**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 Distrofia Macular tipo
Stargardt**

RIBEIRÃO PRETO

2019

CARINA COSTA COTRIM

**Uso intravítreo de fração mononuclear da medula
óssea (FMMO) contendo células CD34+ em
pacientes portadores de Distrofia Macular tipo
Stargardt**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

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

**Orientador: Prof. Dr. Rubens
Camargo Siqueira**

RIBEIRÃO PRETO

2019

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 Distrofia Macular tipo Stargardt. / Carina Costa Cotrim; Orientador, Rubens Camargo Siqueira. Ribeirão Preto. - 2019.

117p.: 28il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Áudio-Vestibular. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

1. Distrofia de Stargardt. 2. Células tronco. 3. Células hematopoiéticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Cotrim, Carina Costa

Título: Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de Distrofia Macular tipo Stargardt.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

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

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Ademir e Graça, pela dedicação e esforço em investir nos meus estudos. Saiba que a minha maior felicidade é ver vocês felizes e orgulhosos ao ver onde cheguei.

Agradecimentos

Mais uma vez, encontro-me na honrosa missão de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram nessa longa caminhada. Reitero, que em todas as nossas conquistas, é impossível alcançá-las sozinho. Nosso crescimento vai além de um esforço próprio, mas das pessoas que nos cruzam e que nos norteiam, nos confortam, nos ensinam e, dessa forma, nos fazem crescer. Deixo, então, os meus sinceros agradecimentos àqueles que me ajudaram nesta valiosa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar Voltareli (in memoriam), que apesar de ter nos deixado precocemente, conseguiu passar a missão de estudar as células tronco para doenças incuráveis, mesmo enfrentando inúmeras adversidades.

Ao Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira, o meu mentor, o idealizador desse sonho. Agradeço mais uma vez a oportunidade de me dar a honra de ser uma pesquisadora da sua equipe, pois tinha certeza que levaria com afinco as suas idéias inovadoras muitas vezes vistas com olhar cético por muito colegas. Que essa sua criatividade nunca evaneça e que a intenção de cuidar do próximo sempre prevaleça. Sentirei saudades das nossas conversas.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, a quem devo o rumo que minha vida profissional seguiu. Me deu a oportunidade de ingressar no serviço de Retina elencando entre os melhores do país, me ensinou e permitiu que tivesse acesso ao tão sonhado doutorado.

Ao Prof. Dr. André M. Vieira Messias, quem eu admiro muito como profissional e que esteve sempre disposto a me receber e ficar horas fazendo todas as análises estatísticas possíveis. Obrigada pela parceria.

Aos funcionários do Serviço de Retina e Vítreo do HCRP, em especial à Lucélia Albieri, pelo comprometimento com os pacientes e colaboração na realização dos diversos exames.

Aos meus colegas *fellows* da retina, pelo incentivo, apoio e pela amizade que nos mantém ainda muito unidos mesmo agora distantes.

Aos profissionais do Setor de Terapia Celular do Hemocentro do HC, pelo seu conhecimento técnico e profissional que foram fundamentais para separação das células utilizadas na pesquisa.

À equipe do Transplante de Medula Óssea (TMO), cuja colaboração foi fundamental na coleta da medula óssea dos pacientes em estudo.

Aos meus queridos pacientes que, na esperança de novos tratamentos, concordaram em participar desta pesquisa, se deslocando de outras cidades e por muitas ocasiões. Obrigada pela importante colaboração!

Aos colegas do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial à Maria Cecília Onofre, pelo comprometimento e pelas orientações constantes.

Aos residentes, *fellows* e colegas do Hospital Governador Celso Ramos -SC, por permitirem vivenciar o mundo acadêmico. Mal sabem que aprendi mais que ensinei...

Ao Hospital de Olhos de Florianópolis e Clínica Catarinense de Olhos, que mesmo sem me conhecer, me acolheram e permitiram exercer a minha profissão.

À Dra. Cláudia Nascimento, que foi minha mestre na vida real, apoiou e me fez crescer e me tornar uma profissional ainda melhor. Minha gratidão eterna!

À minha família do Sul, minha Sogra Edi, meu sogro Nelson, minha cunhada Nelise e ao Léo, meu sobrinho, por compartilhar momentos de lazer, churrascos e pelo apoio emocional.

À minha irmã Carolina, meu exemplo de bondade e fé em Deus e ao meu cunhado Luciano, pelo exemplo da vida acadêmica, de dedicação e por muitas vezes corrigir meus textos mesmo sendo de uma área completamente diferente.

Aos meus sobrinhos filhos, Livia e Heitor, que me fazem ver o mundo de forma mais leve.

Aos meus pais, Graça e Ademar, que desde pequena me diziam que minha maior herança seria os meus estudos e investiram nisso e vibram comigo com todas as conquistas.

À minha mãe Graça, pelo amor infinito e dedicação aos filhos. Pelo exemplo maior de altruísmo que influenciou muito na minha criação e me fez uma pessoa melhor.

Ao meu filho João Pedro, que enche os meus dias de alegria e meu coração do mais puro amor. Esteve presente na defesa do mestrado há dois anos, ainda na barriga, e já veio ao mundo assistindo que é preciso se esforçar para crescer, é preciso estudar, trabalhar e com certeza me verá com muito orgulho no futuro...

Ao meu filho, Vicente, mais um presente divino, que, para não quebrar a tradição, assistirá à defesa ainda na barriga. Os filhos acalmam os nossos corações.

Ao meu esposo Luiz Fernando, pelo amor, apoio e principalmente por compreender, sem nunca questionar, a vida agitada que levo como médica, mãe, esposa e doutoranda. Você foi fundamental em todas as conquistas!

Epígrafe

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

Apoio Financeiro

Agradeço à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

Resumo

Cotrim CC. **Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de Distrofia Macular tipo Stargardt.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2019.

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 Distrofia Macular do tipo Stargardt (DMS). **Casuística e Métodos:** Foram avaliados 10 pacientes com Distrofia de Stargardt com acuidade visual no pior olho $\leq 20/125$. 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. Foi realizada injeção simulada (Sham) no olho contralateral. 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, eletrorretinografia multifocal (ERGmf) e de Campo Total, autofluorescência e Tomografia de coerência óptica (OCT). Também foi realizada angiografia fluoresceínica antes da injeção, seis e doze meses após. **Resultados:** Todos concluíram seis meses de avaliação e oito completaram nove meses e seis pacientes finalizaram os 12 meses. A média da acuidade visual antes da injeção intravítrea no olho tratado foi de 1,1 logMAR (20/250), em um e três meses após a injeção IV foi de 0,96 logMAR (20/200⁺²) e 0,92 logMAR (20/160⁻¹), respectivamente; No olho não tratado, a média da AV no *baseline* foi de 1,0 logMAR (20/200) e com um e três meses foi de 0,96 logMAR (20/200+2), 0,94 logMAR (20/160-2), respectivamente. A AV no *baseline* no grupo T variou entre a melhor e pior acuidade, respectivamente, entre 20/125-1 a 20/640+2, passando para 20/100+2 e 20/400 no primeiro mês. No grupo NT, a acuidade visual variou no *baseline* de 20/100+2 a 20/400, 20/100 a 20/400 com um, Houve diferença estatisticamente significativa no grupo tratado em todos os seguimentos. No grupo não tratado, não houve diferença significativa. Em relação à média da sensibilidade da microperimetria, apesar da melhora em todos os meses, a diferença significativa ocorreu apenas no primeiro mês pela análise do teste T ($p < 0,01$) e com doze meses na covariância ($p < 0,0097$). No olho NT, não houve diferença significativa em nenhuma análise. A angiofluoresceinografia não apresentou crescimento de neovasos ou tumores. Os demais exames foram utilizados para auxílio diagnóstico. **Conclusão:** Os resultados indicam que o uso de FMMO intravítreo em pacientes com Distrofia de Stargardt é seguro e está associado à melhora da acuidade visual e microperimetria no olho tratado em comparação ao olho não tratado.

Palavras-chave: Distrofia de Stargardt, Células tronco, Células hematopoiéticas.

Abstract

Cotrim, CC. **Intravitreal use of bone marrow mononuclear fraction containing CD34+ stem cells in patients with Stargardt Macular Dystrophy.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2019.

Objectives: To assess the therapeutic potential and the safety of the intravitreal use of a bone marrow mononuclear fraction (BMMF) containing CD34+ cells for patients with Stargardt's type Macular Dystrophy. **Casuistic and Methods:** The study was conducted on 10 patients with Stargardt's Dystrophy with worse eye visual acuity of $\leq 20/125$. A bone marrow aspirate was obtained from all patients and, after the material was processed at the blood center, 0.1 ml of intravitreal BMMF was injected into the eye with worse acuity. A sham injection was performed in the contralateral eye. The patients were evaluated at baseline and 1, 3, 6, 9 and 12 months after the injection. All patients were submitted to measurement of best corrected visual acuity (BCVA), microperimetry, multifocal and Full-Field electroretinography (ERGmf), autofluorescence, and Optical Coherence Tomography (OCT). Angiography was also performed before and six and 12 months after the injection. **Results:** All patients concluded six months of evaluation, eight completed nine months, and six finalized 12 months of study. Mean visual acuity was 1.1 logMAR (20/250) before intravitreal injection in the treated eye and 0.96 logMAR (20/200⁺²) and 0.96 logMAR (20/200⁺²), respectively, one and three months after IV injection. In the untreated eye, mean VA was 1.0 logMAR (20/200) at baseline and 0.96 logMAR (20/200+2) and 0.94 logMAR (20/160-2) after one and three months, respectively. At baseline, the VA of the T group varied between the best and the worst acuity, 20/125-1 to 20/640+2, respectively, changing to 20/100+2 and 20/400 after the first month. In the untreated group, VA varied from 20/100+2 to 20/400. at baseline and from. 20/100 to 20/400 after one month. There was a statistically significant difference for the treated group at all follow-up times, whereas no significant difference was observed in the untreated group. Regarding the mean sensitivity of microperimetry, despite improvement throughout the months, a significant difference occurred only during the first month as determined by the T-test ($p < 0.01$) and at 12 months using covariance ($p < 0.0097$). No significant difference was detected in the untreated eye at any time point. Angiofluoresceinography did not reveal neovessel or tumor growth. The remaining exams were used for diagnostic help. **Conclusions:** The results indicate that the use of intravitreal BMMF in patients with Stargardt's dystrophy is safe and is associated with improved VA and microperimetry in the treated eye compared to the untreated one.

