar envolvidos (Veleri et al., 2015). Fatores associados à baixa quantidade de pigmento macular (luteína e zeaxantina) incluem idade, tabagismo e iris de cor clara. Um insulto oxidativo que resulta na morte de fotorreceptores da mácula poderia ser a gênese do processo (Khan et al., 2014).

Sabidamente, a idade avançada é o principal fator de risco para DMRI (Casaroli-Marano et al., 2014; Cheung; Wong, 2014; Wong et al., 2014). Dez por cento das pessoas com mais de 80 anos apresentam a forma tardia da doença (Muñoz et al., 2005; National Eye Institute, 2014).

O envelhecimento está associado ao aumento de danos no DNA e à deficiência dos mecanismos de reparação (Hoeijmakers, 2009). O estresse oxidativo é um importante mediador do efeito da idade. Sabe-se que a oxidação mitocondrial é prejudicada com o envelhecimento e os danos oxidativos são claramente observados (Lesnefsky; Hoppel, 2006). O tabagismo é um dos mais fortes fatores associados ao desenvolvimento de ambas as formas da doença, mesmo em pessoas expostas passivamente (Tomany et al. 2004; Lechanteur et

al., 2015). Essa associação foi comprovada em diversos estudos como o de Mansour et al. (2015). Acredita-se que o tabaco age na luteína da mácula, aumentando o estresse oxidativo e alterando a microcirculação da coroide (Bertram 2009). Indivíduos tabagistas têm 45% de chance de desenvolver DMRI inicial e apresentam progressão pior da doença em comparação com os não-fumantes (Klein et al., 2008). O álcool também pode estar associado ao desencadeamento da DMRI, apesar de haver controvérsias (Sancho-Tello et al., 2008; Adams et al., 2012). Alguns estudos mostram o aumento do risco, particularmente associado com o consumo excessivo de álcool (Klein et al., 2002; Chong et al., 2008; Ersoy et al., 2014); enquanto outros indicam diminuição do risco associado ao vinho (Obisesan et al., 1998).

Também é descrita a associação entre dislipidemia e DMRI, incluindo alterações no colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), e a relação do colesterol total/HDL (Keenan et al., 2014). O colesterol pode se depositar na MB e aumentar a resistência pós-capilar da rede vascular da coroide, causando resistência ao fluxo e aumento da pressão hidrostática, com vazamento e deposição de proteínas extracelulares e lipídeos, formando depósitos basais na MB e, consequentemente, drusas, primeira manifestação clínica da DMRI (Schmidt-Erfurth et al., 2008; Torres et al., 2009, 2014).

A genética também é um fator importante e determinante associado à DMRI, relacionada ao risco de até 71% de desenvolvimento da doença (Seddon et al., 2009; Spencer et al., 2011). Estudos com famílias têm mostrado risco relativo de aproximadamente seis a doze vezes maior para a doença em parentes de primeiro grau de indivíduos com a doença, comparado à população geral. Além disso, algumas famílias apresentam maior risco de recorrência do que outras (Klaver et al., 1998; Gorin, 2012).

Enquanto a terapia com anti-VEGF revolucionou o tratamento da degeneração macular exsudativa, atualmente, o único tratamento aprovado para a DMRI seca é baseado no AREDS. Esse estudo demonstrou que a suplementação oral diária com vitaminas e minerais antioxidantes reduziu o risco de desenvolver a doença avançada em 25% em cinco anos (AREDS2 et al., 2013b). O AREDS2 acrescentou a luteína e zeaxantina, removeu o betacaroteno

e diminuiu a dose de zinco, demonstrando menor progressão da doença em 20% em relação à fórmula inicial e também menor taxa de câncer de pulmão em pacientes tabagistas ou ex-tabagistas. A suplementação com omega-3 não mostrou diferença significativa na redução da progressão da doença. Apesar de a suplementação não deter a perda visual, reduz a evolução para estádios mais avançados (Siqueira et al., 2011). Assim, o tratamento da forma seca representa um desafio, pois não existe terapia aprovada disponível para esses pacientes. Conhecendo a patologia e suas limitações, muitos pesquisadores têm buscado alternativas terapêuticas, entre elas o uso de células tronco. Taskintuna et al. (2016) publicaram um artigo de revisão sobre os diversos estudos clínicos direcionados para tratamento da DMRI seca. As medicações testadas agem baseando-se em sete efeitos: ação na melhora da circulação coroideana, efeito antioxidativo, neuroprotetor e anti-inflamatório, terapia gênica e, após instalado o escotoma central, o uso de células tronco e implante de mini telescópio (Tabela 1).

A melhora da circulação coroideana foi explorada com medicações como trimetazidina, alprostadil, MC-1101, moxaverina, e sildenafil. Como exemplo, o aprostadil, também conhecido como PGE1, é um vasodilatador avaliado em um estudo multicêntrico e randomizado (Taskintuna et al., 2016), em que foi realizada infusão intravenosa e comparada com placebo aos três e seis meses de tratamento. Houve melhora da acuidade visual (AV) comparada com o placebo. O sildenafil foi analisado em estudo duplo cego e randomizado com quinze pacientes, mas não demonstrou mudanças significativas na circulação coroideana (Metelitsina et al., 2005).

O efeito antioxidativo foi comprovado pelo estudo AREDS2 et al. (2013a), descrito anteriormente. Houve também avaliação das vitaminas B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico) e B12 (Cianocobalamina) em um grupo de mulheres com DMRI e alto risco de doença cardiovascular, sugerindo diminuição de 35 a 40 % no risco de evolução para DMRI nessas pacientes que faziam suplementação diária dessas vitaminas em comparação ao grupo placebo. Esse efeito foi observado após sete anos de acompanhamento (Christen et al., 2009). Outras substâncias estudadas, como os antioxidantes, foram o curcumin e resveratrol. A brimonidina,

doxíciclina, as estatinas, o fator neurotrófico ciliar e o anticorpo monoclonal humano (RN6G) foram avaliados pelos seus efeitos neuroprotetores. O efeito da brimonidina não é completamente esclarecido, acredita-se no aumento dos fatores tróficos produzidos pelas células ganglionares e a estabilização da membrana mitocondrial diante de fatores oxidativos. Existem dois estudos fase II em pacientes com AG que utilizaram o mesmo polímero biodegradável do Ozurdex® com 200 e 400 µg de brimonidina, porém os resultados ainda não foram publicados (Kupperman, 2012; Taskintuna et al., 2016).

A inflamação, que teoricamente seria uma das causas da evolução para AG, foi estudada por meio de agentes supressores como o Eculizumab (SOLIRIS), o ARC-1905, Lampalizumab, acetato de Gatiramer ou copaxone (supressor da células T), acetato de fluocinolona e o Sirolimus. O estudo do Eculizumab foi o primeiro prospectivo, randomizado e placebo controlado (Yehoshua et al., 2014). Ele age inibindo o fator de complemento C5. O uso intravenoso não demonstrou efeitos colaterais, mas também não houve redução da área de atrofia e melhora da AV. Os autores argumentam o resultado pouco expressivo pelo número reduzido de pacientes (30 olhos). O copoxane é aprovado para uso na esclerose múltipla. Ele age suprimindo as células T e diminuindo a inflamação. Estudo com pacientes com DMRI utilizou semanalmente injeção subcutânea de 20 mg do acetato de Gatiramer, observando-se redução no número de drusas em comparação ao grupo de injeção simulada. O estudo com uso intravítreo (IV) de acetato de fluocinolona já finalizou, mas ainda não foram publicados os resultados. O Sirolimus foi aplicado subconjuntival em estudo fase I/II em pacientes com DMRI, sem alterações significativas no número de drusas, na sensibilidade e espessura macular (Taskintuna et al., 2016).

A terapia gênica na DMRI é muito complexa, já que vários genes estão envolvidos e fatores externos também são determinantes. Atualmente, a genética é utilizada na predição de risco de desenvolver a doença com a finalidade de atuar na prevenção. Estuda-se também o uso da genética para auxiliar na personalização do tratamento (Taskintuna et al., 2016).

Quando a doença já está em fase avançada, as alternativas mais utilizadas são próteses, como o implante de mini telescópio e a terapia celular, que é uma

grande esperança para o tratamento de diferentes doenças do olho. Um estudo, fase III, com acompanhamento de 60 meses, mostrou que o implante de telescópio em miniatura intraocular no local do cristalino proporciona ampliação do campo em até três vezes (Boyer et al., 2015). Uma nova opção é um mini teslescópio em forma de lente de contato, amplia em 2,8 x o campo, e a sua fase atual de pesquisa concentra-se em melhorar o conforto, a oxigenação e os mecanismos que alternem a visão simples com a ampliada (Taskintuna et al., 2016).

Tabela 1 - Resumo dos últimos estudos clínicos realizados para DMRI seca. (Adaptada de Taskintuna et al., 2016)

Droga /Terapia	Mecanismo de ação	Forma de administração	Grupo de estudo	Clinical trial
Preservação do EPR e fotorreceptores				
Timetazidina	Agente anti-isquêmico com efeito citoprotetor	Oral	Instituto de Pesquisa Internacionais Servier	
Aprostadiil	Aumento do fluxo sanguíneo coroidal	Intravenoso	UCB Farma	NTC00619229
Moxaverine	Inibidor da forfodiesterase não-seletivo	Oral	Universidade de Viena	NTC00709449 NTC01629680 NTC00709423
Sildenafil	Inibidor da forfodiesterase	Oral	Universidade Duke	NTC01830790
MC 1101	Aumento do fluxo sanguíneo coroidal	Tópico	MacuCLEAR, Inc	NTC01601483
Auto-hemoterapia	Aumento da oxigenação	Auto-hemoterapia	Sirion Therapeutics	
Fenretinide	Modulação do ciclo visual	Oral		
ACU- 4429	-	Oral	Acucela Inc.	NTC01802866
Tandospirine	Neuroproteção	Tópico	Alcon Research	NTC00890097
CNTF	-	Implante intravítreo	Neurotech Pharmaceuticals	NTC00447954
Brimonidina	-	Implante intravítreo	Allergan	NTC00658619
RN6G	Anticorpo antiamilóide	Intravenoso	Pfizer	NTC01577381
GSK933776	Anticorpo antiamilóide	Intravenoso	Glaxo SmithKline	NTC01342926
Doxiciclina	promotor da sobrevivência dos fotorreceptores	Oral	Paul Yates, MD, PhD, Universidade da Virgínia	NTC01782989
Prevenção da injúria oxidativa				
Fórmula AREDS	Antioxidante	Oral	National Eye Institute	NTC00345176
Crocetin	Redução da apoptose	Oral		
	Aumento da oxigenação	Oral		
	Redução da peroxidação lipídica	Oral		
Curcumin	Regulação positiva dos fatores tróficos	Oral		
Vitaminas B6, B9, B12	Diminuição no nível de homocisteína	Oral		
Resveratrol	Modulação da apoptose e angiogênese	Oral		
Supressão inflamatória				
Eculizumab(SOLIRIS)	Anticorpo monoclonal humano/Complemento 5	Intravenoso	Philip J. Rosenfeld, Md, PhD, University of Miami	NTC00935883
ARC-1905	Aptâmero de RNA / complemento C	Injeção intravítrea	Ophthotech Corporation	NTC00950638
FCFD4514S (lampalizumab)	Anticorpo monoclonal humano/Complemento FD	Injeção intravítrea	Genentech, Inc.	NTC01602120
LFG316	Anticorpo monoclonal humano/Complemento 5	Intravítreo	Novartis	NTC01527500
Copoxane	Células T e supressor inflamatório	Subcutâneo	The New York Eye & Infirmary	NTC00541333 NTC00466076
Acetato de fluocinolona (Iluvien)	Corticoide	Implante intravítreo	Alimera Sciences National Eye Institute	NTC00695318
Sirolimus (Rapamycin)	Inibidor mTOR	Subconjuntival		NTC01445548
Metabolismo lipídico				
Estatinas	Diminuição do acúmulo de lipídeos na membrana de Bruch	Oral		
Indução Extracorporea com heparina	Redução do LDL e lipoproteínas	Circul. extracorporea	B. Braum Avitum AG	NTC01840683

EPR: Epitélio Pigmentar da Retina, **LDL:** Lipoproteína de baixa densidade (Low density lipoprotein), **CNTF:** Ciliary neurotrophic factor, **AREDS:** Age-Related Eye Disease Study, **PDGF:** Fator derivado de placenta (Platelet-derived Grow), **VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor, **O1:** Heme-oxygenase, **FD:** Fator do complemento D.

O primeiro exemplo de terapia celular utilizando as células tronco cultivadas remonta a 1979, quando Green et al. (1979) demonstraram que a epiderme humana pode ser cultivada em laboratório e transplantada para pacientes queimados para reconstituição da mesma. A partir dessa conquista, vários estudos foram desenvolvidos abrangendo diversas áreas do corpo, incluindo o olho. (Pellegrini et al., 2007). A córnea foi o primeiro segmento ocular a ser testado com terapias envolvendo o uso de células tronco devido à sua facilidade de acesso e só posteriormente à retina, que possui estrutura mais complexa, é vascularizada e apresenta maior variedade de células. Sua saúde depende, tanto da vascularização quanto do EPR, que interagem estreitamente com os fotorreceptores da retina. A alteração de qualquer desses tipos de células pode conduzir à cegueira (Pellegrini et al., 2007). Em princípio, três “alvos” distintos na retina seriam passíveis de terapia celular: a neurorretina, as células do EPR e endoteliais, presentes nos vasos sanguíneos. Apesar de a retina ser mais complexa que a córnea para abordagem, o olho, de forma geral, apresenta privilégio imunológico que pode reduzir a rejeição das células transplantadas. Além disso, as inúmeras ferramentas para medir a estrutura e função ocular, incluindo tomografia de coerência óptica (OCT), angiofluoresceinografia e eletrorretinografia multifocal (ERGmf) permitem a correlação estrutura-função incomparável. Essas vantagens têm considerado os distúrbios da retina como prioridade nos ensaios clínicos com terapia celular (Tibbetts et al., 2012).

No tratamento de doenças retinianas, existem basicamente seis tipos diferentes de células tronco sendo utilizadas nos diversos estudos. A terapia celular pode ser dividida em dois diferentes efeitos principais e esperados na retina: a) efeito regenerativo ou terapia de reposição celular; b) efeito trófico ou terapia de resgate funcional (Siqueira, 2015).

A terapia regenerativa consiste em substituir o tecido danificado por uma célula nova e com capacidade funcional. Os principais estudos baseados nesse tipo de terapia usam culturas de células do EPR a partir de células tronco embrionárias (ESC) injetadas no espaço sub-retiniano (Figura 4). Esses pacientes necessitam utilizar imunossupressão após a terapia devido à origem heteróloga

da célula (Vugler et al., 2007; Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011; Tibbetts et al., 2012).

Figura 4: Células do EPR derivadas de células embrionárias. **(A)** colônias de células embrionárias indiferenciadas; **(B)** células pigmentares aparecem em 1-2 semanas; **(C e D)** a cultura do EPR se expande e mostra marcadores característicos desse tipo de célula. A presença de células binucleadas é uma característica do EPR maduro de mamíferos. (Fonte: Vugler et al., 2007).

Schwartz et al. (2012) descreveram, pela primeira vez, o implante de EPR derivado de ESC em dois pacientes com quadro avançado de Stargardt e DMRI. Por meio de vitrectomia via *pars plana* (VPP), as células do EPR foram injetadas no espaço sub-retiniano, em região pericentral. Os pacientes mostraram sensível melhora na visão e não ocorreram efeitos adversos. Schwartz et al. (2016) publicaram os resultados de quatro anos de um estudo prospectivo sobre a injeção sub-retiniana de células do EPR derivadas de ESC em 18 pacientes, sendo nove com DMRI e nove com doença de Stargardt. Nesse estudo, houve melhora da acuidade visual de até 15 letras em seis meses e em 72% dos casos verificou-se aumento da pigmentação na borda da atrofia macular. Os efeitos colaterais foram endoftalmite (um caso), catarata (quatro casos) e efeitos

relacionados à imunossupressão, como infecção do trato urinário e gastroenterites. Foram associados também dois casos de melanoma de pele. Não foi observado crescimento de tumores intraoculares.

A terapia trófica é a outra forma de terapia celular empregando células tronco. As células utilizadas já são adultas e, portanto, não possuem potencial de transformação igual às ESC. Medula óssea, cordão umbilical e gordura podem ser utilizados como fonte potencial de células adultas. A grande vantagem é a facilidade na aquisição dessas células, além de se abster das questões éticas que ainda envolvem o uso de ESC. Apesar de não possuírem a capacidade de formar uma célula da retina, seu efeito ocorre por meio de liberação de citocinas, fatores neurotróficos e inibidores de apoptose, levando ao resgate funcional daquelas células em sofrimento e criando um microambiente favorável para evitar a morte das células e evolução da degeneração. Esse efeito é conhecido como parácrino, uma forma de sinalização celular em que a célula alvo está próxima (perto = "para") da célula de liberação do sinal. Difere da sinalização autócrina porque, nesse caso, o efeito ocorre apenas em células do mesmo tipo. Dentre os efeitos parácrinos, destacam-se o aumento da angiogênese, a diminuição da inflamação, o efeito antiapoptótico, remodelando da matrix extracelular e a ativação das células tronco vizinhas (Siqueira et al, 2015).

O estímulo à angiogênese ocorre por meio da liberação de fatores como o VEGF, HGF, e o FGF2. O aumento da perfusão tem sido associado à melhora da função do órgão (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011, 2015; Schwartz et al., 2012).

A teoria do efeito anti-inflamatório, ainda em estudo (Markel et al., 2007), descreve que quando as células tronco são transplantadas para um tecido lesado, enfrentam um ambiente inflamatório hostil, deficiente em nutrientes e podem liberar substâncias que limitam a inflamação local, a fim de melhorar a sobrevivência do tecido. Entre essas substâncias, a interleucina 10 (IL-10) desempenha papel importante na modulação da atividade das células como as dendríticas, T e B. Em relação ao efeito antiapoptótico, foi observado que as células tronco inibem a apoptose das células que estão na zona de sofrimento e isquemia. Outro efeito é a alteração da matrix extracelular tornando um ambiente

mais favorável à remodelação após um infarto, por exemplo, aumentando de forma aguda a celularidade e diminuindo a produção da matriz. E, finalmente, a provável ativação de células tronco que já são do tecido, como já foi demonstrado em outros órgãos como coração, cérebro e fígado. Essas células tronco, presentes no próprio tecido, possuem receptores de fatores de crescimento que podem ser ativados e assim induzir a migração e proliferação de novas células, promovendo tanto a restauração de tecido injuriado como a melhora da sua função (Siqueira et al., 2010).

Como citado anteriormente, existe uma variedade de células que estão sendo utilizadas em pesquisas das doenças degenerativas da retina. Abaixo, um breve resumo dessas células para se contextualizar o presente estudo.

1. Células progenitoras da retina (RPC) podem ser obtidas a partir de fetos e compreendem uma população de células imaturas, responsáveis pela produção de células da retina durante o desenvolvimento embrionário (Siqueira, 2011).
2. ESC: são derivadas da massa celular interna dos embriões na forma de blastocistos com capacidade de autorrenovação, bem como a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células derivadas de adultos a partir das três camadas germinativas. Após o período de blastocisto (4 a 5 dias após a fecundação), as células do embrião se tornam mais diferenciadas, com órgãos já formados como coração e células nervosas, e as células não podem mais ser consideradas células tronco. Estudos mostram que a ESC pode se diferenciar em células progenitoras fotorreceptoras, fotorreceptores, ou EPR em ratos e seres humanos (Ikeda et al., 2005; Zhao et al., 2006; Osakada et al., 2008). Embora as ESC sejam promissoras em terapias de reposição celular da retina, subsistem questões éticas e imunes, como a rejeição, a serem consideradas. As ESC também têm sido associadas à formação de teratomas (Thomson et al., 1998; Cowan et al., 2004).
3. Células tronco pluripotentes induzidas (iPS), derivadas de tecidos adultos, foram descritas pela primeira vez por Takahashi et al. (2006). As iPS são células como ESC-reprogramadas *in vitro* de células somáticas

terminalmente diferenciadas por transdução retroviral. Apresentam as vantagens, em relação às ESC, de não necessitar de utilização de fármacos imunossupressores para evitar a rejeição e a ausência de problemas éticos por não derivarem de embriões. No entanto, apresentam também maior chance de formação de tumores (Huang et al., 2011).

4. Células mesenquimais (MSC) são células derivadas de diferentes fontes como medula óssea, tecido adiposo, placenta, sangue do cordão umbilical e fígado (Siqueira, 2011) e têm a capacidade de se autorrenovar, bem como dar origem a vários tipos de tecidos (Friedenstein et al., 1976), e se diferenciarem em células do tipo mesodérmicas, tais como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Makino et al., 1999; Xu et al., 2004). Além disso, um modelo animal *in vivo* (camundongos) demonstrou que a MSC injetada no espaço sub-retiniano pode retardar a degeneração das células da retina e preservar a função retiniana (Inoue et al., 2007).
5. Células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea (CHMO): são células tronco multipotentes que dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, incluindo as linhagens mieloides (monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariócitos, eritrócitos, plaquetas e células dendríticas) e linhagens linfoides (células T e B e *natural killer cells*). As células tronco hematopoiéticas (HSCs) são encontradas na medula óssea de adultos em, por exemplo, fêmur, quadris, costelas, esterno e outros ossos, podendo ser obtidas diretamente do quadril, usando uma agulha e seringa pela equipe da hematologia, ou do sangue, após pré-tratamento com citocinas, tais como fatores de estimulação de colônias de granulócitos, que induzem as células a serem libertadas pelo compartimento da medula óssea. Outras fontes dessas células para uso clínico e científico incluem cordão umbilical e placenta (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011). A vantagem em relação às ESC e as induzidas (IPCS) é a ausência na indução de tumores. A desvantagem é a menor capacidade em se diferenciar em

células retinianas; atuando, preferencialmente, no efeito parácrino (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011).

6. Neuroesferas: células tronco neurais e progenitoras como modelo *in vitro* de neurogênese embrionária. As células tronco do cérebro em desenvolvimento podem ser isoladas em cultura e crescer em monocamadas ou agregadas, chamadas de neuroesferas. Cada neuroesfera é derivada de uma única célula que, por meio de divisão assimétrica, dá origem a outra célula filha idêntica e a um progenitor mais comprometido. Desse modo, somente uma pequena fração da neuroesfera corresponde às células tronco pluripotentes. Como algumas dessas células não estão comprometidas, os efeitos genéticos e sinais do meio ambiente no seu desenvolvimento podem ser manipulados *in vitro*. Assim sendo, questões fundamentais a respeito dos mecanismos de desenvolvimento neuronal e glial podem ser respondidas. Neuroesferas são, geralmente, cultivadas em meio contendo FGF-2 e EGF (epidermal growth factor), uma vez que a aquisição da responsividade à EGF por precursores neurais é promovida por FGF-2 no início do desenvolvimento *in vivo*. A omissão desses fatores induz à diferenciação para fenótipos neurais (neurônios, astrocitos e oligodendrocitos) (Schwindt et al., 2005).

Sabe-se que a medula óssea do adulto contém uma população de (HSCs que podem ser divididas em subpopulações de linhagem positiva (Lin+) e linhagem negativa (Lin-), de acordo com o seu potencial para diferenciar e formar elementos do sangue (Macular Photocoagulation Study Group, 1993). A subpopulação Lin- possui uma variedade de células progenitoras incluindo aquelas capazes de se tornarem células do endotélio vascular (TAP Study Group, 1999). Essas células progenitoras da medula óssea (EPCs) se mobilizam da medula óssea e respondem a uma variedade de moléculas sinalizadoras, podendo atingir sítios de angiogênese na vasculatura periférica isquêmica, miocárdio ou áreas de injúria ocular induzida (Asahara et al., 1997; Gill et al., 2001; Kocher et al., 2001; Verterporfin in Photodynamic Therapy Study Group,

2001; Grant et al., 2002; Rosenfeld et al., 2006; Landa et al., 2009; Mitchell et al., 2010). Otani et al. (2002) reportaram que Lin-HSCs injetadas diretamente dentro do olho poderiam ativar astrócitos e participar no desenvolvimento da angiogênese em ratos no período neonatal ou em ratos adultos com neovascularização induzida por uma injúria. Esses autores também relataram que essas Lin-HSCs, quando injetadas IV, duas semanas pós-natal, poderiam prevenir completamente a degeneração vascular retiniana, evidenciada em modelos de ratos (tipo rd1 e rd 10). Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que uma fração de células tronco derivadas da medula (FMMO) contendo precursores endoteliais estabiliza e resgata vasos sanguíneos da retina completamente degenerados, com um efeito dramático por provável “salvamento” neurotrófico. Além disso, a camada nuclear interna permaneceu próxima do normal e a camada nuclear externa, que contém os fotorreceptores, estava significativamente preservada, especialmente os cones. No estudo eletroretinográfico (ERG) de Otani et al. (2004), foram observadas respostas presentes nos ratos submetidos ao tratamento, e respostas ausentes no grupo controle.

Outro achado neste estudo foi que a análise dos genomas dos olhos tratados e não tratados revelou aumento de expressão dos genes apoptóticos, demonstrando que os efeitos neurotróficos se correlacionam com a preservação da vasculatura, sugerindo que as CHMO podem ser utilizadas no tratamento de doenças como degenerações e vasculopatias retinianas, que atualmente não possuem tratamento eficaz (TAP Study Group et al., 1999).

Chiou et al. (2005) isolaram e cultivaram CHMO com potencial de diferenciação. Após duas e quatro semanas de cultura em meios de indução de hepatócito, adipogênico e condrogênico, verificou-se que as células tronco se diferenciaram em cartilagem, osso, adipócitos e células *hepatócitos-like*. Os autores também demonstraram que essas células poderiam se diferenciar em células precursoras neurais, como também foi observada sua plasticidade em se diferenciar em células da retina e linhagens de fotorreceptores, sugerindo seu potencial para o tratamento de degenerações da retina.

Banin et al. (2006) analisaram a utilização de ESC no tratamento de doenças degenerativas da retina e seu potencial em se diferenciar em células da

retina e sua sobrevivência e integração após o implante. Observaram que essas células apresentaram diferenciação em células da retina e que o meio sub-retiniano para receber o tratamento foi o que ofereceu melhor resultado, comparado aos meios IV e sub-retiniano em ratos. Outro achado importante nesse estudo foi o não desenvolvimento de teratoma em nenhuma das amostras. Os autores sugeriram, portanto, a utilização das células tronco no tratamento de doenças degenerativas da retina.

Meyer et al. (2005, 2006) relataram que as ESC, após implante IV, se incorporaram nas camadas da retina, sofrendo diferenciação e assumindo aspecto de neurônios retinianos em termos morfológicos. Além desse achado, os autores observaram que as amostras que receberam as células tronco apresentaram maior sobrevivência, especialmente os fotorreceptores. Os autores concluíram que as células tronco podem proteger as células da retina e também sugeriram que essas células tronco foram capazes de substituir alguns tipos de neurônios perdidos da retina.