Key-words: Stargardt's dystrophy. Stem cells. Hematopoietic cells.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Ilustração resumida do ciclo visual.....	29
Figura 2 -	(A) da esquerda para a direita, retinografia de um paciente sem doença e, em seguida, pacientes com progressiva diminuição da função do ABCA4. (B) efeito da redução da função do ABCA4 na ERG de campo total. (C) aumento dos bifenoides nos seguimentos externos dos fotorreceptores. Quanto maior a deficiência do ABCA4, maior será o acúmulo dos bisfenoides e maior também a perda de fotorreceptores. Na Doença de Stargardt há deficiência parcial do ABCA4 e menor perda de células, em seguida a distrofia de cones e bastonetes e, por último, a ausência completa dessa proteína na retinose pigmentar	31
Figura 3 -	Retinografia do olho direito de paciente com Stargardt mostrando <i>flecks</i> maculares e área circunscrita foveal de atrofia do EPR.....	32
Figura 4 -	Retinografia de uma paciente com seis anos e diagnóstico de Stargardt	33
Figura 5 -	A imagem acima representa o olho direito da paciente #4, sexo feminino, 34 anos, acuidade visual de 20/125. (A) exame de <i>InfraRed</i> , com imagem de hiperreflectância central correspondendo à área de atrofia macular na região central. (B) exame de autofluorescência mostrando área central de hipoautofluorescência e pontos ao redor de hiperautofluorescência no local dos <i>flecks</i> . (C) exame de angiofluoresceinografia mostrando o “silêncio coroideo”, e áreas de hiperfluorescência por defeito em janela	35
Figura 6 -	Exame da paciente #4. (A) <i>InfraRed</i> . (B) corte do OCT de mácula mostrando atrofia importante das camadas retinianas na topografia da fóvea. (C) exame de autofluorescência	36
Figura 7 -	Esquema ilustrando os principais tipos de células tronco. 1) Células tronco embrionárias (ESC); 2) Células progenitoras da retina; 3) Células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs); 4) Células hematopoiéticas derivadas da medula óssea; 5) Células tronco mesenquimais (MSC). Tecido adiposo, cordão umbilical e medula óssea podem originar tanto células mesenquimais como células tronco hematopoiéticas. Os principais estudos com as MSCs são pré-clínicos	42
Figura 8 -	Imagem de exame de angiofluoresceinografia do paciente #8. (A) fase arterial; (B) fase arteriovenosa	61

Figura 9 -	Imagem de <i>InfraRed</i> de grande angular do olho esquerdo da paciente #1. Área central de hiperrectividade central correspondente à área de atrofia	62
Figura 10 -	Imagem de autofluorescência de grande angular do olho direito da paciente #1. Área central de hipoautofluorescência circundada por halo hiperautofluorescente. Pontos difusos em todo polo com aumento da fluorescência correspondente aos <i>flecks</i>	63
Figura 11 -	Exame de OCT do olho direito do paciente #4. (A) imagem do <i>InfraRed</i> ; (B) imagem das camadas retinianas com importante atrofia macular central	65
Figura 12 -	Protocolo de aquisição da OCT	65
Figura 13 -	Eletrorretinograma de campo total em indivíduos normais. Estímulos durante a adaptação ao escuro: Bastonetes (ROD), cones e bastonetes (CR). Após adaptação ao claro: Cone e 30 Hz	67
Figura 14 -	Representação da ERGmf com estímulo de 61 hexágonos	68
Figura 15 -	Exame de microperimetria em olho direito da paciente #4. (A) Imagem em <i>InfraRed</i> do fundo de olho, (B) Medida de 36 pontos de sensibilidade em decibéis	69
Figura 16 -	Detalhes dos 36 pontos testados no paciente #4. Notam-se pontos de escotoma (pretos), pontos anormais (vermelhos), pontos suspeitos (amarelos) e pontos com normal sensibilidade (verdes)	70
Figura 17 -	Análise da microperimetria do paciente #4, com distribuição em decibéis. Nesse caso, o paciente apresenta média de sensibilidade anormal de 15 decibéis	71
Figura 18 -	(Área das elipses formadas por meio dos pontos de fixação (bivariate contour ellipse área). Paciente #4, com BCEA menor, area de 18.9 graus e maior estabilidade de fixação em comparação ao paciente #9, com BCEA de 175.1 graus	72
Figura 19 -	Ilustração da coleta da medula óssea na crista ilíaca posterior	73
Figura 20 -	(A, B) Sequência de imagens mostrando a separação de células mononucleares após centrifugação por gradiente de <i>Ficoll Hystopaque</i>	75

Figura 21 -	Ilustração da separação das células mononucleares após centrifugação.....	76
Figura 22 -	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) do olho tratado (T) x olho não tratado	80
Figura 23 -	Representação gráfica da evolução da média do limiar de sensibilidade na microperimetria em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p) do grupo T e NT	82
Figura 24 -	Evolução da média do limiar de sensibilidade no olho T x olho NT, no baseline, um, três, seis, nove e doze meses, respectivamente	83
Figura 25 -	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de quatro pacientes (#2, #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	84
Figura 26 -	Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de quatro pacientes (#2 - #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	85
Figura 27 -	Microperimetria do paciente #4 no <i>baseline</i> , um e três meses após a IV. Detalhes dos 36 pontos testados e a sua evolução	86
Figura 28 -	Representação gráfica mostrando a evolução do BCEA (microperimetria) em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p) dos grupos T e NT	87

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais tipos de células utilizados, suas características e os estudos relacionados.....	43
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)	81
Tabela 3 - Resultado da microperimetria (limiar de sensibilidade) nos dez olhos tratados.....	83

Lista de Símbolos e Abreviaturas

11Cral-	11-cis-retinal
AF-	Autofluorescência
AT-	<i>Average Threshold</i>
atRAL-	<i>all-trans-retinal</i>
AV-	Acuidade visual
BCEA-	<i>Contour ellipse area</i>
BMDSCs-	Células tronco derivadas da medula óssea
CESCs-	Células tronco derivadas do epitélio ciliar
CHMO	Células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea
CONEP-	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
dB-	Decibéis
DMRI-	Degeneração macular relacionada à idade
DMS-	Distrofia macular de Stargardt
DRH-	Distrofias retinianas hereditárias
DS-	Doença de Stargardt
EPCs-	Células progenitoras da medula óssea
EPR-	Epitélio pigmentado da retina
ERG-	Eletrorretinografia
ERGmf-	Eletrorretinografia multifocal
ESC-	Células tronco embrionárias
ETDRS-	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
fCPCs-	Células progenitoras corticais fetais
ffERG-	Eletrorretinografia de campo total
FGF2-	<i>Fibroblast growth factor 2</i>

FMMO-	Fração de células tronco derivadas da medula
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HGF-	Fator de crescimento do hepatócito
hRPC-	Células progenitoras da retina humana (do inglês <i>human retinal progenitor cells</i>)
HSCs-	Células tronco hematopoiéticas
IL-10-	Interleucina 10
iPSCs-	Células tronco pluripotentes induzidas
IR-	<i>InfraRed</i>
IV-	Intravítrea
Lin+-	Linhagem positiva
Lin-	Linhagem negativa (
MAVC-	Acuidade visual corrigida
MB-	Membrana de Brunch
MLI-	Membrana limitante interna
NT-	Não tratado
OCT-	Tomografia de Coerência Óptica
PAP-	Padrão da perimetria automatizada
PRL-	Local preferido pela retina
PSCs-	Células tronco pluripotentes
PVPI-	Iodopovidona
RP-	Retinose pigmentar
RPESCs-	Células tronco do EPR

SLO-	<i>Scanner Laser Ophthalmoscopy</i>
T-	Tratados
TCLE-	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
VEGF-	Fator de crescimento endotelial
VPP-	<i>Via pars plana</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Distrofia macular de Stargardt.....	27
1.1.1. Herança genética.....	28
1.1.2. Quadro clínico	32
1.1.3. Diagnóstico.....	34
1.1.4. Tratamento	36
1.2. Rotas usadas para administração das células	39
1.3. Tipos de células e os principais estudos clínicos	41
1.3.1. Células-tronco embrionárias (<i>Embryonic stem cell</i> / ESC).....	44
1.3.1.1. Uso das ESC	44
1.3.2. Células tronco pluripotentes induzidas (<i>induced pluripotent stem cells</i> /iPSCs).....	46
1.3.2.1. Uso das iPSCs.....	47
1.3.3. Células-tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea (CHMO)	48
1.3.3.1. Uso das CHMO.....	48
1.3.4. Células progenitoras da retina (<i>Retinal Progenitor Cells</i> / RPC).....	50
1.3.4.1. Uso de células progenitoras da retina	51
1.4. Histórico das células hematopoiéticas (CHMO)	51
1.5. Justificativa	53
2. OBJETIVOS.....	54
2.1. Objetivo geral	55
2.2. Objetivos específicos.....	55
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
3.1. Casuística	57
3.2. Considerações éticas	57
3.3. Critérios de inclusão	57
3.4. Critérios de exclusão	57
3.5. Exclusão de pacientes do estudo	58
3.6. Avaliações	59
3.6.1. MAVC	59
3.6.2. Exame oftalmológico	60
3.6.3. Angiofluoresceinografia	60
3.6.4. <i>InfraRed</i>	62
3.6.5. Autofluorescência	62
3.6.6. Tomografia de coerência óptica (OCT)	64
3.6.7. Eletrorretinograma (ERG).....	66
3.6.8. Microperimetria (MAIA Centervue - Itália)	68
3.6.9. Coleta do material.....	73
3.6.10. Processamento das células	74
3.6.11. Injeção intravítrea	76
3.7. Análise estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	78
4.1. Acuidade visual	79
4.2. Microperimetria.....	81
4.2.1. Limiar de sensibilidade (Average threshold - AT).....	81
4.2.2. BCEA (bivariate contour ellipse area)	86
4.3. Eletrorretinografia, <i>InfraRed</i> , Autofluorescência	87
4.4. Angiofluoresceinografia	88

5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXOS	111

1- Introdução

As distrofias retinianas hereditárias (DRH) são caracterizadas por perda progressiva na função dos fotorreceptores e/ou das células do epitélio pigmentado da retina (EPR); ocasionando, conseqüentemente, prejuízo precoce da visão nos pacientes (Strom; Gorin, 2013). Dentre as DRH, a doença de Stargardt (DS) é a distrofia macular juvenil mais comum e causa hereditária frequente de disfunção visual central em pacientes jovens, tipicamente na primeira e segunda décadas de vida (Gerth et al., 2002; Wirtitsch et al., 2005). Sua prevalência está entre 1:8.000 e 1:10.000 (Mukherje et al., 2014). As perdas visuais ocasionadas por distrofias maculares estão entre as principais causas de cegueira irreversível no mundo desenvolvido (Vasireddy; Wong; Ayyagari, 2010).