Das et al. (2005), em uma revisão sobre a utilização das células tronco para tratamento de doenças degenerativas da retina, ressaltaram ser racional utilizar essa modalidade terapêutica como alternativa, com possibilidades de aumentar a sobrevivência das células em degeneração.

Tomita et al. (2002) demonstraram que as células mononucleares da medula óssea se diferenciam em células da retina após administração intravítrea em ratos com injúria induzida.

Minamino et al. (2005) demonstraram que as CHMO podem se diferenciar em células da retina e descreveram uma nova opção para a técnica de injeção IV, realizando previamente uma fotocoagulação a laser na retina. No grupo que recebeu a fotocoagulação as células tronco sobreviveram mais tempo e também apresentaram maior especificidade para ligação com as células da retina. Park et al. (2012) desenvolveram estudo com CHMO injetadas IV em camundongos, após indução de isquemia retiniana. Os autores concluíram que as células se integraram ao tecido retiniano e foram observadas até seis meses após a injeção. Jonas et al. (2008) aplicaram injeção IV de CHMO em um paciente com sequela de oclusão vascular da retina e verificaram que o procedimento é viável e seguro

em seres humanos, pois não foram observados sinais de infecção, inflamação ou desenvolvimento de formação tumoral intraocular.

Siqueira et al. (2011) realizaram um estudo prospectivo, fase I, não randomizado, que incluiu pacientes com retinose pigmentar (RP). As avaliações, como melhor acuidade visual corrigida (MAVC), ERG campo total, campo visual cinético (Goldman), angiofluoresceinografia e OCT foram realizadas no *baseline*, 1, 7, 13, 18, 22 e 40 semanas após a injeção IV de 10^7 células mononucleares derivadas de medula óssea (0,1 ml) contendo células CD34+, confirmado pela citometria de fluxo, em um olho de cada paciente avaliado. A injeção IV de FMMO em olhos com RP não foi associada com toxicidade estrutural ou funcional, detectável no período de 10 meses. Em outro estudo com pacientes com RP, Fase II, Siqueira et al. (2013) publicaram a resposta de um dos participantes que apresentou melhora do edema cistoide, da AV e da sensibilidade na microperimetria após injeção de FMMO. Siqueira et al. (2015a), realizaram análise do questionário de qualidade de vida (VFQ-25) em vinte pacientes com RP submetidos à injeção da FMMO e observaram aumento na qualidade de vida no terceiro mês de seguimento, com declínio aos 12 meses, corroborando com a teoria de que essas células permaneceriam por um período de três a seis meses intraocular (Cheng; Yau, 2008). Nesse mesmo ano, Siqueira et al. (2015b) desenvolveram outro estudo com células tronco IV em dois pacientes com isquemia macular (um por retinopatia diabética e outro após oclusão de veia central da retina). Esses pacientes apresentaram melhora na AV, microperimetria, ERGmf e no edema retiniano, avaliado pela OCT.

Diante dessa transformação do perfil epidemiológico pela qual o Brasil está passando, com o envelhecimento da população e consequente aumento da DMRI, é fundamental para a política de saúde pública a busca por opções terapêuticas para essa enfermidade. Os resultados dessas pesquisas, que demonstraram, tanto em modelo experimental como em estudo clínico fase I/II, o potencial da terapia celular utilizando CHMO no tratamento de doenças degenerativas da retina, motivou a realização de um estudo em seres humanos utilizando-se CHMO para o tratamento da DMRI, condição esta classificada como uma das principais causas de cegueira no mundo e até o momento sem tratamento eficaz em sua forma atrófica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico e a segurança do uso IV de FMMO contendo células CD34+ em pacientes portadores de DMRI na forma atrófica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, prospectivamente, dez pacientes submetidos à injeção IV de FMMO contendo células CD34+, analisando os seguintes aspectos:

- MAVC, segundo o ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study);
- Avaliação funcional da retina por meio de ERGmf;
- Avaliar a fixação da visão com a microperimetria;
- Avaliar as características do tecido retiniano, complexo EPR e coroide com OCT;
- Avaliar as características do tecido retiniano e sua vasculatura por meio da angiofluoresceinografia.
- Avaliar a qualidade de vida por meio do questionário VFQ-25 (Questionnaire National Eye Institute 25-Item Visual Function Questionnaire)

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística

Foi realizado estudo prospectivo, não-randomizado, aberto, sobre as alterações angiográficas, eletrorretinográficas, tomográficas e na microperimetria provocadas pela injeção IV de FMMO contendo células CD34+ em dez pacientes portadores de DMRI.

3.2 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob Registro nº 15978 (Anexo A) e registrado no *Clinical Trials* sob o nº NCT01518127. Todos os participantes foram informados sobre as características do estudo e incluídos apenas os que concordaram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCL) (Anexo B).

Devido à assimetria da doença, não foi comparado o olho em estudo com o contralateral. Portanto, o olho estudado foi comparado com ele mesmo antes da injeção IV e, assim, não houve grupo controle.

Dez pacientes foram selecionados no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e avaliados no início da pesquisa, um dia após a injeção, e um mês, três, seis, nove e doze meses após. As FMMO desses pacientes (autólogas) foram coletadas por uma única aspiração da crista ilíaca posterior, procedimento realizado no HCFMR-USP pela equipe de terapia de medula óssea. O processamento e a separação das células tronco foram realizados nos Laboratórios de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto-SP. No mesmo dia do processamento, 0,1 ml do material obtido foi injetado IV em sala cirúrgica pelo próprio pesquisador.

3.3 Critérios de inclusão

- Idade: Paciente portador de DMRI (acima de 50 anos);
- Presença de DMRI na forma atrófica avançada;
- MAVC pior ou igual a 20/100.

3.4 Critérios de exclusão

- Injeção IV de corticoesteroides ou outras drogas antiangiogênicas há seis meses da avaliação inicial;
- Opacidade de meios que pudessem interferir significativamente na AV, confirmada por avaliação oftalmológica clínica ou documentação do fundo de olho;
- Cirurgia intraocular nos últimos três meses;
- Vitrectomia posterior ou retinopexia com introflexão escleral, em qualquer época;
- Infecção ocular aguda;
- Tratamento com radiação ionizante na região da face, do crânio e pescoço;
- Alergia à fluoresceína;
- Etilismo e uso de drogas;
- Condições médicas ou psicológicas que impedissem o paciente de concluir o estudo ou assinar o TCL;
- Doença significativa e não controlada que, na opinião do investigador, pudesse excluir o paciente do estudo;
- Impedimento ou capacidade legal limitada;
- História prévia de tumores malignos em qualquer época;
- Participação em outro estudo clínico nos últimos 30 dias.

NOTA: Paciente que tivesse participado de algum estudo clínico nos últimos 12 meses, ainda que já terminada sua participação, anteriormente aos últimos 30 dias, somente foi incluído se o presente protocolo pudesse trazer claro benefício ao mesmo.

3.5 Exclusão de pacientes do estudo

Os pacientes foram orientados que a qualquer momento poderiam se retirar do estudo sem precisar alegar os motivos e seriam excluídos em qualquer um dos seguintes casos:

- Retirada do TCLE pelo paciente;
- Ocorrência de um critério de exclusão que fosse clinicamente relevante e afetasse a segurança do paciente, a critério do investigador principal;
- Necessidade de procedimento ou tratamento não permitidos pelo protocolo do estudo;
- Ocorrência de evento adverso que indicasse que a descontinuação do estudo seria considerada necessária pelo investigador ou paciente;
- Adesão insuficiente do paciente. Caso o mesmo não comparecesse às avaliações programadas no estudo, o investigador deveria determinar os motivos e as circunstâncias da forma mais completa e precisa possível.

3.6 Avaliações clínicas

3.6.1 MAVC

A MAVC foi aferida segundo padronização recomendada pelo ETDRS (1985), e executada sempre pelo mesmo examinador. A AV foi medida em ambos os olhos (olho estudado e contralateral) em cada visita de seguimento, exceto no primeiro dia após a injeção. As medidas da AV foram consideradas, tanto para avaliar a segurança como a eficácia do tratamento. Para a análise estatística, a acuidade em ETDRS foi convertida seguindo a tabela logMAR.

3.6.2 Exame oftalmológico

Os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico completo, incluindo biomicroscopia na lâmpada de fenda, com e sem dilatação, tonometria de

aplanação e oftalmoscopia indireta com lente de 20D. A presença de células na câmara anterior foi graduada de 0 a 4, sendo 0 = nenhuma (sem células), 1 = leve (1-5 células), 2 = moderada (6-15 células), 3 = grave (16-30 células) e 4 = muito grave (>30 células). O *flare* também foi avaliado e classificado de 1 a 4, sendo 0 = nenhum (nenhum efeito Tyndall), 1 = leve, (Tyndall quase imperceptível), 2 = moderado, 3 = grave (Tyndal muito intenso), e 4 = muito grave.

3.6.3 Angiofluoresceinografia

O exame foi realizado com o aparelho *Spectralis* (Heidelberg Engineering, Alemanha) em todos os pacientes no *baseline*, com três, seis e 12 meses após o tratamento para avaliar a extensão da lesão da DMRI e, posteriormente, o possível crescimento de tumores ou neovasos, como descrito em estudos anteriores. Como exemplo, Arnhold et al. em (2004) mostraram que 50% dos camundongos que receberam ESC sub-retiniana apresentaram crescimento de tumor que atingiu diversas partes do olho, como retina, vítreo e coróide. Esse exame documenta o processo dinâmico no qual a fluoresceína penetra no olho através da circulação arterial, interage com as estruturas anatômicas (normais e anormais) e deixa o olho via circulação venosa. É fundamental reconhecer o padrão da angiofluoresceinografia normal e suas fases antes de iniciar o estudo de suas anormalidades. Utilizando a luz infravermelha, realiza-se o *infrared* (IR). O exame também realça a membrana limitante interna (MLI) (por exemplo, é mais fácil a identificação de uma membrana epirretiniana inicial) e o EPR (torna as rarefações e atrofia mais evidentes) (Figura 5).

Figura 5: Imagem de *infrared* do olho esquerdo no *baseline*.

Antes da injeção de contraste, foi realizado o teste de autofluorescência, que permite a avaliação clínica do EPR utilizando oftalmoscópio de varredura a laser. Esse oftalmoscópio se baseia na emissão de luz, primariamente, pela lipofuscina que deriva principalmente de resíduos químicos modificados como resultado de uma digestão/metabolização incompleta pelo EPR, dos segmentos externos dos fotorreceptores. Estudos mostram que áreas com aumento de autofluorescência são decorrentes do acúmulo de lipofuscina, e após a morte das células fotorreceptoras e consequente atrofia, essas áreas mostram diminuição da autofluorescência, sugerindo que esse exame é um bom marcador para a integridade do EPR (Coco et al., 2007) (Figura 6).

Figura 6: Imagem de autofluorescência de paciente estudado.

Após injeção de 3 ml de contraste de fluoresceína a 10%, foram identificadas as seguintes fases do angiograma:

- Fase coroídea: A coroide é o primeiro tecido a fluorescer no olho, com início logo após a injeção de contraste e antes do enchimento arterial. Qualquer senso de estrutura da coroide é imediatamente perdido, pois os capilares da coriocapilar são fenestrados e difundem o contraste para todo o tecido extravascular. Nessa fase, em alguns pacientes pode ser observada a artéria ciliarretiniana, que nasce da circulação coróide e enche, juntamente com a coroide (diferente da artéria central da retina que vai encher na fase seguinte).
- Fase arterial: Inicia-se com a entrada do contraste nas artérias da retina. É muito rápida, durando aproximadamente um a dois segundos.
- Fase arteriovenosa: Imediatamente após o enchimento arterial começa também o enchimento da veia, que se faz inicialmente na margem do vaso (fluxo laminar), dando o padrão característico dessa fase.
- Fase venosa: Caracteriza-se pelo enchimento total das veias. Geralmente ficam mais brilhantes que a artéria.

- Fase de recirculação: Artérias e veias apresentam fluorescência semelhante e tem início o processo de esvaziamento, com diminuição do contraste (Figura 7).
- Fase tardia: Nessa fase observou-se fluorescência residual (staining) de algumas estruturas normais como, por exemplo, o disco óptico, com redução total da fluorescência.

Figura 7: Imagem angiográfica na fase de recirculação do olho direito no *baseline* de paciente estudado.

3.6.4 Tomografia de coerência óptica (OCT)

A OCT de domínio espectral é uma ferramenta de diagnóstico capaz de realizar uma tomografia da retina por meio de espectrômetro e uma câmera de alta velocidade baseada no preceito matemático da transformada de *Fourier*. Essa tecnologia permite a captação de imagens com maior resolução e até 200 vezes mais rápida que a OCT de domínio temporal. Os pacientes foram submetidos ao exame no *baseline* e em todas as visitas subsequentes utilizando o aparelho *Spectralis* OCT (Heidelberg Engineering - Alemanha), com resolução espacial de 7 micras e velocidade de 40000 scans/s, possibilitando a avaliação *in*

vivo do *status* histopatológico da retina (Figura 8). Seu protocolo de aquisição delimita a MLI e a MB (como linhas externas da retina).

Figura 8: Exemplo de OCT normal com as denominações presumidas das camadas visíveis (imageck.com).

O exame foi realizado sob midríase medicamentosa (Mydriacyl 1% e Fenilefrina 10%) no *baseline* e em todas as visitas subsequentes. As tomografias foram realizadas obtendo-se imagens da retina central de 30 graus de diâmetro, com laser de comprimento de onda próximo ao IR, com 8,5 mm x 8,5 mm (1536 pixels; 5,54 μm /pixels) (Figura 9).

Figura 9: Exame de OCT mostrando as características típicas da DMRI como elevações arredondadas do EPR hiperreflectivas compatíveis com drusas, atrofia do EPR e camadas retinianas externas na região macular.

Foi utilizado protocolo contendo 19 secções horizontais (236 µm entre secção), centradas na fóvea, totalizando área de 20 x 15 graus do campo visual (5,7 mm x 4,3 mm), com 25 quadros para médias em cada secção (Figura 10).

Figura 10: Protocolo de aquisição da OCT.

3.6.5 Eletrorretinograma (ERG)

Esse exame é realizado por meio de eletrodos oculares DTL e cutâneos. Após limpeza e remoção de excesso de gordura da superfície, três eletrodos cutâneos são utilizados para o registro do ERG. Dois deles, os dos polos negativos dos olhos esquerdo e direito são posicionados na pele da respectiva têmpora lateral e o terceiro na frente para servir como referencial elétrico (terra). Os eletrodos DTL consistem de uma fibra de nylon e prata, colocada em contato com a córnea e conjuntiva para servir como eletrodo do polo positivo. Esse tipo de eletrodo tem sido largamente utilizado em eletrofisiologia e apresenta como principais vantagens, conforto para o paciente, menor risco de ansiedade naqueles que não se adaptam a lentes de contato, baixo risco de lesões corneanas, baixa impedância e boa reprodutibilidade dos resultados. No presente estudo, foi utilizado o aparelho Diagnosys LLD - Espion E2, em conjunto com o estimulador ColorDome. Em todas as visitas, o paciente foi submetido ao ERGmf, sendo orientado a fixar a mira (cruz vermelha) localizada no centro de uma tela de LED com 61 hexágonos escalonados, projetada em uma área de 30 graus do campo visual. A distância entre o olho estimulado e a tela do monitor foi de 40 cm.

O ERGmf foi criado para detecção de disfunções retinianas locais, preenchendo a limitação do ERG de campo total que avalia a retina como um todo. Esse exame calcula a função retiniana topograficamente, obtendo-se um mapa de campo visual por meio dos sinais bioelétricos locais. O estímulo utilizado consiste em um padrão de hexágonos que varia de 61 a 241 (neste estudo utilizou-se o 61) sendo que o seu tamanho aumenta com a excentricidade da retina, ou seja, inversamente à densidade dos cones, de forma a produzir aproximadamente a mesma resposta em toda a retina de indivíduos normais. Apresenta um estímulo *flicker*, uma vez que cada hexágono alterna entre preto e branco por meio de uma sequência pseudo-randomizada com o comprimento máximo de onda designada de “sequência-m”, em que há 50% de probabilidade de cada elemento hexagonal passar para preto ou branco (Figura 11).

Figura 11: Representação do ERGmf com estímulo de 61 hexágonos. (Fonte: Hood et al., 2012).

O ERGmf consiste de uma onda bifásica com uma deflexão inicial negativa, seguida de um pico positivo. Posteriormente, segue-se a este uma segunda deflexão negativa. Esses três picos são denominados de N1, P1 e N2, respectivamente. A deflexão N1 corresponde às respostas das principais células que contribuem para a onda do ERG de campo total. É gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores e das células bipolares-*off*, que ocorre após o início da exposição da retina a um *flash* de luz, assim como o P1 apresenta respostas de células que contribuem para a onda b e POS (Potenciais Oscilatórios) do ERG convencional. É formada pela despolarização das células bipolares-*on* e pela recuperação dos fotorreceptores e das células bipolares-*off*. A deflexão N2 corresponde à recuperação das células bipolares-*on*, com discreta contribuição das células da retina interna para o formato da curva, mas não para a sua amplitude. Apesar da correlação com o ERG de campo total, essas ondas não são exatamente equivalentes às respostas fotópicas do mesmo devido à frequência de estimulação superior no ERGmf, pelo que não podem ter igual designação (Hood et al., 1997, 2003, 2012) (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Diagrama demonstrando a resposta do ERGmf e as características de suas ondas. (Fonte: Hood et al., 2012).

Figura 13: Mapa de respostas da ERGmf. **(A)** As respostas elétricas. **(B)** O mapa tridimensional, em que a altura e a cor das células são proporcionais à densidade das respostas, ou seja, amplitude dividida pela área do hexágono. Essa grandeza pode ser correlacionada com a densidade de cones na retina.

A análise foi realizada baseando-se no cálculo da média da amplitude das ondas P1 nos cinco anéis concêntricos e comparando-se esse valor do *baseline* com 3, 6, 9 e 12 meses após a injeção (Figura 14).

Figura 14: A imagem à esquerda representa, em cores, os cinco anéis concêntricos. Para cada anel, foram calculadas as ondas N1 e P1 (Tabela à direita). No protocolo, foi utilizada a média das ondas P1 em nanovolt (nV).

3.6.6 Microperimetria (MAIA Centervue - Itália)

A microperimetria combina a retinografia com a perimetria computadorizada. Esse foi um importante exame utilizado no estudo, sendo os pacientes submetidos a ele no *baseline* e nas visitas subsequentes. As imagens foram obtidas por meio de um *scanner* com laser (Scanner Laser Ophthalmoscopy). O *eye tracker* permite a compensação precisa dos movimentos oculares. Semelhante ao padrão da perimetria automatizada (PAP), o MAIA realiza, na retina, medidas da sensibilidade à luz projetando estímulos Goldmann III em diferentes locais do campo de visão. A principal diferença e grande vantagem é que a sensibilidade da retina é medida enquanto simultaneamente é mostrada a imagem real do fundo de olho (Figura 15).

Figura 15: Exame de microperimetria em olho direito. **(A)** Imagem em *infrared* do fundo de olho, **(B)** Medida de 36 pontos de sensibilidade em decibéis.

A sensibilidade é medida de zero a 36 decibéis (dB), codificados em cores. O “verde” significa normal, “amarelo” suspeito, “vermelho” anormal e “preto” escotoma. Os dados são comparados com valores obtidos de sujeitos normais. O campo da imagem em IR é de 36 x 36, sendo que a perimetria é realizada em um campo de 30 x 30 graus com luminância de 4 *apostilb* (asb). O teste utilizado foi o *Full-Threshold* 4-2, que avalia com detalhes a retina. A Figura 16 apresenta um gráfico com a distribuição de cada ponto testado em paciente estudado. O teste é, ainda, comparado com uma população normal. A barra do *Average Threshold* (AT), ou média do limiar, mostra que em 36 dB testados, o paciente encontra-se na barra vermelha com apenas uma sensibilidade de 4,1 dB, ou seja, anormal. Esse parâmetro em dB foi um dos principais dados avaliados neste estudo, comparando o AT do *baseline* com as visitas posteriores.

Figura 16: Análise da microperimetria de um paciente com distribuição em decibéis.

Outro dado muito importante e também diferencial da microperimetria é a avaliação da fixação do paciente. Em indivíduos normais, a área da retina, utilizada predominantemente para a fixação, é a fovea, ao passo que quando a patologia afeta o centro da fóvea, como é o caso da doença em questão, os pacientes passam a utilizar regiões extrafoveais, evento conhecido como fixação excêntrica. O MAIA fornece informações precisas e objetivas a respeito do local e da estabilidade de fixação do paciente. Estudos mostram que a análise da estabilidade da fixação é um importante parâmetro para a avaliação do tratamento para doenças maculares (Mandelcorn et al., 2013; Hanout et al., 2015). Tais parâmetros são avaliados pelo monitoramento dos movimentos oculares de 25 vezes/seg. A área da retina utilizada para a fixação é conhecida como local preferido pela retina (PRL). Cada movimento do olho é representado por um ponto na distribuição; e o total de pontos descreve o PRL, ou seja, a localização da fixação, enquanto que sua extensão indica a estabilidade. A nuvem de pontos de fixação é calculada em duas elipses, *bivariate contour ellipse area* (BCEA) (Figura 17). A BCEA mostra a área de tentativa de fixação pelo paciente. Quando o mesmo tenta fixar em diversos pontos, “procurando” o melhor ponto, a BCEA é maior e demonstra instabilidade de fixação. No presente estudo, comparou-se a BCEA no *baseline* e após o procedimento.

Figura 17: Área das elipses formadas por meio dos pontos de fixação (bivariate contour ellipse área).

3.6.7 Questionário de qualidade de vida; NEI- VFQ-25

Esse questionário foi originalmente criado nos EUA e continha 51 questões para análise da qualidade de vida. Posteriormente, foi resumido em 25 questões, o que o tornou menos cansativo, necessitando de 10 minutos, em média, para aplicá-lo. No Brasil, vem sendo utilizado desde 2001, sendo que sua reprodutibilidade foi testada, sendo o mesmo validado e disponível para a língua portuguesa (Anexo C) (Mattos, 2001; Ferraz et al., 2002, Simão et al., 2008; Pinheiro et al., 2010). A qualidade de vida, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, é definida como a "percepção do indivíduo sobre sua posição na vida, no contexto da cultura e nos sistema de valores, nos quais vive, e em relação aos seus objetivos, suas expectativas, seus padrões e suas preocupações" (WHOQL Group, 1994). As 25 questões foram alocadas em 12 grupos que compreendem: saúde geral, visão geral, dor ocular, visão para perto e para longe, aspectos sociais, saúde mental, atividades da vida diária, dependência, capacidade para dirigir, visão de cores e periférica. Cada aspecto citado anteriormente é avaliado

por uma questão a quatro questões. Para cada questão há cinco possibilidades de resposta, sendo que para cada uma se obtém uma pontuação que varia de 0 a 100 (0, 25, 50, 75 e 100 pontos, de acordo com a resposta). A pontuação final é, então, dividida pelo número de questões, obtendo-se um escore geral para cada paciente, cujo valor mínimo é zero e o máximo 100. Quanto maior o escore alcançado, melhor a qualidade de vida (Mangione, 2000). O questionário foi aplicado no *baseline* e seis meses após.

3.6.8 Coleta do material

A técnica utilizada para a obtenção do aspirado da medula óssea é similar à descrita para procedimentos oncológicos e hematológicos para transplante de medula óssea. O procedimento foi realizado no Setor de Transplante de Medula Óssea do HCFMRP-USP, por uma equipe de hematologista. O paciente era posicionado em decúbito lateral e após antissepsia com iodopovidona (PVPI) foi realizada anestesia local com injeção de xilocaína. Em seguida, uma agulha de aspiração de medula óssea foi introduzida manualmente na crista ilíaca posterior e aspirados 5 a 10 ml de cada paciente com seringa heparinizada (Figura 18).

Figura 18: Esquemática da coleta da medula óssea na crista ilíaca posterior. (Fonte: http://www.chsp.org.br/?page_id=26).

3.6.9 Processamento das células

O aspirado da medula óssea dos pacientes, obtido por meio de aspiração da crista ilíaca posterior, foi encaminhado para o Setor de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP e submetido à centrifugação por gradiente de *Ficoll-Hypaque* (Amersham Pharmacia, produto licenciado para uso humano), para isolamento das células mononucleares. A fração de células mononucleares coletada foi ressuspensa em solução salina estéril e centrifugada novamente. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, após o qual as células foram ressuspensas em salina a 10% de soro autólogo com quantidade final de 10^7 células por mm. As células mononucleares da medula óssea, a serem injetadas, eram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo com um painel de anticorpos monoclonais para determinar a presença e as percentagens de células tronco (CD34+) e de células maduras das linhagens celulares hematopoéticas e linfoides. A quantidade de células a serem injetadas foi, em média, $1,68 \times 10^4$ células em 0,1 ml. Foi realizado também estudo da viabilidade

celular com azul de tripan (Figura 19).

Figura 19: (A) Imagem mostrando a coleta da medula óssea; (B, C e D) Sequência de imagens mostrando a separação de células mononucleares usando centrifugação por gradiente de *Ficoll Hystopaque*. (Fonte: Siqueira et al., 2010).

3.6.10 Injeção intravítrea

No mesmo dia da coleta, o material obtido da medula óssea foi processado e 0,1 ml da solução foi injetada no olho de pior AV e que conseguia realizar os exames. A técnica seguiu a regras já estabelecidas: assepsia periocular com PVPI tópica e ocular com PVPI tópica oftálmica e colocação de campo cirúrgico e blefarostato estéreis. A injeção IV foi aplicada utilizando uma agulha de 30 gauge no quadrante temporal superior VPP a 4 e 3,5 mm do limbo em olhos fáticos e

pseudofácicos, respectivamente, sendo prescrito colírio antibiótico (quinolona de quarta geração) quatro vezes ao dia por sete dias.

3.7 Análise estatística

Para todas as análises foi usado o programa JMP® versão 10.0.0. As comparações entre os grupos para dados contínuos foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Para avaliação das variáveis (AV; BCEA, AT da microperimetria, média da onda P1 do ERGmf) foi utilizado o teste t-pariado, que calcula a diferença entre cada par de medição antes e depois, determina a média dessas mudanças e informa se a média das diferenças é estatisticamente significativa. Devido à assimetria do quadro e por muitos pacientes possuírem DMRI úmida com cicatriz disciforme no olho contralateral, optou-se por não se compararem os olhos.

4. Resultados

Dez pacientes com DMRI foram selecionados no Ambulatório de Retina do HCFMRP-USP, a partir de dezembro de 2013. Todos concluíram seis meses de avaliação e nove completaram nove meses e seis pacientes finalizaram os 12 meses.