1.1 Distrofia macular de Stargardt

A distrofia macular de Stargardt (DMS) foi descrita primeiramente em 1909, pelo alemão Karl Stargardt (Stargardt, 1909). Sua herança principal é autossômica recessiva e associada à mutação do gene ABCA4 (ATP Binding Cassette Retina-specific). No entanto, existe uma heterogeneidade genética alta (Maia Jr et al, 2008). A descoberta dessa associação ocorreu em 1997 por Allikmets et al., por meio da clonagem e do sequenciamento automatizado de regiões do DNA de famílias norte-americanas e da Arábia Saudita (Charbel Issa et al., 2015).

Existem dois picos de incidência, um mais frequente, que ocorre na infância, e um segundo pico, que se dá no início da idade adulta (Fujinami et al., 2011; Lambertus et al., 2015; Strauss et al., 2016). Há evidências crescentes de que o início se relaciona com a gravidade das variantes ABCA4 subjacentes, sendo que o início do Stargardt na infância está associado a variantes mais deletérias em comparação com o início na vida adulta (Fujinami et al., 2011, 2013c; Lambertus et al., 2015, van Huet et al., 2014). Em geral, no estágio final da doença, a visão para longe se estabiliza em aproximadamente 20/200 (Maia Jr et al., 2008; Zhang et al., 1996).

Fundus flavimaculatus, uma variante da DS, foi descrita pela primeira vez por Adolphe Franceschetti, um oftalmologista europeu, em 1962. (Biswas-Fiss et al., 2012; Lois et al., 2001). Essa doença tende a se manifestar mais tarde que a DS

clássica; e se caracteriza, predominantemente, pela presença de *flecks* distribuídos em todo o polo posterior até a média periferia (Chen; Roorda; Duncan, 2010).

1.1.1 Herança genética

Em aproximadamente 5% dos casos, há associação com mutação de outros genes, como ELOVL4 (autossômica dominante), BEST1 e PRPH (Mukherjee et al., 2014). A mutação do ABCA4 leva acúmulo de lipofucsina que é tóxica para o EPR e para os fotorreceptores (Mukherjee, 2014).

As proteínas ABC (do inglês ATP Binding Cassette) têm a função de transportar metabólitos entre as membranas e organelas celulares, portanto são moléculas essenciais à existência da célula. No corpo humano, há 49 diferentes tipos de proteínas ABC, cada uma delas codificada por um gene específico. Existem 12 variantes polipeptídicas na subfamília ABCA, responsáveis pelo transporte de lipídios em diversos órgãos e células do corpo humano, entre os quais estão: ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios, apolipoproteínas e vitaminas (Oram, 2002; Zhang et al., 1996). A proteína ABCA4 está presente nos segmentos externos dos fotorreceptores.

De forma sucinta, o ciclo visual depende diretamente do cromóforo *all-trans-retinol* (Vitamina A), presente nos alimentos, e que chega na retina através da circulação coroideana, sendo transferido ao EPR. Neste, é convertido a *11-cis-retinal* e, em seguida, é transmitido aos fotorreceptores, onde se ligará à proteína opsina nos discos membranosos dos fotorreceptores, formando a rodopsina nos bastonetes e iodopsina nos cones. Após a absorção de um fóton, ocorre a fotoisomerização da forma *11-cis-retinal* (11cRAL) para *all-trans-retinal* (atRAL) nos discos, dando início ao ciclo visual (Timmers; van Groningen-Luyben; de Grip, 1999) (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração resumida do ciclo visual

Fonte: (Adaptada de Biophytis, 2019)

A maior parte do atRAL é reduzido à all-trans- retinol (atROL) e segue através da matriz interfotorreceptora para a porção apical do o EPR onde será convertido novamente no cromóforo 11cRAL. No entanto, parte desse atRAL combina-se de forma reversível com moléculas de fosfolipídios (Ahn et al., 2003; Travis et al, 2007) e permanece no citoplasma dos fotorreceptores, gerando formas de retinoides tóxicas que ocasionam a degeneração dos fotorreceptores e consequente morte.

A proteína ABCA4 atua como transportador de retinoides, não deixando acumular nos fotorreceptores. O EPR, ao fagocitar os segmentos externos dos fotorreceptores, sofre também com esse acúmulo de retinóides, uma vez que não tem enzimas capazes de degradar o excesso dos bisretinoides. Os efeitos de citotoxicidade relacionados acima levam à morte de células do EPR e, conseqüentemente, à degeneração de fotorreceptores e perda de visão; já que as células do EPR são fundamentais para a sobrevivência de células fotorreceptoras (Molday; Zhong; Quazi, 2009).

As retinas em portadores de deficiência da proteína ABCA4 acumulam maior quantidade de lipofucsina, uma vez que é constituída por retinóides, lipídios e restos de proteínas, que são acumulados nos fagolisossomos do EPR (Mata; Weng; Travis, 2000). As mutações ABCA4 foram primeiramente encontradas em pacientes com DS autossômica recessiva e mostraram, posteriormente, causar distrofia do cone, distrofia cone-bastonete e retinose pigmentar (RP) (Allikmets, 1997). A determinação do paciente nesse espectro dependerá da função residual do ABCA4.

A DS é o mais suave dos fenótipos ABCA4, enquanto que a forma de RP é a mais grave (Cremers et al., 1998; Schindler et al., 2010). Acredita-se que as mutações no ABCA4 sejam responsáveis por mais de 95% dos casos da doença clínica de Stargardt, 30-50% dos casos de distrofia de cones e bastonetes, (Schachat et al., 2017, p. 965) e 8% de retinose pigmentar autossômica recessiva (Schindler et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 - (A) da esquerda para a direita, retinografia de um paciente sem doença e, em seguida, pacientes com progressiva diminuição da função do ABCA4. **(B)** efeito da redução da função do ABCA4 na ERG de campo total. **(C)** aumento dos bifenoides nos seguimentos externos dos fotorreceptores. Quanto maior a deficiência do ABCA4, maior será o acúmulo dos bisfenoides e maior também a perda de fotorreceptores. Na Doença de Stargardt há deficiência parcial do ABCA4 e menor perda de células, em seguida a distrofia de cones e bastonetes e, por último, a ausência completa dessa proteína na retinose pigmentar

Fonte: (Adaptado de Sohn; Mullins; Stone, 2017).

A maioria das diferenças clínicas encontradas nos pacientes com doença ABCA4 pode ser explicada pela interação de três fatores que variam entre os pacientes (Schindler et al., 2010):

- A gravidade do genótipo ABCA4, portanto, a taxa na qual os bisretinoides tóxicos se formam nos fotorreceptores, sendo possível avaliar por meio de testes moleculares do gene.
- A sensibilidade dos cones a esse genótipo;
- A sensibilidade do EPR a esse genótipo.

1.1.2 Quadro clínico

O quadro clínico se caracteriza por perda bilateral da visão central, discromatopsia e ao mapeamento observam-se atrofia macular, lesões maculares em bronze batido e pontos branco-amarelados (“flecks”), que correspondem ao acúmulo de lipofucsina ao nível do EPR (Fishman et al, 1999; Fujinami et al, 2013b; Michaelides; Hun; Moore, 2003; Strauss et al, 2016). A acuidade visual (AV) pode variar de 20/30 e, em geral, até 20/200 (Schachat et al., 2017, p. 965) (Figura 3).

Figura 3 - Retinografia do olho direito de paciente com Stargardt mostrando *flecks* maculares e área circunscrita foveal de atrofia do EPR

Fonte: (Schachat et al., 2017, p. 967).

Inicialmente, o fundo de olho pode ser normal ou apresentar alterações discretas como diminuição do brilho foveal (Westeneng-van et al., 2012; Zernant et al., 2011). Um terço das crianças no diagnóstico podem não apresentar flecks no fundo de olho ou alterações na autofluorescência (AF) (Fujinami et al., 2013b). O tamanho e a quantidade de *flecks* variam muito entre os pacientes; sendo que alguns não apresentam flecks e outros têm centenas. O acúmulo dos bisfenoides nas células do EPR torna a coloração da retina, à oftalmoscopia, vermelho opaco, uniforme, ou próximo ao castanho, com dificuldade de visualizar detalhes da rede coriocapilar (Figura 4). A atrofia do EPR, em geral, ocorre no centro da mácula e apresenta brilho metálico que difere da atrofia vista em pacientes com degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (Schachat et al., 2017, p. 965).

Figura 4 - Retinografia de uma paciente com seis anos e diagnóstico de Stargardt

Fonte: (Schachat et al., 2017, p. 967).

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da DS se baseia na história clínica, epidemiologia e exames complementares, como angiofluoresceinografia, AF, tomografia de coerência óptica (OCT) e eletrorretinografia multifocal (ERGmf) e eletrorretinografia de campo total (ffERG). Na angiofluoresceinografia, o achado típico é o “silêncio coroideo”. Essa hipofluorescência ocorre em 80% dos pacientes e está relacionada ao acúmulo de lipofucsina no EPR que impede o estímulo da fluoresceína pela luz azul na circulação coroidal. As áreas de atrofia aparecem hiperfluorescentes. Há também destaque dos pontos pisciformes hiperfluorescentes que correspondem aos *flecks*. (Noble; Carr, 1979; Oh et al., 2004).

A AF é um exame não invasivo usado para visualizar a lipofucsina (Chen et al., 2010). Na DS inicial, a AF revela imagem hiperautofluorescente em áreas de acúmulo da lipofucsina, sendo muitas vezes a primeira alteração detectável. Já nas fases tardias, há hipoautofluorescência devido áreas de atrofia do EPR (Chen; Roorda; Duncan, 2010). A redução central da AF rodeada por aumento do sinal, assemelha-se à maculopatia *bull’s-eye* (“Maculopatia em Alvo”) (Gomes et al., 2009) (Figura 5).