4.1 Acuidade Visual

A média da AV antes da injeção foi de 1,18 logMAR (20/320⁺¹), com três, seis e doze meses após a injeção IV foi de 1,04 logMAR (20/200⁻²), 1,02 logMAR (20/200⁻¹) e 1,0 logMAR (20/200), respectivamente. A AV variou no *baseline* de 20/125-1 a 20/800, passando para 20/63-1 e 20/500-2 no primeiro mês e 20/40 a 20/800 no sexto mês. A Figura 20 mostra as médias e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) das diferenças entre as AVs medidas durante o seguimento e a AV basal.

Figura 20: Representação gráfica mostrando a evolução da acuidade visual em logMAR em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).

Houve diferença significativa nas comparações de um, três, seis, nove e doze meses em relação à melhor AV no *baseline* (Tabela 2).

Tabela 2: Acuidade visual medida antes da injeção IV e três meses após. Descrição do número de letras ganhas por paciente (paciente #1 ao #10).

Pacientes	AV <i>Baseline</i>	Número de letras	AV 3 meses
#1	20/160-1	14	20/80-2
#2	20/640-2	10	20/400-2
#3	20/500	0	20/500
#4	20/800	3	20/640-2
#5	20/160	19	20/63-1
#6	20/125-1	6	20/100
#7	20/800	0	20/800
#8	20/160	5	20/125
#9	20/200-2	4	20/200+2
#10	20/200-2	6	20/160-1

AV= acuidade visual.

4.2 Angiofluoresceinografia, *infrared* e autofluorescência

Esse exame foi realizado, principalmente para analisar o possível crescimento de neovasos ou tumores, em todos os pacientes pré-injeção, e com três, seis e doze meses após a injeção de células tronco. Não foram observadas alterações no decorrer das avaliações, sendo importante para demonstrar a segurança do procedimento. Todos os pacientes, antes da angiofluoresceinografia, eram submetidos também à autofluorescência e ao IR. Foram obtidas medidas das áreas de atrofia no IR ou de hipoautofluorescência. Foram selecionados os três pacientes com maior área em um dos exames e correlacionados com os dados da AV e microperimetria (Figura 21).

Figura 21: A imagem representa o exame de *infrared* e o tamanho da área de atrofia do paciente #1 à esquerda e # 4 à direita.

Na análise dos três pacientes com maior área, não houve significância estatística no sexto mês para os parâmetros de AV, BCEA e média do limiar de sensibilidade. Já nos sete pacientes com menor área, notou-se diferença significativa na AV ($p=0,03$) e média do limiar ($p=0,01$); e na análise do BCEA houve tendência à significância ($p=0,07$).

4.3 Tomografia de coerência óptica

Não houve alterações na espessura macular e na anatomia, demonstradas pela OCT em todos os seguimentos.

4.4 Eletrorretinografia multifocal

A análise foi realizada baseada no cálculo da média da amplitude das ondas P1 nos cinco anéis concêntricos, sem melhora significativa na ERGmf (Figura 22).

Figura 22: Representação gráfica evidenciando a evolução da média da amplitude da onda P1 na ERGmf em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).

4.5 Microperimetria

Na microperimetria, foram avaliados dois parâmetros: a média do limiar de sensibilidade (Average threshold) e o BCEA. O limiar de sensibilidade foi testado em um campo de 30 graus, de 0 a 36 dB. Entre 0 e 23 dB, o paciente é considerado anormal. Todos os pontos testados com nível de limiar igual a 25 dB são classificados como normais, já que o paciente consegue perceber o estímulo com a atenuação máxima que o campímetro pode dar ao estímulo. Entre 23 e 25 dB, é considerado suspeito e nada pode ser afirmado sem uma análise mais detalhada, porque dependendo da localização do ponto e da idade do paciente, qualquer desses valores pode estar ou não na faixa de normalidade. Apesar da melhora na sensibilidade, não houve significância até o terceiro mês, sendo significativo nos seguimentos de seis, nove e doze meses (Figura 23).

Figura 23: Representação gráfica mostrando a evolução da média do limiar de sensibilidade na microperimetria em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).

A média do AT (média do limiar) no *baseline* foi de 8,5 dB; no 1º, 6º e 12º meses foram, respectivamente, 10,4; 11,6; 12,15 dB (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado da microperimetria nos dez pacientes estudados. Em vermelho, destacam-se os pacientes que melhoraram a média do limiar de sensibilidade no primeiro e sexto mês, comparados com o *baseline*.

Pacientes	Baseline	1 mês	6 meses
#1	4,1	16,9	12,9
#2	0	0	4,1
#3	20,3	20,8	20,5
#4	0,3	0,5	2
#5	14,2	22,4	19,3
#6	9	0	11,1
#7	4,3	2,7	2,3
#8	7,9	10,4	14,9
#9	18,6	19,8	19,4
#10	7,1	10,7	9,1

As Figuras 24 a 27 mostram o exame de microperimetria no *baseline* e seis meses após a IV dos dez pacientes estudados.

Figura 24: Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de três pacientes (#1, #2, #3) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de Snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.

Figura 25: Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de dois pacientes (#4, #5) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de Snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.

Figura 26: Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de três pacientes (#6, #7, #8) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de Snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.

Figura 27: Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de dois pacientes (#9, #10) na avaliação inicial e seis meses após a terapia. Apresenta também, na parte inferior de cada imagem, a acuidade visual pela tabela de Snellen e a sensibilidade em decibéis na microperimetria.

A partir dessas imagens, foi possível perceber que os pacientes com fixação mais deficiente no *baseline* (#2 e #4) obtiveram pouca melhora no acompanhamento. O que corrobora com a teoria do efeito parácrino, ou seja, de resgate funcional das células em sofrimento. Os pacientes com a doença muito avançada apresentavam muitas células mortas que poderiam responder principalmente à terapia regenerativa. Na microperimetria acima, também foi possível observar que os pacientes com melhor visão (#1, #5, #6 e #8), apresentaram melhora importante na sensibilidade. A Figura 28 mostra a microperimetria do paciente #9 no *baseline*, e um e seis meses após o tratamento. Essa análise mostrou a sensibilidade de cada ponto dos 36 pontos testados; e também a melhora de alguns pontos. Esse paciente apresentou melhora de sete dB (*baseline* 7,9 dB e 14,9 dB aos seis meses após a injeção IV).

Figura 28: Microperimetria do paciente #9 pré-injeção, um e seis meses após.

A avaliação da fixação foi realizada por meio da análise do BCEA, que mostrou duas elipses formadas pelos vários pontos de fixação. Teoricamente, quanto maior essa elipse, mais pontos esse paciente apresentou na fixação. Provavelmente, por ter mais dificuldade em fixar em um ponto, “procura” outros locais de fixação. No presente estudo, houve diminuição do BCEA, porém sem significância estatística (Figura 29).

Figura 29: Representação gráfica mostrando evolução do BCEA (microperimetria) em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p).

4.6 Questionário de qualidade de vida; NEI- VFQ-25

Sete pacientes responderam o questionário no *baseline* e seis meses após a injeção IV. Observou-se diferença significativa na saúde mental ($p=0,003$) e visão de cores ($p=0,005$) e forte tendência à significância na análise que abordou visão geral ($p=0,05$) e dependência ($p=0,067$); com declínio em relação à saúde geral ($p=0,77$). Quanto às outras questões, verificou-se melhora do percentual, porém sem significância estatística (Figura 30).

Figura 30: Representação gráfica dos doze subdomínios analisados pelo questionário VFQ-25 e comparação dos resultados pré-injeção e seis meses após.

A média de pontos do questionário pré-injeção foi de 39, e com seis meses de 47. A análise da diferença dos pontos pré-injeção e após seis meses demonstrou que os pacientes com AV menor, apresentaram pior qualidade de vida (menor pontuação) e também pouca melhora após o procedimento (Figura 31).

Figura 31: Representação gráfica da correlação da acuidade visual aos seis meses com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 ($p=0,03$).

Assim como na AV, a correlação entre a média do limiar de sensibilidade aos seis meses e a diferença do VFQ-25 mostrou que os pacientes com micrometria com menor sensibilidade apresentaram pior qualidade de vida e também menor pontuação e pouca melhora na qualidade de vida com seis meses após injeção (Figura 32).

Figura 32: Representação gráfica da correlação da média no limiar de sensibilidade aos seis meses, com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 em seis meses após IV ($p=0,005$).

Também foi correlacionada a área de hipoautofluorescência com melhora do questionário VFQ-25 após a injeção, observando-se correlação inversa entre a área de hipoautofluorescência e melhora na pontuação no questionário quanto à qualidade de vida (Figura 33).

Figura 33: Representação gráfica da correlação entre o tamanho da área de hipoautofluorescência, com a diferença de pontos no questionário VFQ-25 em seis meses após IV ($p=0,005$).

5. Discussão

As doenças degenerativas da retina, entre elas a DMRI, são uma das maiores causas de cegueira irreversível e um desafio para a oftalmologia. A deficiência visual tem impacto tanto no potencial econômico do indivíduo quanto na sua qualidade de vida.

A retina é uma continuação do sistema nervoso central (SNC) e, como o cérebro, é incapaz de se regenerar após a morte celular por doença ou trauma (Ávila et al., 2015; Mead et al., 2015). As células tronco possuem grande potencial para tratar doenças degenerativas da retina (Pellegrini et al., 2007; Tibbetts et al., 2012). Em comparação com outros tecidos, a retina tem vantagens únicas como alvo para terapias celulares. A retina é um tecido acessível para abordagens cirúrgicas e injeções IV e permite análise funcional por meio de ERG e microperimetria, além de documentação fotográfica (Tibbetts et al., 2012). Além disso, o olho é relativamente pequeno, necessitando de menor número de células, e também é protegido imunologicamente (Tibbetts et al., 2012; Mead et al., 2015). Atualmente, existem vários estudos visando o uso da terapia celular para doenças degenerativas da retina em todo o mundo (Siqueira et al., 2011; Park et al., 2012; Mead et al., 2015; Schwartz et al., 2016). Muitos desses estudos são de fase pré-clínica. Há um número reduzido de pesquisas clínicas fase I e II.

As principais doenças estudadas são: DMRI seca, doença de Stargardt, RP, distrofia de cones, edema macular isquêmico e glaucoma. No momento, há duas grandes abordagens para o desenvolvimento de tais terapias: a terapia regenerativa, que visa substituir por completo a célula degenerada e a terapia trófica, ou de resgate funcional, que se baseia no efeito parácrino das células tronco. A terapia regenerativa, a princípio, seria a solução das doenças degenerativas da retina, já que substituiria aquele tecido. No entanto, o conceito de substituição direta de células para restaurar a visão usando um único tipo de célula retiniana pode ser excessivamente simplista e otimista, especialmente em olhos com significativa perda de visão de longa data. É importante destacar que os distúrbios da retina, frequentemente, envolve disfunção de mais de um tipo de célula e que os circuitos neuronais dentro da retina podem ser permanentemente alterados pela disfunção crônica envolvendo vários neurônios da retina. (Park et al. 2016).

O efeito trófico foi o analisado no presente estudo. As principais células utilizadas para esse tipo de avaliação são as HSC. Essas CHMO são uma mistura heterogênea de células que atuam principalmente com efeito trófico mas também capazes de enxerto direto. Esses efeitos na retina danificada podem representar uma abordagem mais viável para o tratamento da disfunção retiniana do que a substituição direta de células, uma vez que a maioria dos distúrbios da retina estão associados a danos em mais de um tipo. Tal terapia celular não seria específica da doença e mais universalmente aplicável. (Park et al. 2016).

Apesar de Tomita et al. (2002) demonstrarem em estudos com camundongos com injúria retiniana que essas células são capazes de se integrar e diferenciar em células neurais retinianas, sabe-se que o mecanismo primário das HSC é o efeito trófico. Essa terapia tem sido a mais utilizada e estudada no mundo. Além da retina, as HSC já são utilizadas há anos para reconstituir o tecido hematopoiético em doenças hematológicas como a leucemia e também está sendo estudada para revascularizar o coração pós-isquemia coronariana e em doenças externas oculares que levam à isquemia límbica (Cheng; Yau, 2008; Siqueira, 2015). Essas células podem ser encontradas na medula óssea, gordura, no dente e cordão umbilical. Apresentam vantagem pela fácil aquisição e menor chance de formação de tumores, comparadas com as ESC. Não há rejeição, pois a célula é retirada do próprio paciente, e não tem problemas éticos envolvidos como no uso de embriões (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011, 2015). O efeito parácrino não é completamente entendido, mas estudos experimentais em modelo animal com injúria induzida sugerem que as células tronco adultas regeneram o tecido lesionado, melhoram sua função, e o protegem de um novo insulto (Bull; Martin, 2011; Siqueira, 2015). Acredita-se que células tronco produzem alguns fatores, ainda em estudo, como o VEGF, HGF e FGF-2, que podem melhorar a angiogênese e a perfusão em tecidos cronicamente isquêmicos (Bull; Martin, 2011), com diminuição da inflamação; e parecem atenuar o tamanho do infarto, modulando a inflamação local. Quando transplantadas num tecido ferido, as células tronco podem libertar substâncias que limitam a inflamação local, melhorando a sua sobrevivência. Estudos recentes avaliaram a liberação da citocina anti-inflamatória (IL-10), que modula a

atividade das células imunológicas, tais como células dendríticas, células T e B (Crisostomo et al., 2008; Oh et al. 2008; Bull; Martin, 2011). Um efeito importante é o antiapoptótico, por meio do salvamento de células com mal funcionamento e no limite de sua morte. As células agem aumentando as enzimas antioxidantes.

No presente estudo, dez pacientes com DMRI seca em estágio avançado, receberam uma injeção IV no olho de pior AV contendo 0,1 ml de FMMO. Efeitos importantes foram observados no seguimento. O procedimento não foi associado com inflamação clinicamente significativa e não houve comprometimento detectável na função visual, mostrando-se seguro. Este achado corrobora com as análises prévias, como o estudo fase I de Siqueira et al. (2011), que relataram a ausência de efeitos colaterais no uso IV de FMMO em pacientes com RP (três casos) e distrofia de cones (dois casos). Jonas et al. (2008), em um estudo piloto com três pacientes apresentando, separadamente, DMRI, glaucoma e retinopatia diabética, também mostraram que é seguro o uso IV dessas células. Mais recentemente, Park et al., (2014) realizaram estudo fase I com seis pacientes (seis olhos) com isquemia ou degeneração retiniana, não sendo identificados efeitos colaterais locais ou sistêmicos.

Neste estudo, avaliou-se também a melhora ou estabilização da AV, com melhora significativa em todos os seguimentos. Dos dez pacientes, seis melhoraram mais de uma linha de visão, sendo que três obtiveram duas linhas, ou mais, no seguimento de três meses, dois melhoraram menos de uma linha e dois permaneceram estáveis, sem melhoras. Estudos anteriores e também com outras doenças demonstraram a possibilidade de melhora da visão com as células mononucleares. No estudo de Siqueira et al. (2011, 2013) observou-se melhora da visão nos cinco pacientes avaliados, apesar de o critério de inclusão ter sido pacientes com visão pior que 20/200 e doença mais avançada. Park et al. (2014) também evidenciaram melhora da AV nos seis pacientes avaliados com diagnósticos como doença de Stargardt, DMRI, oclusão de artéria e veia centrais da retina e RP. A melhora variou de 3 a 65 letras; enquanto que no presente estudo, variou de 3 a 19 letras.

A OCT não mostrou qualquer alteração na anatomia ou espessura. Provavelmente, porque a sensibilidade do domínio espectral não foi suficiente

para demonstrar pequenas alterações celulares. Considerando o efeito parácrino e de restabilização da vasculatura retiniana, a retina não apresentou aumento da espessura macular central e, sim, manutenção da sobrevivência das células em sofrimento ou recuperação da atividade celular, detectada em exames funcionais como ERG e microperimetria e não apenas em uma imagem mostrando o *status* anatômico como no OCT. Siqueira et al. (2011) também não observaram alteração na espessura macular. Park et al. (2014) realizaram a tomografia com o aparelho *Adaptive Optics*. Nesse sistema, a velocidade de aquisição da imagem é maior que o domínio espectral, reduzindo interferências e permitindo melhor imagem. Em três pacientes analisados, notou-se o aparecimento de imagens hiperreflectivas medindo o mesmo tamanho das células CD34+ nas camadas retinianas após um mês da injeção IV. Com seis meses houve diminuição desses depósitos nas camadas internas da retina e aumento nas camadas próximas ao EPR, sugerindo migração desses depósitos ou de células para esta camada. Cada ponto hiperreflectivo media aproximadamente o mesmo tamanho de uma célula CD34+ (~10 μ m).

A angiofluoresceinografia foi realizada em todos os pacientes. Um dos efeitos das HSC é promover a formação de vasos sanguíneos e melhorar a perfusão retiniana (Otani et al., 2004). A injeção de FMMO em camundongos possibilitou o resgate de células endoteliais (Dorrell et al., 2004; Otani et al., 2004). Nos dez pacientes estudados, não foram observadas alterações na perfusão macular. Em contrapartida, esse exame foi muito relevante para avaliar a segurança por meio da análise de crescimento de tumores ou formação de neovascularização coróideia, mostrando segurança nesse tempo de seguimento.

A microperimetria, por ser um importante e detalhado exame do local de fixação e de sua sensibilidade, foi realizada em todos os meses de seguimento. No primeiro mês, sete pacientes apresentaram melhora, enquanto dois mostraram leve declínio do limiar de sensibilidade. Com seis meses, nove pacientes apresentaram sensibilidade maior ao exame realizado pré-IV e com doze meses, cinco dos seis pacientes analisados também apresentaram melhora. Park et al. (2014) compararam a média do limiar de sensibilidade, em dB, da microperimetria nos cinco dos seis pacientes submetidos à injeção IV, com melhora da

sensibilidade em três deles, um permaneceu estável e dois apresentaram sensível declínio com seis meses de seguimento.

Ao correlacionar a área de hipoautofluorescência ou área de atrofia no IR com melhora na AV e na sensibilidade da microperimetria, ficou explícito que os pacientes com AG maior respondiam menos à terapêutica com células tronco. Nesse grupo, houve melhora dos parâmetros, porém sem significância estatística. Já o grupo com menor atrofia apresentou resultados mais significativos. Acredita-se que a terapia com FMMO poderia não só estabilizar o processo como diminuir a área de escotoma pelo resgate das células em sofrimento. Quando comparado esse efeito aos diversos medicamentos testados em estudos clínicos para DMRI seca, como vasodilatadores, neuroprotetores e antioxidantes, entre outros, verificou-se que, apesar de a resposta ainda estar distante da cura, a terapia com FMMO mostrou resultados mais animadores que os citados anteriormente (Taskintuna et al., 2016).

O tempo em que essas células permanecem intraocular e o seu tempo de ação continuam sem respostas. Neste estudo, a melhora da AV após a injeção se manteve até os doze meses em seis pacientes. Dois mostraram melhora só no primeiro mês e um manteve até os três meses. Um paciente apresentou comportamento atípico com melhora apenas aos nove meses. O resultado da microperimetria foi similar, mostrando melhora que se manteve, em média, até os doze meses. Park et al. (2012) demonstraram, por meio de análise imuno-histoquímica, a presença das células CD34+ incorporadas na vasculatura da retina de camundongos com isquemia aguda induzida um dia após a injeção IV e a permanência até seis meses. Posteriormente, Park et al. (2014), em estudo com humanos, detectaram, à OCT, a presença dessas células após um mês e a sua permanência na retina até a última avaliação, aos seis meses. O estudo Otani et al. (2004) foi um dos primeiros a demonstrar essa permanência das CHMO até seis meses após a injeção IV em camundongos. Caballero et al. (2007) também relataram que algumas das células CD34 da medula óssea têm a capacidade de se alojarem na retina danificada e na vasculatura da retina e se incorporam depois da administração IV.

Outra análise importante, foi realizada sobre a qualidade de vida aplicando-se o questionário VFQ-25. Siqueira et al. (2015a) já haviam realizado essa análise em vinte pacientes com RP e que receberam FMMO IV. Houve melhora significativa na qualidade de vida após seguimento de três meses. Os autores também observaram que a qualidade de vida estava diretamente relacionada com a sensibilidade macular. Picoto et al. (2015) aplicaram o questionário em um grupo de 68 pacientes com DMRI exsudativa, concluindo que apesar de os pacientes com doença binocular possuírem menor escore, não houve diferença para aqueles com acometimento unilateral. Relataram, ainda, que esses pacientes apresentaram piores resultados na avaliação da saúde geral, visão geral, saúde mental e atividades com necessidade de visão para longe, como ler placas de ruas, reconhecer a expressão das pessoas e descer escadas com pouca luz. Os resultados do presente estudo apontaram melhora da qualidade de vida ao seis meses, em especial nos critérios que abrangem a saúde mental e visão de cores. A saúde mental foi avaliada por meio de quatro questões sobre a tristeza devido a falta de visão, o receio de errar ao executar atividades que já praticava de rotina e de passar vergonha por confundir, por exemplo, o banheiro e o vaso sanitário, entre outros. Assim, na avaliação aos seis meses após IV, os pacientes se mostraram mais confiantes para executarem essas atividades. Este resultado é muito importante, pois a saúde mental foi o item que obteve menor escore (16%) entre os doze avaliados antes da terapia, pior que a visão de perto (31%), por exemplo. A visão de cores foi analisada por uma questão sobre a dificuldade de escolher e combinar a própria roupa. Apesar de muitos pacientes já não sentirem essa dificuldade, houve melhora significativa aos seis meses. Assim como no estudo de Siqueira et al. (2015a), houve correlação quanto à melhor sensibilidade na microperimetria e melhora expressiva na qualidade de vida aos seis meses. Verificou-se, também, correlação significativa e diretamente proporcional entre os pacientes com maior qualidade de vida e melhor AV e inversamente proporcional ao tamanho da lesão (hipoautofluorescência) na autofluorescência.

6. Conclusões

Após análise dos resultados concluiu-se que:

- As FMMO são seguras para uso IV em pacientes com DMRI seca avançada;
- Houve melhora significativa na acuidade visual nos olhos estudados;
- A microperimetria mostrou melhora significativa no limiar de sensibilidade no grupo com área de menor atrofia, reforçando a teoria do resgate funcional das células em sofrimento;
- Não houve significância na ERGmf;
- Observou-se melhora na qualidade de vida avaliada pelo questionário VFQ-25 em todos os quesitos, porém com significância apenas para saúde mental e visão de cores;

O estudo envolveu um número pequeno de pacientes. Maior casuística será necessária para melhor avaliação destes dados. Acredita-se que um estudo utilizando *adative optic* poderá fornecer maiores informações sobre o comportamento das células da retina frente a esta terapia, como também sobre a adesão das células implantadas na retina.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Elaboração de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 2 ed. São Paulo: SIBi/USP, 2009.

Adams MK, Chong EW, Williamson E, Aung KZ, Makeyeva GA, Giles GG et al. 20/20--Alcohol and age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2012;176(4):289-98.

Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group (AREDS2). Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA*. 2013a;309(19):2005-15.

Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group (AREDS2), Chew EY, SanGiovanni JP, Ferris FL, Wong WT, Agron E et al. Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report nº 4. *JAMA Ophthalmol*. 2013b;131(7):843-50.

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994; 331(22):1480-7.

Akuffo KO, Nolan J, Stack J, Moran R, Feeney J, Kenny RA, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the Republic of Ireland. *Br J Ophthalmol*. 2015;99:1037-44.

Alezzandrini A, Arévalo JF, Bafalluy J, Berrocal MH, Carpentier G C, Souza EC et al. Consenso latinoamericano sobre degeneração macular relacionada à idade. Cartagena de Indias, Colômbia: Sociedade Panamericana de Retina e Vítreo, 2012, 28p.

Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4251-5.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.

Ávila M. A retina do século XXI. *Arq Bras Oftalmol*. 2003;66:719-30.

Ávila M, Alves MR, Nishi M. As condições de saúde ocular no Brasil. 1ª Ed. São

Paulo: Conselho Brasileiro de Oftalmologia, 2015, 147p.

Banin E, Obolensky A, Idelson M, Hemo I, Reinhardt E, Pikarsky E et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):246-57.

Bertram KM, Baglione CJ, Phipps RP, Libby RT. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(5):200-10.

Boyer D, Freund KB, Regillo C, Levy MH, Garg S. Long-term (60-month) results for the implantable miniature telescope: Efficacy and safety outcomes stratified by age in patients with end-stage age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2015;9:1099-107.

Bull ND, Martin KR. Concise review: toward stem cell-based therapies for retinal neurodegenerative diseases. *Stem Cells*. 2011;29(8):1170-5.

Caballero S, Sengupta N, Afzal A, Chang KH, Li Calzi S, Guberski DL et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes*. 2007;56(4):960-7.

Casaroli-Marano RP, Alforja S, Giralt J, Farah ME. Epimacular brachytherapy for wet AMD: current perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1661-70.

Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, et al. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol*. 2014;2014:582842

Centro de Hematologia de São Paulo - Serviços|Procedimentos Especiais. Fontes de células mães. Disponível em: http://www.chsp.org.br/?page_id=26. Acesso em: 10/03/2016

Centurion V, Lacava AC, Caballero JC. Lente intraocular com cromóforo amarelo- resultados. *Rev Bras Oftal*. 2004;63(7-8):424-31.

Cheng AS, Yau TM. Paracrine effects of cell transplantation: strategies to augment

the efficacy of cell therapies. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;20(2):94-101.

Cheung CM, Wong TY. Is age-related macular degeneration a manifestation of systemic disease? New prospects for early intervention and treatment. *J Intern Med*. 2014;276(2):140-53.

Chiou SH, Kao CL, Peng CH, Chen SJ, Tarng YW, Ku HH et al. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(3):578-85.

Chong EW, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH. Alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Am J Ophthalmol*. 2008;145(4):707-715.

Christen WG, Glynn RJ, Chew EY, Albert CM, Manson JE. Folic acid, pyridoxine, and cyanocobalamin combination treatment and age-related macular degeneration in women: The women's antioxidant and folic acid cardiovascular study. *Arch Intern Med*. 2009;169(4):335-41.

Coco M, Baba NT, Sallum JMF. Avaliação da autofluorescência do fundo de olho nas distrofias de retina com o aparelho Heidelberg Retina Angiograph2. *Arq Bras Oftalmol*. 2007;70(5):739-45.

Colak E, Majkic-Singh N, Zoric L, Radosavljevic A, Kosanovic-Jakovic N. The role of CRP and inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(1):39-48.

Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, Rougier MB, Le Goff M, Dartigues JF, et al. Elevated high-density lipoprotein cholesterol and age-related macular degeneration: the Alienor study. *PLoS One* 2014;9(3):e90973.

Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-6.

Crisostomo PR, Markel TA, Wang Y, Meldrum DR. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery*. 2008;143(5):577-81.

Das AM, Zhao X, Ahmad I. Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources. *Semin Ophthalmol*. 2005;20(1):3-10.

Davis MD, Gangnon RE, Lee LY, Hubbard LD, Klein BE, Klein R et al. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(11):1484-98.

Dorrell MI, Otani A, Aguilar E, Moreno SK, Friedlander M. Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina. *Blood*. 2004;103(9):3420-7.