Figura 5 - A imagem acima representa o olho direito da paciente #4, sexo feminino, 34 anos, acuidade visual de 20/125. **(A)** exame de *infraRed*, com imagem de hiperreflectância central correspondendo à área de atrofia macular na região central. **(B)** exame de autofluorescência mostrando área central de hipoautofluorescência e pontos ao redor de hiperautofluorescência no local dos *flecks*. **(C)** exame de angiofluoresceinografia mostrando o “silêncio coroideo”, e áreas de hiperfluorescência por defeito em janela

A OCT é capaz de mostrar áreas de ruptura ou ausência da camada de fotorreceptores com ou sem afilamento das outras camadas intra-retinianas. A AV correlaciona-se com a espessura macular central (Ergun et al., 2005). A menor espessura retiniana está relacionada com o tempo da doença e pior prognóstico visual (Maia Jr et al., 2008) (Figura 6).

Figura 6 - Exame da paciente #4. **(A)** *InfraRed*. **(B)** corte do OCT de mácula mostrando atrofia importante das camadas retinianas na topografia da fóvea. **(C)** exame de autofluorescência

A ERG na DS é variável e, geralmente, pode ser classificada em três grupos distintos. O Grupo 1 apresenta ERG escotópica e fotópica normal. O Grupo 2 é caracterizado por anormalidades fotópicas e o Grupo 3, anormalidades ERG fotópicas e escotópicas. É importante ressaltar que os achados de ERG de campo total (ffERG), em linha de base, têm implicações prognósticas (Coussa, Utz, Traboulsi, 2017; Fujinami et al., 2013a). Aqueles com evidência inicial de disfunção de cones foram mais propensos à deterioração progressiva da ERG na média de 10 anos de acompanhamento do que aqueles com ERG normal na linha de base (Fujinami et al., 2013a). Apesar da ffERG não mostrar alterações precoces, uma vez que a lesão fica restrita à macula, a ERGmf pode mostrar disfunções mesmos nas fases precoces, sendo útil para o diagnóstico (Kretschmann et al., 1998).

1.1.4 Tratamento

Não há tratamento para a DS; no entanto várias opções terapêuticas estão sendo testadas, como a terapia gênica, farmacológica e com células tronco (Coussa, Utz, Traboulsi, 2017; Tanna et al., 2017).

A terapia gênica consiste na inserção de material genético exógeno em células de um indivíduo com finalidade terapêutica (Côco; Han; Sallum, 2009). Na

DS foi utilizado um vetor lentiviral para a transferência de um gene ABCA4 normal aos fotorreceptores, técnica conhecida como StarGen (Kong et al., 2005). Utilizando essa técnica, os autores conseguiram eliminar o acúmulo de lipofucsina após injeção sub-retiniana em camundongos, mostrando ser um método eficiente para o tratamento de doenças causadas por mutações no ABCA4. Está em andamento (fase de recrutamento) um ensaio clínico para avaliar a segurança de StarGenTM (NCT01367444) em pacientes com degeneração macular de Stargardt (Sahel; Marazova; Audo, 2015, Sanofi, 2019).

Medicações orais estão sendo estudadas como opção terapêutica para Stargardt. O principal alvo é a vitamina A, já que é a responsável pela formação de 50% da lipofucsina na retina. Estudo pré-clínico com camundongos demonstrou que a substituição de três átomos de hidrogênio da vitamina A (Vitamina A deuterada) inibe a dimerização dessa vitamina e reduz a formação de lipofucsina, permitindo a normalização da função retiniana (Charbel Issa et al., 2015). Atualmente, essa medicação denominada ALK-001 C20-D3-(vitamina A, Alkeus Pharmaceuticals) está em teste, em ensaio clínico fase II (ClinicalTrials.gov Identifier NCT02402660) em pacientes com DS (Alkeus Pharmaceuticals Inc., 2018).

A terapia celular, objetivo do presente estudo, visa substituir o tecido lesado ou resgatar as células em sofrimento. O primeiro exemplo de terapia celular utilizando as células tronco cultivadas remonta a 1979, quando Green, Kehinde e Thomas (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; De Luca; Arsenijevic, 2007). A córnea foi o primeiro segmento ocular a ser testado com terapias envolvendo o uso de células tronco devido à 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; De Luca; Arsenijevic, 2007). Em princípio, três “alvos” distintos na retina seriam passíveis de terapia celular: a neuroretina, as células do EPR e células 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 OCT, angiofluoresceinografia e 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 quatro 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, 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. Esses pacientes necessitam utilizar imunossupressão após a terapia devido a origem heteróloga da célula (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011; Tibbetts et al., 2012; Vugler et al., 2007).

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 ESCs. 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 aumento da angiogênese, diminuição da inflamação, efeito

antiapoptótico, remodelando da matrix extracelular e ativação das células tronco vizinhas (Siqueira et al., 2015a).

O estímulo à angiogênese ocorre por meio da liberação de fatores como o fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF) e o FGF2 (fibroblast growth factor 2). 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, observou-se 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 o 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 fazem parte do tecido, como já 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).

1.2 Rotas usadas para administração das células

Rotas que foram testadas para terapia celular para doenças da retina são a administração sistêmica (intravenosa), injeção intravítrea (IV), injeção no espaço supracoroideo e injeção sub-retiniana. As duas técnicas de injeção sub-retiniana são: a) injeção de suspensões celulares; b) injeção de células aderidas a uma matriz (scaffold) (Siqueira, 2011).

Atualmente, abordagens baseadas em uma matriz exigem uma retinotomia

maior para a entrega de células ao espaço sub-retiniano em comparação com a entrega de células dispersas. Como resultado, a entrega de células baseada em *scaffold* pode estar associada ao risco aumentado de migração de células para a cavidade vítrea, onde essas células podem sofrer transdiferenciação ou proliferação descontrolada, formação de tecido cicatricial (dependendo do tipo celular) e desenvolvimento de tecido cicatricial epirretiniano e/ou descolamento de retina no pós-operatório. Além disso, o *scaffold* pode migrar do *locus* em que foi colocado no intraoperatório para locais distantes da fóvea. Se ocorrer migração pós-operatória, o efeito trófico do transplante pode ser diminuído, e o efeito de substituição pode ser totalmente perdido. O uso intraoperatório de dispositivos, como líquidos mais pesados que a água, pode fixar o andaime no local adequado no momento da reinserção da retina (após a entrega da célula ao espaço sub-retiniano), o que pode mitigar o risco de migração do *scaffold* (Zarbin, 2019).

Em contraste com a injeção IV, a transferência de células para o espaço sub-retiniano exigirá a criação de um descolamento localizado da retina. Se o tipo de célula terapêutica funciona por um mecanismo de resgate envolvendo a produção e difusão do fator trófico, então se abre a possibilidade de evitar o descolamento foveal e posicionar as células em um local extrafoveal.

Existem duas abordagens principais para injetar as células no espaço sub-retiniano. Uma delas é a injeção de uma suspensão de células do EPR e a outra envolve o enxerto de uma monocamada de células do EPR semeadas em uma membrana de suporte (matriz). Embora alguns pesquisadores tenham relatado que as suspensões de células não se integraram bem nas áreas danificadas, é amplamente aceito que a suspensão de células também resultou em melhora acentuada na função visual. Importante destacar é que esta abordagem é relativamente fácil e foi realizada em ensaios clínicos recentes (Petrus-Reurer et al., 2017).

1.3 Tipos de células e os principais estudos clínicos

As células-tronco são caracterizadas por três propriedades gerais: sua capacidade de autorrenovação ilimitada, seu *status* não especializado e sua capacidade de se diferenciar em vários tipos de células. Nesta definição geral, as células-tronco podem ser classificadas de acordo com diferentes critérios. Uma classificação ampla diz respeito à sua potência; assim as células-tronco multipotentes têm a capacidade de se diferenciar em número limitado de tipos de células, enquanto as células-tronco pluripotentes possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer um dos tipos celulares encontrados no corpo adulto. As células-tronco multipotentes podem, por sua vez, ser subclassificadas de acordo com sua origem; como, por exemplo, células-tronco fetais e adultas (derivadas de uma variedade de tecidos fetais em desenvolvimento ou de tecidos funcionais adultos, respectivamente), ou neurais e não neurais (isto é, derivadas de linhagens neuroectodérmicas *versus* linhagens não neuroectodérmicas).

Entre os diferentes tipos de células-tronco multipotentes identificadas até a presente data, as mais frequentemente avaliadas para potenciais terapias para doenças degenerativas da retina incluem: 1) células-tronco fetais de linhagens neurais, incluindo células progenitoras da retina fetal e células progenitoras corticais fetais; 2) células-tronco adultas de linhagens neurais, incluindo células-tronco derivadas do epitélio ciliar (CESCs), células-tronco do EPR (RPESCs) e células gliais de Muller; 3) células-tronco adultas de linhagens não-neurais, incluindo as derivadas do tecido umbilical e as derivadas da medula óssea (BMDSCs). As células-tronco pluripotentes (PSCs), por outro lado, abrangem as ESCs e as pluripotentes induzidas (iPSCs) (Guo; Chen, 2015). Dentre as células-tronco descritas, as mais utilizadas em estudos clínicos são descritas a seguir (Figura 7 e Tabela 1):

Figura 7 - Esquema ilustrando os principais tipos de células tronco. 1) Células tronco embrionárias (ESC); 2) Células progenitoras da retina; 3) Células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs); 4) Células hematopoiéticas derivadas da medula óssea; 5) Células tronco mesenquimais (MSC). Tecido adiposo, cordão umbilical e medula óssea podem originar tanto células mesenquimais como células tronco hematopoiéticas. Os principais estudos com as MSCs são pré-clínicos

Tabela 1 - Principais tipos de células utilizados, suas características e os estudos relacionados