Ersoy L, Ristau T, Lechanteur YT, Hahn M, Hoyng CB, Kirchhof B et al. Nutritional risk factors for age-related macular degeneration. *Biomed Res Int*. 2014;2014:413150.

Ferraz EVAP, Lima CA, Cella W, Arieta CEL. Adaptação de questionário de avaliação da qualidade de vida para aplicação em portadores de catarata. *Arq Bras Oftalmol*. 2002;65:293-8.

Ferris FL, Davis MD, Clemons TE, Lee LY, Chew EY, Lindblad AS et al. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(11):1570-4.

Ferris FL 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K et al. Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(4):844-51.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.

Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology*. 1999;106(6):1049-55.

Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:151-71.

Furtado JM, Lansingh VC, Carter MJ, Milanese MF, Peña BN, Gherzi HA, et al. Causes of blindness and visual impairment in Latin America. *Surv Ophthalmol*. 2012;57(2):149-77.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88(2):167-74.

Gopinath B, Liew G, Burlutsky G, Mitchell P. Age-related macular degeneration and 5-year incidence of impaired activities of daily living. *Maturitas*. 2014;77(3):263-6.

Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med*. 2012;33(4):467-86.

Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002.8(6):607-12.

Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(11):5665-8.

Hanout M, Horan N, Do DV. Introduction to microperimetry and its use in analysis of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*. 2015;26(3):149-56.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361(15):1475-85.

Hood DC, Seiple W, Holopigian K, Greenstein V. A comparison of the components of the multifocal and full-field ERGs. *Vis Neurosci*. 1997;14(3):533-44.

Hood DC, Odel JG, Chen CS, Winn BJ. The multifocal electroretinogram. *J Neuroophthalmol*. 2003;23(3):225-35.

Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS et al. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol*.

2012;124(1):1-13.

Huang Y, Enzmann V, Ildstad ST. Stem cell-based therapeutic applications in retinal degenerative diseases. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):434-45.

Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, Mizuseki K, Haraguchi T, Miyoshi H. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(32):11331-6.

Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2007;85(2):234-41.

Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol.* 2008;86(20):225-6.

Kawa MP, Machalinska A, Roginska D, Machalinski B. Complement system in pathogenesis of AMD: dual player in degeneration and protection of retinal tissue. *J Immunol Res.* 2014;2014:483960.

Keenan TD, Goldacre R, Goldacre MJ. Associations between age-related macular degeneration, Alzheimer disease, and dementia: record linkage study of hospital admissions. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(1):63-8.

Khan M, Agarwal K, Loutfi M, Kamal A. Present and possible therapies for age-related macular degeneration. *ISRN Ophthalmol.* 2014;2014:608390.

Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Archives of Ophthalmology* 1998;116(12):1646-51.

Klein R, Klein BE, Tomany SC, Moss SE. Ten-year incidence of age-related maculopathy and smoking and drinking: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol.* 2002;156(7):589-98.

Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen- year

cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2007;114:253-62.

Klein R, Knudtson MD, Cruickshanks KJ, Klein BE. Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2008;126(1):115-21.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4):430-6.

Kupperman BD. Drug delivery implants for geographic atrophy. A number of sustained-delivery technologies are under study. *Retina Today*. 2012;65-68.

Landa G, Amde W, Doshi V, Ali A, McGevna L, Gentile RC, Muldoon TO et al. Comparative study of intravitreal bevacizumab (Avastin) versus ranibizumab (Lucentis) in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 2009;223(6):370-5.

Lechanteur YT, van de Camp PL, Smailhodzic D, van de Ven JP, Buitendijk GH, Klaver CC, et al. Association of Smoking and CFH and ARMS2 Risk Variants With Younger Age at Onset of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(5):533-41.

Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res Rev*. 2006;5(4):402-33.

Macular Photocoagulation Study Group. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol*. 1993 Sep;111(9):1200-9. Comment on: *Arch Ophthalmol*. 1994;112(7):874-5.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.

Mandelcorn MS, Podbielski DW, Mandelcorn ED. Fixation stability as a goal in the

treatment of macular disease. *Can J Ophthalmol*. 2013;48(5):364-7.

Mangione CM. The National Eye Institute 25-Item Visual Function Questionnaire (VFQ-25) Versão 2000. Scoring Manual, 2000. Disponível em: www.nei.nih.gov/resources/visionfunction/manual_cm2000.pdf. Acesso em: 10/03/2014

Mansour AM, Ghadban SA, Yunis MH, Sabban M. Ziv-aflibercept in macular disease. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(8):1055-9.

Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Meldrum DR. Activation of individual tumor necrosis factor receptors differentially affects stem cell growth factor and cytokine production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(4):G657-62.

Mattos RAB. Avaliação de qualidade visual e de vida de pacientes portadores de ametropias. Tese (Doutorado). 2001. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo. 2001.

Mavija M, Alimanovic E, Jaksic V, Kasumovic SS, Cekic S, Stamenkovic M. Therapeutic Modalities of Exudative Age-related Macular Degeneration. *Med Arh*. 2014;68(3):204-8.

Mead B, Berry M, Logan A, Scott RA, Leadbeater W, Scheven BA. Scheven. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res*. 2015;14(3):243-57.

Medina NH. Epidemiologia do envelhecimento: estudo oftalmológico populacional de idosos. 1997. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo. 1997.

Metelitsina TI, Grunwald JE, DuPont JC, Ying GS. Effect of Viagra on the foveolar choroidal circulation of AMD patients. *Exp Eye Res*. 2005;81(2):159-64.

Meyer JS, Katz ML, Kirk MD. Stem cells for retinal degenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1049:135-45.

Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host

photoreceptors. *Stem Cells*. 2006;24(2):274-83.

Minamino K, Adachi Y, Yamada H, Higuchi A, Suzuki Y, Iwasaki M et al. Long-term survival of bone marrow-derived retinal nerve cells in the retina. *Neuroreport*. 2005;16(12):1255-9.

Mitchell P, Korobelnik JF, Lanzetta P, Holz FG, Pruenste C, Schmidt-Erfurth UM et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(1):2-13.

Muñoz B, Klein R, Rodriguez J, Snyder R, West SK. Prevalence of age-related macular degeneration in a population-based sample of Hispanic people in Arizona: Proyecto VER. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(11):1575-80.

National Eye Institute (NEI). Age-Related Macular Degeneration (AMD), 2014. Disponível em: <https://nei.nih.gov/health/maculardegen>. Acesso em: 14/04/2016.

Nowak SP, van den Bergh H, Sickenberg M, Koh AH. Photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2013;37:182-99.

Obisesan TO, Hirsch R, Kosoko O, Carlson L, Parrott M. Moderate wine consumption is associated with decreased odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1. *J Am Geriatr Soc*. 1998;46(1):1-7.

Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 2008;26(4):1047-55.

Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2008;26(2):215-24.

Otani A, Kinder k, Ewalt k, Otero FJ, Schimmel P, Frindlander M. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med*. 2002; 8(9):1004-10.

Otani A, Dorrel MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E et al. Rescue of retina degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-

negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest*. 2004;114(6):765-74.

Park SS, Caballero S, Bauer G, Shibata B, Roth A, Fitzgerald PG et al. Long-term effects of intravitreal injection of GMP-grade bone marrow derived CD34⁺ Cells in NOD-SCID mice with acute ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):986-94.

Park SS, Bauer G, Abedi M, Pontow S, Panorgias A, Jonnal R. Intravitreal autologous bone marrow CD34⁺ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):81-9.

Park SS, Moisseiev E, Bauer G, Anderson JD, Grant MB, Zam A, Zawadzki RJ, Werner JS, Nolta JA. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction. *Prog Retin Eye Res*. 2016;pii:S1350-9462(16)30049-0. [Epub ahead of print].

Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(6):805-18.

Picoto M, Galvea J, Patrício S, Rodrigues A, Vaz F. Qualidade de vida relacionada com a visão em pacientes com degeneração macular relacionada à idade neovascular. *Rev Bras Oftalmol*. 2015;74(4):216-21.

Pinheiro DP, Rosa MLG, Velarde LGC, Lomelino JP, Knopp PER, Ventura MP. Qualidade de vida em portadores de glaucoma: comparação entre pacientes do sistema público de saúde e clínica privada. *Rev Bras Oftalmol*. 2010;69(6):378-82

Queiroz JM; Queiroz JMJ; Queiroz FJC. Age-related macular degeneration: histopathological considerations. *Rev Bras Oftalmol*. 2010;69(6):400-6.

Rosenfeld PJ, Rich RM, Lalwani GA. Ranibizumab: Phase III clinical trial results. *Ophthalmol Clin North Am*. 2006;19(3):361-72.

Sancho-Tello M, Muriach M, Barcia J, Bosch-Morell F, Genovés JM, Johnsen-Soriano S et al. Chronic alcohol feeding induces biochemical, histological, and functional alterations in rat retina. *Alcohol Alcohol*. 2008;43(3):254-60.

Schmidt-Erfurth U, Rudolf M, Funk M, Hofmann-Rummelt C, Franz-Haas NS, Aherrahrou Z et al. Ultrastructural changes in a murine model of graded Bruch membrane lipoidal degeneration and corresponding VEGF164 detection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):390-8.

Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM et al. Embryonic stem cell trials for & macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012;379(9817):713-20.

Schwartz SD, Tan G, Hosseini H, Nagiel A. Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(5):ORSFc1-9.

Schwindt TT, Barnabé GF, Mello LEAM. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocirurg*. 2005;16(1):13-19.

Seddon JM, Reynolds R, Maller J, Fagerness JA, Daly MJ, Rosner B. Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2044-53.

Simão LM, Lana-Peixoto MA, Araújo CR, Moreira MA, Teixeira AL. The brazilian version of the 25-Item National Eye Institute Visual Function Questionnaire: translation, reliability and validity. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(4):540-6.

Siqueira RC, Voltarelli JC, Messias AM, Jorge R. Possible mechanisms of retinal function recovery with the use of cell therapy with bone marrow-derived stem cells. *Arq Bras Oftalmol*. 2010;73(5):474-9.

Siqueira, RC. Stem cell therapy for retinal diseases: update. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(6):50.

Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R: Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina*. 2011;31(6):1207-14.

Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Messias K, Arcieri RS, Jorge R. Resolution of macular edema associated with retinitis pigmentosa after intravitreal use of

autologous BM-derived hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(4):612-3.

Siqueira R. Células tronco para tratamento de doenças da retina - Estudos clínicos. *Rev Univ Vis.* 2015;87:48-50.

Siqueira RC, Messias A, Messias K, Arcieri RS, Ruiz MA, Souza NF et al. Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell-clinical trial). *Stem Cell Res Ther.* 2015a;6:29.

Siqueira RC, Messias A, Gurgel VP, Simões BP, Scott IU, Jorge R. Improvement of ischaemic macular oedema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived haematopoietic stem cells. *Acta Ophthalmol.* 2015b;93(2):e174-6.

Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N, Gallins P, Agarwal A, Iannaccone A et al. Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2011;6(3):e17784.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.

Taleb A, Faria MAR, Ávila M, Mello PAA. As condições de saúde ocular no Brasil. 1ª Ed. São Paulo: Conselho Brasileiro de Oftalmologia, 2012, 162p.

Taskintuna I, Elsayed MEAA, Schatz P. Update on clinical trials in dry age-related macular degeneration. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2016;23(1):13-26.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998;282(5395):1827.

Tibbetts MD, Samuel MA, Chang TS, Ho AC. Stem cell therapy for retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012;23(3):226-34.

Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*. 2004;111(7):1280-7.

Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*. 2002;20(4):279-83.

Torres RJ, Maia M, Noronha L, Farah ME, Luchini A, Brik D, et al. Evaluation of choroid and sclera early alterations in hypercholesterolemic rabbits: histologic and histomorphometric study. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(1):68-74.

Torres RJ, Luchini A, Torres Rdo R, Oliveira LR, Torres CL, Torres RA et al. Effect of candesartan on the expression of sclera-choroidal intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic models. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(2):145-9.

Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(10):1329-45.

Veleri S, Lazar CH, Chang B, Sieving PA, Banin E, Swaroop A. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Dis Model Mech*. 2015;8(9):109-29.

Verteporfin in Photodynamic Therapy Study Group. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol*. 2001;131(5):541-60.

Vugler A, Lawrence J, Walsh J, Carr A, Gias C, Semo M et al. Embryonic stem cells and retinal repair. *Mech Dev*. 2007;124(11-12):807-29.

Wong TY, Chakravarthy U, Klein R, Mitchell P, Zlateva G, Buggage R et al. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2008;115(1):116-26.

Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(2):e106-16.

World Health Organization Quality of Life Group. Development of the WHOQOL: Rationale and current status. *Int J Ment Health*. 1994;23(1):24-56.

Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(7):623-31.

Yehoshua Z, de Amorim Garcia Filho CA, Nunes RP, Gregori G, Penha FM, Moshfeghi AA et al. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: The COMPLETE study. *Ophthalmology*. 2014;121(3):693-701.

Zhao X, Liu J, Ahmad I. Differentiation of embryonic stem cells to retinal cells in vitro. *Methods Mol Biol*. 2006;330:401-16.

8. Anexos

ANEXO A

COMPROVANTES DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Cont. Parecer CONEP n° 015/11 P. 04

apreciado se estiver instruído com os seguintes documentos, em português: (...) descrição da pesquisa, compreendendo os seguintes itens: (...) orçamento financeiro detalhado da pesquisa: recursos, fontes e destinação, bem como a forma e o valor da remuneração do pesquisador." O orçamento detalhado apresentado (páginas 45 e 46 da numeração do CEP) não informa qual a fonte financiadora do projeto. Solicita-se adequação.