Tipos de células	Origem	Vantagens	Desvantagens	Uso/estudos
Células tronco embrionárias (ESC)	Derivadas da massa celular interna dos embriões na forma de blastocistos.	São pluripotentes. Podem formar todos os tipos de tecidos. Crescimento relativamente fácil	Maior rejeição, subsistem questões éticas, maior chance de crescimento de tumores.	Aplicação subretiniana de EPR derivado de ESC: <i>Astellas Institute for Regenerative Medicine, EUA, 2019; Schwartz et al. (2012, 2015), (NCT02941991 / NCT02445612) Regenerative Patch Technologies, EUA, 2018, clinical trial (NCT02590692). Southwest Hospital, China, NCT02749734) (Yin, 2018) The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, China, (NCT03046407) (Zhou, 2018). Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), Brasil, (NCT02903576) (Belfort Jr, 2017)</i>
Células tronco Pluripotentes Induzidas (IPSCs)	Células somáticas, como a pele (fibroblastos) reprogramadas por transdução retroviral	Pluripotentes. Podem formar todos os tipos de tecidos. Como são células do próprio paciente, eliminam questões éticas do uso de embriões e diminui risco de rejeição.	Custo. Formação de mutações no processo de reprogramação celular	Uso subretiniano de EPR derivado de IPSCs: <i>Takahashi, RIKEN Institute, Japão (Leeper et al., 2010; Park et al., 2017; Takanaka, Yamanaka, 2006).</i>
Células tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea (CHMO)	Células hematopoiéticas obtidas da medula óssea de adultos (fêmur, esterno, costela), cordão umbilical e placenta.	Multipotentes; sem questões éticas; Fácil aquisição e em maior quantidade	Forma menores tipos de células.	Uso intravítreo: <i>Department of Ophthalmology and Vision Science, University of California-Davis Eye Center, EUA, Park et al (2014), (NCT01736059) FMRP-USP, Brasil, (Siqueira 2011; Siqueira et al., 2013, 2015ab) (NCT01068561/ NCT01518127/ NCT01518842).</i>
Células progenitoras da retina (RPC)	População de células imaturas, responsáveis pela produção de células da retina de fetos abortados entre 12 a 16 semanas.	Multipotentes		Injeção subretiniana: <i>Liu et al.⁽⁵⁰⁾ Uso intravítreo: jCyte e o California Institute for Regenerative Medicine (CIRM) (2018), Barruch Kuppermann (2019a), (CT03073733)</i>

1.3.1 Células-tronco embrionárias (*Embryonic stem cell* / ESC)

São derivadas da massa celular interna dos embriões na forma de blastocistos com capacidade de autorrenovação e de se diferenciar em todos os tipos de células derivadas de adultos, a partir das três camadas germinativas. Após o período de blastocisto (quatro a cinco 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; Osakada et al., 2008; Zhao, Liu, Ahmad, 2006). No entanto, essa capacidade ilimitada de multiplicação também leva a preocupações como a formação de teratomas e outros tumores, reações imunes exacerbadas (Landa et al., 2009; Odorico, Kaufman, Thomson, 2001). No passado, foram associadas à formação de teratomas (Cowan et al., 2004). A diferenciação das células *in vitro*, teoricamente, resolvem o problema da multiplicação das células de forma desorganizada e formação de tumores intraoculares. Embora as ESCs sejam promissoras em terapias de reposição celular da retina, subsistem questões éticas e imunes, como a rejeição, a serem consideradas. Segundo Thomson et al. (1998), as ESCs podem ser geradas a partir de uma única célula obtida a partir de embriões criados para fins reprodutivos por meio de procedimentos de fertilização *in vitro* sem sacrificar o embrião. O que ameniza as discussões éticas.

1.3.1.1 Uso das ESC

Testes pré-clínicos em dois modelos animais para análise de eficácia e segurança foram realizados. Ao final do estudo, as células permaneceram localizadas no espaço sub-retiniano sem evidência de tumorigenicidade, formação de teratoma ou disseminação para outras partes do corpo (Lu et al., 2009). Nesses estudos, também evidenciou-se que o transplante de EPR derivado de ESC sub-retiniano pode resgatar fotorreceptores e prevenir perda visual em modelos com degeneração macular (Lu et al., 2009; Lund et al., 2006). Schwartz et al. (2012)

descreveram, pela primeira vez, um estudo clínico, fase I/II sobre 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. Esses pacientes necessitaram utilizar imunossupressão após a terapia devido a origem heteróloga da célula (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011; Tibbetts et al., 2012; Vugler et al., 2007). Os pacientes mostraram sensível melhora na visão e não ocorreram efeitos adversos. Schwartz et al. (2012) apresentaram o resultado de 22 meses de seguimento de 18 pacientes, sendo nove com DMRI e nove com DS. Houve melhora da acuidade em 10 pacientes e apenas um apresentou piora da visão, sendo que os outros sete permaneceram estáveis. O olho contralateral foi o controle e não apresentou melhora da visão. Schwartz et al. (2016) publicaram os resultados de quatro anos desse estudo. Os autores concluíram, destacando a melhora da AV de até 15 letras em seis meses, e em 72% dos casos verificaram aumento da pigmentação na borda da atrofia macular consistente com o transplante do EPR. 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. Mehat et al. (2018) demonstraram o seguimento por 12 meses de 12 pacientes com degeneração do tipo Stargardt, submetidos à injeção sub-retiniana de células do EPR. Não foram observados efeitos colaterais associados à rejeição, como inflamação e crescimento descontrolado das células. Todos os pacientes receberam imunossupressor e apresentaram efeitos como letargia e um apresentou reativação de herpes vírus. O desenvolvimento de hiperpigmentação sub-retiniana dentro da área injetada em todos os 12 participantes foi dose-dependente e associado, em muitos casos, com um sinal hiper-refletivo na OCT, sugerindo a sobrevivência de células de EPR derivadas de hESC derivadas de doadores. Não houve benefício na visão, microperimetria e qualidade de vida. Os autores ressaltam que por se tratar de pacientes com doença muito avançada, a progressão da degeneração é mais lenta e, portanto, seria necessário período maior de observação. Destacam também que o afinamento da retina sobre a área injetada, em alguns pacientes, alertam para a

necessidade de cautela desse procedimento em pacientes com doença menos avançada.

Algumas pesquisas com aplicação sub-retiniana do EPR derivado de células embrionárias ainda estão em andamento. Esses estudos possuem escalonamento das células injetadas. O principal grupo, coordenado pela empresa *Astellas Institute for Regenerative Medicine*, a mesma responsável pelos estudos de Schwartz et al. (2012; 2015), tem previsão para finalizá-los em 2019, e aborda a distrofia de Stargardt (Registro no clinical trial NCT02941991 / NCT02445612) (Astellas Institute for Regenerative Medicine Group, 2019; Regenerative Patch Technologies Group, 2018). Outro grupo nos EUA, *Regenerative Patch Technologies*, está investigando o procedimento para DMRI seca (NCT02590692) (Regenerative Patch Technologies Group, 2019). No Southwest Hospital, na China, está sendo desenvolvido estudo com quinze pacientes com DMRI e Stargardt (NCT02749734) (Yin, 2018). Ainda na China, no *The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University*, outra pesquisa está na fase de recrutamento de pacientes com DMRI seca (NCT03046407) (Zhou, 2018). E no Brasil, na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), foram incluídos pacientes com DMRI seca e exsudativa e Stargardt. (NCT02903576) (Belfort Jr, 2017).

1.3.2 Células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells/ iPSCs*)

São células derivadas de tecidos adultos, descritas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka (2006). As iPSCs são células somáticas, terminalmente diferenciadas como tecidos da pele (fibroblastos), geneticamente reprogramadas por transdução retroviral conferindo propriedades como a ESC3. São tipicamente obtidas pela introdução de produtos de conjuntos específicos de genes associados à pluripotência, ou "fatores de reprogramação", em determinado tipo de célula. O conjunto original de fatores de reprogramação (também chamados de fatores de Yamanaka) são os fatores de transcrição Oct4 (Pou5f1), Sox2, cMyc e Klf4. Embora essa combinação seja mais convencional na produção de iPSCs, cada um dos fatores pode ser funcionalmente substituído por fatores de transcrição relacionados, miRNAs, pequenas moléculas, ou até mesmo genes não relacionados, como

especificadores de linhagens (Guo; Chen, 2015). Como são células adultas do próprio paciente (autólogas), apresentam vantagens, em relação às ESCs, como a menor necessidade 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; Enzmann; Ildstad, 2011). As aberrações celulares podem decorrer do estresse celular que acompanha a reprogramação (Alvarez Palomo et al., 2015). Assim, com o uso das ESCs é possível produzir células do EPR a partir de iPSCs (Carr et al., 2009). As células do EPR derivadas de iPSC formam monocamadas com *tight junction*, expressam genes necessários para o ciclo visual e são capazes de fagocitose (Carr et al., 2009; Meyer et al., 2009).

1.3.2.1 Uso das iPSCs

Estudos clínicos com ratos demonstraram que o uso das IPSCs melhorou a função da retina, avaliada por meio de ERG (Carr et al., 2009). Li et al. (2012) utilizaram EPR derivado de iPSC sub-retiniano em 34 camundongos e não observaram crescimento de tumores, porém houve melhora da resposta retiniana na ERG (Garber, 2015).

Baseado nos bons resultados em estudos pré-clínicos, em 2014, Masayo Takahashi, RIKEN, Japão, conduziu o primeiro ensaio clínico utilizando as iPSCs. O objetivo principal foi avaliar segurança, viabilidade, assim como efeitos colaterais. No entanto, o estudo foi suspenso em março de 2015 por demonstrar mutações nas iPSCs no segundo paciente que receberia as células. Essas mutações não eram detectáveis nos fibroblastos originais desse paciente. Não se sabe ao certo se o processo de indução e reprogramação promoveram anormalidades nas iPSCs. Além disso, houve mudanças nas leis da medicina regenerativa no Japão que dificultaram a continuidade dos estudos (Leeper; Hunter; Cooke, 2010; Park et al., 2017).

1.3.3 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, podendo ser obtidas diretamente do quadril (crista ilíaca), local mais usado para coleta, e também de outros ossos como fêmur, costelas, esterno, por meio de punção com agulha especial e seringa pela equipe da hematologia. Podem, ainda, serem obtidas do sangue, após pré-tratamento com citocinas, tais como fatores de estimulação de colônias de granulócitos, que induzem as células a serem mobilizadas do compartimento da medula óssea para a corrente sanguínea. 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 ESCs e às IPCS é a ausência na indução de tumores. A desvantagem é a menor capacidade em se diferenciar em células da retina; atuando, preferencialmente, no efeito parácrino (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011).

1.3.3.1 Uso das CHMO

Uma abordagem alternativa à terapia com células-tronco é induzir ao resgate funcional das células afetadas na retina pela introdução de células-tronco que promovem efeito trófico parácrino. Tal tratamento não seria específico para uma doença e pode ter amplas aplicações clínicas. Isso é potencialmente possível utilizando CHMO (Tomita et al., 2002). Se essas células-tronco pudessem ser administradas IV, sem efeitos adversos, a facilidade de tal via de administração seria altamente desejada.

Ao contrário da cirurgia de vitrectomia para administração sub-retiniana de células, que requer internação hospitalar e tempo de recuperação significativo da cirurgia, a injeção IV de células pode ser realizada na clínica, com tempo mínimo de recuperação. Finalmente, as CHMO são, geralmente, colhidas de tecidos adultos.