Resposta: A fonte financiadora do projeto será o Centro de Pesquisa Rubens Siqueira (realizada a inclusão no projeto – destaque em amarelo e carta de patrocínio anexo).

Análise: Pendência atendida.

3. Com relação ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (páginas 59-63 da numeração do CEP):

a. Se, por questões de configuração, a página de assinaturas do TCLE se apresentar em uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável legal nas demais folhas dos TCLE, considerando-se a proteção do sujeito, bem como do pesquisador. Solicita-se adequação.

Resposta: Inserimos os números das páginas no TCLE permitindo a rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável legal em todas as páginas.

Análise: Pendência atendida.

b. Não consta a informação no TCLE de que será emitido em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o sujeito de pesquisa (item IV.2."d" da Resolução CNS 196/96). Solicita-se adequação.

Resposta: Realizamos a inclusão no TCLE a seguinte sentença: conforme solicitada: Este documento possui 2 vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o sujeito de pesquisa (item IV.2 "d" da resolução 196/96).

Análise: Pendência atendida.

c. O modelo não possui numeração em suas páginas, o que pode comprometer a integridade das informações contidas no documento (retirada ou adição de páginas). Solicita-se adequação.

Resposta: O TCLE contém agora páginas numeradas e identificação dos itens.

Análise: Pendência atendida.

d. O TCLE deve ser escrito em linguagem simples e clara ao participante. Frases longas podem dificultar a compreensão de alguns sujeitos de pesquisa. Por exemplo: "O motivo que nos leva a estudar a utilização das células-tronco nas doenças degenerativas da retina é o fato de que estas doenças até o momento não possuem tratamento eficaz comprovado e é uma das maiores causas de cegueira no mundo, a pesquisa se justifica, portanto numa possibilidade de tratamento destas doenças". Solicita-se rever toda a redação do TCLE.

4/5 el/db

Cont. Parecer CONEP nº 015/11

Resposta: O TCLE foi revisto e adequado a linguagem que possa os pacientes entender.

Análise: Pendência atendida.

- e. A Resolução 196/96 descreve em seu parágrafo V, item 5 que: "Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade. (...) O pesquisador, o patrocinador e a instituição devem assumir a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos." Assim, o TCLE deve incluir informação ao paciente sobre a responsabilidade do pesquisador em oferecer antibiótico no caso de infecção ocular, garantir cirurgia no caso de deslocamento de retina e assistência integral se ocorrer outras possíveis complicações. Solicita-se adequação.

Resposta: Foi incluído no TCLE a responsabilidade do investigador em dar atendimento ao paciente.

Análise: Pendência atendida.

- f. O protocolo em presente análise intenta tratar indivíduos portadores de degeneração macular com redução considerável em sua acuidade visual. Assim, se faz necessário incluir procedimentos para informar o paciente sobre o estudo e garantir que o TCLE seja lido por alguém indicado ou por responsável legal, no caso da impossibilidade de leitura. No protocolo não consta como será obtido e registrado o consentimento do participante com pouca ou insuficiente acuidade visual. Solicita-se adequação.

Resposta: Quando o paciente estiver impossibilitado de compreender o TCLE será lido e acompanhado pelo representante legal que assinará o TCLE juntamente com paciente.

Análise: Pendência atendida.

- g. No TCLE deve constar de forma clara e objetiva a identificação do pesquisador responsável, os telefones para contato de cada local onde serão recrutados participantes e onde serão coletados os dados. Solicita-se adequação.

Resposta: Encontra-se no TCLE a localização do investigador principal, comitê de ética e CONEP.

Análise: Pendência atendida.

- h. No TCLE apresentado, o número de telefone do CEP que acompanha o estudo não é o mesmo do número observado em documentos produzidos pelo CEP em questão. Solicita-se adequação.

Resposta: Encontra-se no TCLE a localização do CEP.

Análise: Pendência atendida.

Cont. Parecer CONEP nº 015/11

- I. O TCLE traz a informação: "Telefone comitê de ética de Brasília: (61) 3315-2150." Não existe um comitê de ética de Brasília, por esta razão, informamos que não deve haver qualquer referência a CEP em Brasília no TCLE.

Resposta: Foram retirados os dados da CONEP do TCLE.

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

OBS: No Brasil está prevista a participação dos seguintes centros: O estudo será realizado Centro de Pesquisa Rubens Siqueira/São José do Rio Preto, Faculdades Integradas Padre Albino – Curso de Medicina Fundação Padre Albino/Catanduva e Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da Infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 18 de janeiro de 2011.

Cyelle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E SCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Utilização de células tronco derivadas da medula óssea em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade (estudo prospectivo de 10 casos)

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS

O motivo que nos leva a estudar a utilização das células tronco nas doenças degenerativas da retina é o fato de que estas doenças até o momento não possuem tratamento eficaz comprovado e é uma das maiores causas de cegueira no mundo, à pesquisa se justifica, portanto numa possibilidade de tratamento destas doenças.

Este estudo visa utilizar células tronco derivadas da medula óssea em pacientes portadores de doenças degenerativas da retina com objetivo de avaliar se este tratamento pode alterar e/ou melhorar o funcionamento da retina. Esta avaliação será realizada através de exames específicos tais como: medida da acuidade visual, tomografia da retina, microperimetria e eletrorretinograma).

O procedimento será da seguinte forma: Inicialmente, será feita a retirada das células tronco da medula óssea através de uma punção por agulha no osso da bacia, onde será retirado de 5 a 10 ml de medula óssea. Este material será processado no laboratório e a seguir injetado no olho (intravítreo) com anestesia local (colírio anestésico).

O local da aspiração da medula óssea poderá ficar dolorido por alguns dias, poderá inchar por derramamento de sangue (hematoma) e, muito raramente, poderá infeccionar. Quanto à injeção ocular, poderão ocorrer as seguintes complicações:

Durante a injeção poderá ocorrer hemorragia ocular que pode ocorrer tanto fora como dentro do olho e dor no momento da injeção (geralmente discreta). Após a injeção é esperado sentir a visão embaçada por alguns dias até semanas. Existe o risco após a injeção de infecção ocular (será necessário tratamento com antibióticos aplicados no olho), descolamento da retina (será necessária uma cirurgia para correção do descolamento e o paciente correrá o risco de perda visual) e a visão embaçada de forma permanente.

O paciente será examinado no dia seguinte a injeção, um, três e seis meses após a injeção (estes exames são: acuidade visual, angiofluoresceinografia, eletrorretinografia, microperimetria e tomografia de coerência óptica).

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS

Existe um desconforto e risco mínimo para a você que se submeter ao implante de células tronco como infecção intraocular, hemorragia, descolamento da retina, atrofia ocular. A possibilidade de benefícios são remotas, mas este estudo poderá trazer informações que serão benéficas futuramente para o tratamento desta doença.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Você será acompanhado semanalmente com exames oftalmológicos especializados como mapeamento de retina, tomografia de coerência óptica,

angiofluoresceinografia e eletrorretinografia.

Você poderá comunicar em nosso serviço a qualquer hora caso apresente algum efeito adverso e será prontamente atendido sem qualquer custo Dra Carina Costa Cotrim no Hospital das Clínicas de Ribeirão preto.

O seguimento do paciente será realizado durante todo o período da pesquisa.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no centro de pesquisa Rubens Siqueira e na Unidade de terapia celular do IMC de São José do Rio Preto e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS

A participação no estudo não acarretará custos sendo que este será ressarcido e indenizado por eventuais danos.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O(a) professor(a) orientador(a) Rubens Camargo Siqueira certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisador Dra Carina Costa Cotrim, 7799621074. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Telefone comitê de ética da Faculdade de medicina de Catanduva: (17) 35313229

Telefone comitê de ética de Brasília : (61) 33152150

_____ Nome	_____ Assinatura do Participante	_____ Data
_____ Nome	_____ Assinatura do Pesquisador	_____ Data
_____ Nome	_____ Assinatura da Testemunha	_____ Data

ANEXO C

Questionário de Qualidade de Vida; NEI- VFQ-25

PARTE 1 - SAÚDE GERAL E VISÃO			
1- Como você acha que está a sua saúde?		3- Você tem se preocupado com sua visão?	
Excelente	1	Não	1
Muito boa	2	Um pouco	2
Boa	3	Algumas vezes	3
Satisfatória	4	A maior parte do tempo	4
Ruim	5	O tempo todo	5
2- Como você acha que está a sua visão (com óculos ou lentes de contato, se usuário)?		4 - Você tem sentido dor ou desconforto nos seus olhos (por ex.: coceira, queimação, dor)? Sim ou não? Esta dor ou desconforto é:	
Excelente	1	Nada	1
Boa	2	Suave	2
Satisfatória	3	Moderada	3
Ruim	4	Severa	4
Muito ruim	5	Muito severa	5
Completamente cego	6		
PARTE 2: DIFICULDADES COM AS ATIVIDADES DIÁRIAS			
5- Você tem dificuldade para ler jornal, livro ou revista?		12- Quanta dificuldade você tem em escolher e combinar sua própria roupa?	
Não tenho dificuldade	1	Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2	Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3	Dificuldade moderada	3
Extrema dificuldade	4	Extrema dificuldade	4
Deixou de ler devido a visão	5	Deixou de fazer devido a visão	5
Deixou de ler por outros motivos, ou não se interessa por leitura	6	Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6
6- Você tem dificuldade para cozinhar, costurar ou ver coisas de perto?		13- Você tem dificuldade, por causa da visão, para reunir-se com os amigos ou parentes em suas casas, em festas ou em reuniões?	
Não tenho dificuldade	1	Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2	Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3	Dificuldade moderada	3
Extrema dificuldade	4	Extrema dificuldade	4
Deixou de fazer devido a visão	5	Deixou de fazer devido a visão	5
Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6	Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6
7- Por causa da sua visão, você tem tido dificuldade para achar coisas quando se encontram misturadas a outros objetos (talher, sapato, roupa)?		14- Devido a sua visão, você tem dificuldade de ir ao cinema ou eventos esportivos, como futebol?	
Não tenho dificuldade	1	Não tenho dificuldade	1
Pouca dificuldade	2	Pouca dificuldade	2
Dificuldade moderada	3	Dificuldade moderada	3
Extrema dificuldade	4	Muita dificuldade	4
Deixou de fazer devido a visão	5	Deixou de fazer devido a visão	5
Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6	Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso	6

8 - Você tem dificuldade para ler placas na rua ou nomes de loja? Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4 Deixou de fazer devido a visão 5 Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6	15- Você dirige, mesmo que de vez em quando? SIM 1- (vá para questão 15c) NÃO 2 15a- Você nunca dirigiu ou desistiu de dirigir? NUNCA DIRIGIU 1 (vá para a parte 3, questão 17) DESISTIU DE DIRIGIR 2
9- Você tem tido dificuldade para descer escadas com pouca luz? Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4 Deixou de fazer devido a visão 5 Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6	15b- Se você desistiu, foi devido à visão, por outras razões ou as duas coisas ao mesmo tempo? PRINCIPALMENTE PELA VISÃO 1 (vá para a parte 3, questão 17) POR OUTROS MOTIVOS 2 (vá para a parte 3, questão 17) PELA VISÃO E OUTROS MOTIVOS 3 (vá para a parte 3, questão 17)
10- Você tem tido dificuldade para enxergar os objetos a seu lado quando você está andando sozinho (anda tropeçando nas coisas?) Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4 Deixou de fazer devido a visão 5 Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6	15c- Você tem dificuldade para dirigir, durante o dia, em lugares conhecidos? Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4
11- Devido a sua visão , quanta dificuldade você tem em ver como as pessoas reagem as coisas que você diz (sua expressão facial)? Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4 Deixou de fazer devido a visão 5 Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6	16 - Você tem dificuldade para dirigir durante a noite? Não tenho dificuldade 1 Pouca dificuldade 2 Dificuldade moderada 3 Extrema dificuldade 4 Deixou de fazer devido a visão 5 Deixou de fazer por outros motivos, ou não se interessa por isso 6
PARTE 3: QUESTÕES PARA PROBLEMAS VISUAIS	
17- Você tem menos sucesso na sua profissão ou na vida como gostaria de ter devido a visão? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5	22- Você tem sentido receio de fazer coisas que estava acostumado a fazer (cozinhar, lavar roupa, trabalhar com ferramentas etc.) por causa da visão? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5

18- Você se acha limitado para trabalhar ou realizar outras atividades por causa da visão? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5	23- Você, por causa da visão, depende do que as outras pessoas falam? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5
19- Você sente desconforto nos olhos ou em volta deles (por ex.: queimação, coceira, dor) que faz você deixar de fazer coisas que gosta? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5	24- Por causa da sua visão, você tem precisado da ajuda dos outros? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5
20- Você fica muito tempo em casa por causa da sua visão? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5	25- Por causa da sua visão, você tem tido receio de fazer as coisas com medo de passar vergonha, p.e. entrar no banheiro errado, não falar com pessoas conhecidas, urinar fora do sanitário etc.? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5
21- Você tem se sentido triste por causa da sua visão? Sempre 1 A maioria das vezes 2 De vez em quando 3 Poucas vezes 4 Nunca 5	

SUBGRUPOS DAS QUESTÕES DO VFQ

Subdomínio	Número de itens	Questões
Saúde geral	1	1
Visão	1	2
Dor ocular	2	4, 19
Atividades para perto	3	5, 6, 7
Atividades para longe	3	8, 9, 14
Aspectos sociais	2	11, 13
Saúde mental	4	3, 21, 22, 25
Atividades da vida diária	2	17, 18
Dependência	3	20, 23, 24
Capacidade para dirigir automóveis	2	15c, 16
Visão de cores	1	12
Visão periférica	1	10