Assim, não há questões éticas. Para uso autólogo, a necessidade de imunossupressão sistêmica é evitada. Estas células-tronco adultas são multipotentes e têm capacidade mais limitada para se diferenciarem e dividirem quando comparadas com as ESC e iPSCs. Essas características das CHMO adultas podem torná-las menos ideais para a terapia regenerativa em termos de reposição tecidual (Minamino et al., 2005). No entanto, essas características das células-tronco adultas as tornam mais seguras para explorar a regeneração dos tecidos em ensaios clínicos, uma vez que existe risco mínimo de teratoma.

Muitos pesquisadores têm avaliado a segurança e eficácia no uso dessas células para doenças da retina. Diferente das ESCs, aquelas derivadas da medula óssea são injetadas IV, um procedimento simples já utilizado rotineiramente na clínica para outras medicações. Os pioneiros na avaliação pré-clínica foram Tomita et al. (2002), que demonstraram que as células mononucleares da medula óssea se diferenciaram em células da retina após administração IV em ratos com injúria induzida. Minamino et al. (2005) confirmaram esses resultados.

Park et al. (2012) desenvolveram estudo com CHMO injetadas IV em camundongos, após indução de isquemia da retina. Os autores concluíram que as células se integraram ao tecido da retina 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. No Brasil, o estudo clínico com essas células iniciou em 2009 na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para tratamento de RP (Clinical Trials. gov: NCT01068561), degeneração macular e Stargardt ((NCT01518127) e retinopatia isquêmica, que inclui retinopatia diabética (NCT01518842). Siqueira (2011) realizou um estudo prospectivo, fase I, não randomizado, que incluiu pacientes com RP. A injeção IV de CHMO 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 à microperimetria após injeção de CHMO. Siqueira et al. (2015a),

analisaram o questionário de qualidade de vida (VFQ-25) em vinte pacientes com RP, submetidos à injeção das CHMO, e observaram aumento na qualidade de vida no terceiro mês de seguimento. 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 por OCT. Cotrim et al. (2017) publicaram o resultado do uso IV de CHMO em 10 pacientes com DMRI na forma seca, com melhora da AV nos 12 meses de seguimento, na microperimetria e na qualidade de vida (VFQ-25) aos seis meses.

Um grupo na Califórnia (*Department of Ophthalmology and Vision Science, University of California-Davis Eye Center (USA)*) encontraram resultados semelhantes aos do Brasil com o uso das CHMO. Park et al. (2014) desenvolveram estudo fase I com seis pacientes (seis olhos) com isquemia ou degeneração retiniana, não sendo observados efeitos colaterais locais ou sistêmicos. Também evidenciaram melhora da AV nos seis pacientes avaliados com diagnósticos como DS, DMRI, oclusão de artéria e veia centrais da retina e RP. A melhora variou de três a 65 letras.

1.3.4 Células progenitoras da retina (*Retinal Progenitor Cells/ RPC*)

As células progenitoras da retina humana (hRPC= Human retinal progenitor cells), que podem ser expandidas em estado progenitor e depois diferenciadas em células da retina, antes ou após o transplante, são uma solução atrativa para produzir volume suficiente de células dadoras para aplicação terapêutica. Compreendem uma população de células imaturas, responsáveis pela produção de células da retina durante o desenvolvimento embrionário. A principal forma de aquisição é a partir de tecidos oculares de fetos abortados de 12 a 16 semanas de idade, tempo em que a diferenciação retiniana já foi bem definida (Liu et al., 2017; Semo et al., 2016). Demonstrou-se que as hRPC podem ser expandidas para múltiplas passagens em estado indiferenciado e, então, expressarem marcadores fotorreceptores (opsinas) mediante diferenciação *in vitro* ou após transplante sub-

retiniano. É importante ressaltar que a fase de expansão das hRPC pode ser estendida significativamente sob condições de baixo oxigênio, gerando uma fonte celular escalável, adequada para aplicação clínica generalizada (Semo et al., 2016). As hRPCs derivadas de feto apresentam baixa imunogenicidade (Liu et al., 2017). Nos estudos avaliados, o seu uso foi sub-retiniano ou IV.

1.3.4.1 Uso de células progenitoras da retina

Em estudo preliminar com modelo animal (ratos), as hRPC foram diferenciadas em fotorreceptores em laboratório e injetadas através de incisão escleral no espaço sub-retiniano (Liu et al., 2017). Comprovando a ausência de crescimento de tumores, esses autores publicaram um estudo utilizando hRPCs em oito pacientes com RP. Essas células foram injetadas no espaço sub-retiniano após vitrectomia. O procedimento mostrou-se seguro, observando-se aumento da espessura da camada nuclear externa, analisado por OCT, e não apresentou alterações significativas na visão. A justificativa para ausência de melhora nesses pacientes foi que o quadro da doença nos envolvidos era muito avançado. Em outra pesquisa em andamento, hRPCs derivadas do tecido fetal foram injetadas IV com anestesia local em diferentes concentrações (0,1; 1; 2 e 3 milhões de células) em 28 pacientes com RP. Até o momento (12 meses de seguimento), o procedimento se mostrou seguro (Clinical trial CT03073733) (Kuppermann, 2019a). Esta pesquisa é coordenada pelo pesquisador Barruch Kuppermann, em parceria com a empresa jCyte e o *California Institute for Regenerative Medicine* (CIRM) (California Institute for Regenerative Medicine, 2018; Kuppermann, 2019b).

1.4 Histórico do uso das células hematopoiéticas (CHMO) para tratamento das doenças da Retina

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 em resposta a uma variedade de moléculas sinalizadora e atingem sítios de angiogênese na vasculatura periférica isquêmica, no miocárdio ou em áreas de injúria ocular induzida (Asahara et al., 1997; Gill et al., 2001; Grant et al., 2002; Kocher et al., 2001; Lanza et al., 2009; Mitchell et al., 2010; Rosenfeld; Rich; Lalwani, 2006; Verterporfin in Photodynamic Therapy Study Group, 2001).

Otani et al. (2002) reportaram que Lin-HSCs injetadas diretamente dentro do olhos de camundongos, em período neonatal, ou em adultos com injúria ocular induzida poderiam ativar astrócitos e participar no desenvolvimento da angiogênese. Nessa mesma linha de estudo, Otani et al. (2004) aplicaram injeção IV de células adultas derivadas da medula óssea em dois modelos de ratos com degeneração retiniana duas semanas pós-natal (tipo *rd1* e *rd10*). Concluiu-se que uma fração de células tronco derivadas da medula (FMMO) contendo precursores endoteliais estabiliza e resgata vasos sanguíneos da retina completamente degenerados, com 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. Nesse estudo eletroretinográfico, a ffERG mostrou respostas presentes nos ratos submetidos ao tratamento, e respostas ausentes no grupo controle Outro achado desses autores 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 relataram 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.

Das, Zhao e Ahmad (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 IV em ratos com injúria induzida.

Minamino et al. (2005) observaram que as CHMO podem se diferenciar em células da retina e descreveram uma nova opção para a técnica de injeção IV, realizando previamente 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.

1.5 Justificativa

A DMS é a distrofia retiniana juvenil mais frequente e, consequentemente, apresenta importante impacto sócioeconômico por atingir uma população jovem e comprometer significativamente a visão. Os resultados dessas pesquisas que demonstraram, tanto em modelo experimental como em estudo clínico fase I/II, o potencial da terapia celular utilizando FMMO no tratamento de doenças degenerativas da retina, motivou a realização de um estudo em seres humanos utilizando-se essas células para o tratamento dessa doença, uma vez que ainda não existe nenhum tratamento efetivo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e o potencial terapêutico do uso intravítreo de FMMO contendo células CD34+ em dez pacientes portadores de DMS.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar prospectivamente 10 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 ERG;
- Avaliar a fixação da visão com microperimetria;
- Avaliar a sensibilidade da visão por meio da microperimetria;
- Avaliar as características do tecido retiniano e complexo epitélio pigmentado e coroide por meio da OCT;
- Avaliar as características do tecido retiniano e sua vasculatura pela angiofluoresceinografia;
- Revisão dos principais estudos em andamento com células tronco para doenças degenerativas da retina.

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística

É um estudo prospectivo, não-randomizado, aberto, sobre as alterações angiográficas, eletrorretinográficas, tomográficas e na microperimetria da injeção intravítrea da FMMO contendo células CD 34+ em dez pacientes portadores de DMS.

3.2 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Registro nº 15978 e emenda sob registro CAAE 66839617.2.0000.5629 (Anexo A). Registro no Clinical trial NCT01518127 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01518127?term=siqueira&rank=3>). Todos os participantes foram informados das características do estudo, confirmando sua participação assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

3.3 Critérios de inclusão

- Idade: 18 aos 50 anos.
- Presença de DMS.
- MAVC pior ou igual a 20/125
- TCLE por escrito devidamente assinado

3.4 Critérios de exclusão

- Injeção IV de corticoesteroides ou outras drogas antiangiogênicas há seis meses da avaliação de entrada;
- Opacidade de meios que pudessem interferir significativamente na AV, avaliação oftalmológica clínica, 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, 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 TCLE;
- 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: Pacientes que participaram de algum estudo clínico nos últimos 12 meses, ainda que tenham finalizado sua participação anteriormente aos últimos 30 dias, somente foram incluídos se a participação no presente protocolo pudesse trazer claro benefício aos mesmos.

3.5 Exclusão de pacientes do estudo

Os pacientes foram orientados que a qualquer momento poderiam desistir do estudo sem precisar alegar os motivos; poderiam também ser excluídos em qualquer um dos seguintes casos:

- Retirada do TCLE pelo paciente;
- Ocorrência de um critério de exclusão clinicamente relevante e que afetasse a segurança do paciente, a critério do investigador principal;
- Necessidade de procedimento ou tratamento não permitidos pelo protocolo;
- Ocorrência de evento adverso que indicasse que a descontinuação do estudo seria considerada necessária pelo investigador ou paciente;
- Adesão insuficiente do paciente.

Caso um paciente 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

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Oftalmologia do HCFMRP-USP. Na primeira avaliação e em todas as visitas, os pacientes passaram por avaliação oftalmológica completa com aferição da melhor MAVC, biomicroscopia em lâmpada de fenda, tonometria de aplanção, mapeamento de retina, OCT de mácula, microperimetria, *InfraRed* (IR), AF. A angiofluoresceinografia, devido seus efeitos colaterais, foi realizada no *baseline*, seis e 12 meses após. Os pacientes foram, ainda, avaliados um dia e um, três, seis, nove e doze meses após o procedimento. A FMMO foi obtida por aspiração da crista ilíaca posterior do paciente, realizada no HCFMRP-USP, pela equipe de hematologista do Setor 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. No mesmo dia da coleta do material e do processamento das células, 0,1 ml da solução, contendo aproximadamente $1,64 \times 10^6$ células, foi injetado IV em sala cirúrgica pelo próprio pesquisador no olho de pior AV.

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 tratado e não tratado) em cada visita do 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 aplanção com tonômetro de Goldman e oftalmoscopia indireta com lente de 20D da Volk. 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

A angiofluoresceinografia foi um importante exame para ajudar no diagnóstico da doença, avaliar sua extensão e, principalmente, para avaliar a segurança, assim como descartar a presença de tumores e neovascularizações após o procedimento. O aparelho utilizado foi o Spectralis (Heidelberg Engineering, Alemanha) em todos os pacientes no *baseline*, com três, seis e 12 meses após o tratamento. 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 (Figura 8). 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 coróideia 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. (Figura 6)
- **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.
- **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 8 - Imagem de exame de angiofluoresceinografia do paciente #8. **(A)** fase arterial; **(B)** fase arteriovenosa

3.6.4 *InfraRed*

Todos os pacientes foram submetidos ao IR no *baseline*, 3, 6 e 12. O aparelho utilizado foi o Heidelberg (Heidelberg Engineering, Alemanha). O objetivo foi ajudar no diagnóstico da doença. O IR baseia-se na emissão de luz infravermelha e mostra realce importante da 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 9).

Figura 9 - Imagem de *InfraRed* de grande angular do olho esquerdo da paciente #1. Área central de hiperreflectividade central correspondente à área de atrofia

3.6.5 Autofluorescência

Todos os pacientes se submeteram à AF no *baseline*, 3, 6 e 12. O aparelho utilizado foi o Heidelberg (Heidelberg Engineering, Alemanha). O exame de AF

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 AF são decorrentes do acúmulo de lipofuscina, e após a morte das células fotorreceptoras e consequente atrofia, essas áreas mostram diminuição da AF, sugerindo que esse exame é um bom marcador para a integridade do EPR (Côco; Baba; Sallum, 2007) (Figura 10).

Figura 10 - Imagem de autofluorescência de grande angular do olho direito da paciente #1. Área central de hipoautofluorescência circundada por halo hiperautofluorescente. Pontos difusos em todo polo com aumento da fluorescência correspondente aos *flecks*

3.6.6 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. A OCT tem sido cada vez mais utilizada no estudo da DS. Permite a detecção precoce do acúmulo de lipofuscina no RPE e na desorganização da camada fotorreceptora. Combinada com os dados da FAF, a OCT pode fornecer informações valiosas sobre o estadiamento da doença (Silva et al., 2014). Os pacientes foram submetidos ao exame sob midríase medicamentosa (Mydriacyl 1% e Fenilefrina 10%) no *baseline* e em todas as visitas subsequentes utilizando-se 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 11). Seu protocolo de aquisição delimita a MLI e a membrana de Bruch (MB) (como linhas interna e externa da retina, respectivamente). 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 11 - Exame de OCT do olho direito do paciente #4. **(A)** imagem do *InfraRed*; **(B)** imagem das camadas retinianas com importante atrofia macular central

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 12).

Figura 12 - Protocolo de aquisição da OCT

3.6.7 Eletrorretinograma (ERG)

Esse exame é realizado por meio de eletrodos oculares DTL® e cutâneos. Após limpeza e remoção do excesso de gordura da superfície, três eletrodos cutâneos são utilizados para o registro da ERG. Dois deles, os dos polos negativos dos olhos esquerdo e direito são posicionados na pele da respectiva têmpora lateral e o terceiro na fronte 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. Os pacientes foram submetidos ao exame na consulta inicial a fim de auxiliar no diagnóstico. A ERG mede a resposta gerada pelas células retinianas. Após adaptação no escuro, um *flash* resulta em resposta mediada por cones e bastonetes. Sendo que 80% dessa resposta é mediada por bastonetes. Os fotorreceptores geram o componente negativo inicial, denominado onda “A”, enquanto que as células de Muller e bipolares são responsáveis pela onda “B” Cleary e Reichel (2011) (Figura 13).

Figura 13 - Eletrorretinograma de campo total em indivíduos normais. Estímulos durante a adaptação ao escuro: Bastonetes (ROD), cones e bastonetes (CR). Após adaptação ao claro: Cone e 30 Hz

Imagem cedida pelo Prof.Dr. André M. Vieira Messias.

A ERGmf foi criada para detecção de disfunções retinianas locais, preenchendo a limitação da ffERG, 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 pseudorrandomizada, com o comprimento máximo de onda designada de "ncia-m", em que há 50% de probabilidade de cada elemento hexagonal passar para preto ou branco (Figura 14).

Figura 14 - Representação da ERGmf com estímulo de 61 hexágonos

Fonte: (Hood et al., 2012).

3.6.8 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 - SLO). O *eye tracker* permite a compensação precisa dos movimentos oculares. Semelhante ao padrão da perimetria automatizada (Standart Automated Perimetry - SAP), 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 da paciente #4. **(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 quatro *apostilb* (Figura 16).

Figura 17 - Análise da microperimetria do paciente #4, com distribuição em decibéis. Nesse caso, o paciente apresenta média de sensibilidade anormal de 15 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 (Hanout; Horan, 2015; Mandelcorn MS; Podbielski ; Mandelcorn ED, 2013). 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 18). A

BCEA mostra a área de tentativa de fixação pelo paciente. Quando o mesmo tenta fixar em diversos pontos, a BCEA é maior e demonstra instabilidade de fixação. No presente estudo, comparou-se a BCEA no *baseline* e após o procedimento.

Figura 18 - Área das elipses formadas por meio dos pontos de fixação (bivariate contour ellipse área). Paciente #4, com BCEA menor, área de 18.9 graus e maior estabilidade de fixação em comparação ao paciente #9, com BCEA de 175.1 graus

A microperimetria parte dos princípios da SAP, a principal diferença e grande vantagem em relação à SAP é que a sensibilidade da retina é medida e, simultaneamente, imagens da retina, criadas pela tecnologia de oftalmoscopia de varredura a laser (SLO), são processadas por um rastreador ocular para calcular e compensar movimentos oculares (perdas de fixação) que ocorrem durante a medição do campo visual, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A análise de fixação é o segundo resultado fundamental. Cada exame fornece uma medida da sensibilidade da retina e análise de fixação (estabilidade e posição do Locus Retinal Preferido). A escala de sensibilidade do MAIA é de 0 a 36 dB.

3.6.9 Coleta do material

O procedimento foi realizado no Setor de Transplante de Medula Óssea do HCFMRP-USP, por uma equipe de hematologistas. A coleta do aspirado de medula óssea é igual ao já tradicionalmente utilizado por hematologistas e oncologistas para transplante de medula óssea. O paciente era posicionado em decúbito lateral e após antisepsia 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 19).

Figura 19 - Ilustração da coleta da medula óssea na crista ilíaca posterior

Fonte: (Adaptado de Nóbrega, 2017).

3.6.10 Processamento das células

Após a aspiração da medula óssea dos pacientes, imediatamente o material era 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 solução 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 ser injetada foi, em média, $1,68 \times 10^4$ células em 0,1 ml. Foi realizado também estudo da viabilidade celular com azul de tripan (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - (A, B) Sequência de imagens mostrando a separação de células mononucleares após centrifugação por gradiente de *Ficoll Hystopaque*

Fonte: (Imagem cedida pelo Professor Dr. Rubens Camargo Siqueira).

Figura 21 - Ilustração da separação das células mononucleares após centrifugação

Fonte: (Cristo, s/d).

3.6.11 Injeção intravítrea

Os olhos dos pacientes foram divididos em tratados (T), referindo ao olho de pior AV e que receberia as células tronco *versus* olho não tratado (NT), referindo ao olho que receberia injeção simulada. 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. A técnica seguiu regras já amplamente utilizadas para aplicação de anti-VEGF: 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 fálicos e pseudofálicos, respectivamente, sendo prescrito colírio antibiótico (quinolona de quarta geração) quatro vezes ao dia, por sete dias, em ambos os olhos. No olho contralateral foram realizados os mesmos procedimentos, como antisepsia, assepsia com PVPI, campo e aplicada injeção simulada, de modo a participar como grupo controle.

3.7 Análise Estatística

Para todas as análises foi utilizado 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) foram aplicadas duas análises estatísticas, o teste t-pariado e a análise de covariância. O teste t pariado 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. Essa análise foi realizada paralelamente no olho tratado e no não tratado. A análise de covariância foi realizada para levar em consideração os efeitos observados nos olhos não tratados. Os resultados dessa análise compreenderam comparações entre todas as combinações possíveis dos termos “tempo” e “olho”, ou seja, resultados iniciais dos olhos tratados *versus* resultados iniciais do olho não tratado e, sucessivamente, tempo 1 *versus* tempo 0 e tempo 1 do olho tratado e não tratado e em todos os tempos nesse olho e no olho contra lateral. Esses cálculos revelaram diferenças estatisticamente significativas em número menor de observações e são de alta confiabilidade.

4. Resultados

Dez pacientes com DMS foram selecionados no Ambulatório de Retina do HCFMRP-USP, entre janeiro e outubro de 2014. Todos concluíram seis meses de avaliação e oito completaram nove meses; e seis pacientes finalizaram os 12 meses. Todos os pacientes residiam fora da cidade de Ribeirão Preto, sendo esse o maior dificultador. Um paciente brasileiro residia na Argentina e outros dois residiam em Rondônia, sendo o motivo de não completar o seguimento de doze meses por ultrapassar a data limite de avaliação que era 30 dias. Uma paciente precisou se afastar no final da pesquisa devido gestação.

4.1 Acuidade visual

A média da AV antes da IV no olho tratado foi de 1,1 logMAR (20/250), com um, três, seis e doze meses após a injeção IV foi de 0,96 logMAR (20/200⁺²), 0,92 logMAR (20/160⁻¹), 0,98 logMAR (20/200⁺²) e 0,92 logMAR (20/160⁻¹), respectivamente. No olho da injeção simulada, a média da AV no *baseline* foi de 1,0 logMAR (20/200) e com um, três, seis e doze meses de acompanhamento foi de 0,96 logMAR (20/200+2), 0,94 logMAR (20/160-2), 0,96 logMAR (20/200+2) e 0,88 logMAR (20/160+2), respectivamente. A AV no *baseline* no grupo T variou entre a melhor e pior acuidade, respectivamente, entre 20/125-1 a 20/640+2, passando para 20/100+2 e 20/400 no primeiro mês; 20/100-2 a 20/320 no terceiro mês e 20/100 a 20/400 no sexto mês; e ao final de um ano, 20/125+1 a 20/320. No grupo NT, a AV variou no *baseline* de 20/100+2 a 20/400, 20/100 a 20/400 com um, três e seis meses de seguimento e aos 12 meses, 20/100 a 20/320 (Figura 22).

Figura 22 - 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) do olho tratado (T) x olho não tratado

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 Baseline	Letras Ganhas	AV 3 meses
#1	20/160-2	4	20/160+2
#2	20/400	14	20/200-1
#3	20/400	7	20/320+2
#4	20/125-2	1	20/125-1
#5	20/125-2	4	20/125+2
#6	20/160-1	3	20/160+2
#7	20/640+2	22	20/200-1
#8	20/160-2	4	20/160+2
#9	20/125-1	4	20/100-2
#10	20/400-1	6	20/320

Houve diferença estatisticamente significativa no grupo T em todos os seguimentos. No grupo NT não houve diferença significativa. Considerando a análise de covariância, observou-se diferença significativa apenas no grupo T nos meses um, seis e 12.

4.2 Microperimetria

4.2.1 Limiar de sensibilidade (Average threshold - AT)

O limiar de sensibilidade foi testado em um campo de 30 graus, abordando de 0 a 36 dB. Os pacientes com resultados entre 0 e 24 dB eram considerados fora do normal nesse teste. Todos os pontos testados com nível de limiar igual a 26 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 25 e 26 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 da média da sensibilidade em todos os meses, a diferença significativa ocorreu apenas no primeiro mês pela análise do teste T ($p < 0,01$) e com doze meses na covariância

($p < 0,0097$). Esta última análise, fez questionar sobre o efeito “aprendizado”, uma vez que o esperado era a melhora dos parâmetros até o sexto mês após o procedimento pela certeza de que as células permanecem pelo menos seis meses intraocular e não como demontsrou aos 12 meses. No olho NT não houve diferença significativa em nenhuma análise (Figura 23).

Figura 23 - Representação gráfica da evolução da média do limiar de sensibilidade na microperimetria em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p) do grupo T e NT

Tabela 3 - Resultado da microperimetria (limiar de sensibilidade) nos dez olhos tratados

Pacientes	Baseline	1 mês	3 meses
#1	14,2	16,6	11,7
#2	9,4	19,8	14,5
#3	19,8	17,8	17,8
#4	15	25,2	25,6
#5	17,1	18,9	22,5
#6	24,4	26,8	26,1
#7	7,9	12,5	20,5
#8	9,7	13,1	19,1
#9	21,7	24,4	22,1
#10	11,7	11,6	13,0

Houve melhora do limiar de sensibilidade em todos os pacientes, exceto nos pacientes #1 e #3, que apresentaram redução discreta da sensibilidade com três meses e com melhora no sexto mês. A média do limiar de sensibilidade do grupo T no *baseline* foi de 15,0 dB e aos doze meses foi de 24,5. No grupo NT, a média inicial foi de 16,2 e aos 12 meses de 13,2. Houve, portanto, melhora ao longo dos meses nos olhos T, que receberam a FMMO, e manutenção dessa melhora em comparação aos olhos NT que apresentaram sensível redução na média do limiar de sensibilidade (Figuras 24 a 26).

Figura 24 - Evolução da média do limiar de sensibilidade no olho T x olho NT, no baseline, um, três, seis, nove e doze meses, respectivamente

Figura 25 - Imagem mostra a microperimetria do olho que recebeu a IV de quatro pacientes (#2, #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 quatro pacientes (#6 - #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

As imagens de microperimetria do paciente #1 foram perdidas após pane ocorrida no aparelho de microperimetria do HCFMRP-USP, mas ainda foi possível

utilizar as medidas obtidas, pois estavam também registradas no prontuário do paciente (Figura 27).

Figura 27 - Microperimetria do paciente #4 no *baseline*, um e três meses após a IV. Detalhes dos 36 pontos testados e a sua evolução

4.2.2 BCEA (bivariate contour ellipse area)

Outro dado avaliado na microperimetria foi o BCEA, que analisa a fixação do paciente, a estabilidade da visão ao fixar. O microperímetro fornece duas elipses formadas por diferentes pontos de fixação demonstrados na hora do exame. Quanto menor a área dessa elipse significa que o paciente apresentou fixação mais estável. Elipses grandes são formadas por pacientes que, na dificuldade de fixar, “procuram” muitos pontos na retina. No presente estudo, houve diminuição do BCEA nos grupos T e NT, com diferença estatística no sexto mês no grupo T pela análise do teste T pareado (Figura 25). Segundo a análise de covariância, a diminuição da BCEA, ou seja, a melhora na fixação ocorreu de forma significativa no grupo T nos seguimentos um, seis e nove (Figura 28).

Figura 28 - Representação gráfica mostrando a evolução do BCEA (microperimetria) em relação ao tempo de seguimento em meses e os respectivos níveis de significância (p) dos grupos T e NT

4.3 Eletroretinografia, *InfraRed*, Autofluorescência, OCT

Estes exames foram de fundamental importância para auxiliar no diagnóstico. Não foram realizadas análises estatísticas com seus dados.

4.4 Angiofluoresceinografia

O exame de angiofluoresceinografia foi realizado no *baseline*, três, seis e doze meses em todos os pacientes, exceto na paciente #3, que diagnosticou gestação após quatro meses do início do protocolo de pesquisa e, portanto, optou-se por não excluí-la do estudo, porém não realizou mais exame com contraste. Em todo o seguimento, não houve alterações como neovascularizações e crescimento de tumores; mostrando, portanto, o principal objetivo deste estudo, que foi a segurança do uso IV da FMMO.

5. Discussão

A expectativa de deficientes visuais em todo o mundo em 2020 é de 929 milhões de pessoas, com projeção de gastos de três trilhões de dólares, ocasionando importante impacto no custo da economia Global (Gordoís; Pezzullo; Cutler, 2010). As principais causas de perda de visão intratável são condições associadas a disfunções ou degenerações retinianas (Bunce; Wormald, 2006). Essas condições, em geral, são bilaterais e afetam a qualidade de vida desses pacientes, assim como a sua capacidade produtiva (Brown, 1999). As distrofias retinianas abrangem inúmeras doenças, cuja consequência final é a perda irreversível da visão. Como apresentam herança genética recessiva ou dominante, os pacientes convivem com esse diagnóstico a espera da evolução presumida, uma vez que até o momento não existe tratamento disponível para essas patologias. As distrofias atingem a população economicamente ativa e por isso destacam-se o importante impacto indireto, pela ausência da produtividade desse indivíduo, e o impacto financeiro direto, pelos gastos com exames complementares, suporte físico e pessoal, como cuidadores.

A retina é uma continuação do sistema nervoso central e, como o cérebro, é incapaz de se regenerar após a morte celular por doença ou trauma (Ávila, Alves MR, Nishi, 2015; Mead et al., 2015).

O propósito deste estudo foi investigar uma provável terapia, que até o momento não existe, para pacientes portadores da DMS, que se trata da distrofia macular juvenil mais comum, atingindo entre 1:800 a 1:10000 pessoas (Mukherje et al., 2014). De todos os órgãos possíveis para estudo com células tronco, o olho apresenta vantagens incomparáveis. Além de ter fácil acesso, é dividido em compartimentos e é protegido imunologicamente. Além disso, existem exames detalhados que permitem fazer comparações antes e após uma intervenção; também é necessária quantidade expressivamente menor de células ao se comparar ao uso de células tronco em outros órgãos (Tibbetts et al., 2012).

As células tronco, caracterizadas pela capacidade ilimitada de proliferação e formação de novas células, assim como sua ação neuroprotetora, imunomoduladora e antioxidante, fornecem perspectiva promissora para o tratamentos das distrofias retinianas (Jin et al., 2018).

Todos os ensaios clínicos atuais se encontram nas fases I/II. O teste de segurança é o primeiro passo do ensaio clínico. As principais doenças abordadas são DMRI, RP, Distrofia de Stargardt, Glaucoma e edema macular isquêmico, decorrente do diabetes ou oclusões retinianas.

Os diversos tipos de células tronco são divididos em dois importantes efeitos: o regenerativo, ou de substituição celular, e o trófico, ou parácrino, ou terapia de resgate funcional (Siqueira, 2015).

A terapia regenerativa consiste em substituir o tecido danificado por uma célula nova com capacidade funcional. Os principais estudos se baseiam no implante de um “patch” de EPR sub-retinino por meio de vitrectomia (Siqueira et al., 2010; Siqueira, 2011; Tibbetts et al., 2012; Vugler et al., 2007). Esse EPR precisa ser diferenciado *in vitro* por meio de ESCs ou iPCs antes da aplicação clínica a fim de minimizar o risco de proliferação anormal e formação de teratomas (Kawai et al., 2010).

A terapia trófica ou parácrina visa melhorar o micromambiente hostil da retina em degeneração pela liberação de fatores tróficos, citocinas, aumento da angiogênese, diminuição da inflamação, efeito anti-apoptótico, remodelamento da matrix extracelular e ativação das células tronco vizinhas (Siqueira et al., 2015a). Estudos recentes avaliaram a liberação da citocina anti-inflamatória (IL-10), que modula a atividade das células imunológicas, tais como as dendríticas, células T e B (Bull; Martin, 2011; Crisostomo et al., 2008; Oh et al., 2008). As principais células estudadas são as CHMO e as células progenitoras da retina.

As doenças retinianas não estão confinadas à lesão de uma única célula. As degenerações, em geral, apresentam deterioração do EPR e da retina externa; no glaucoma, há deterioração da retina interna e das células ganglionares; no diabetes, é esperado acometimento da retina interna devido à vasculopatia; no entanto estudos de imagem mostram também evolução com perda de fotorreceptores (Park et al., 2017). É interessante pensar em solucionar o problema na substituição direta da célula deteriorada por uma nova célula derivada de ESCs ou iPCs, no entanto, é muito simplista imaginar a cura pela substituição por um único tipo de célula, uma vez que os distúrbios retinianos, em geral, envolvem mais de um tipo de célula, além disso, os circuitos neuronais são completamente alterados no curso de uma doença

crônica retiniana. Como exemplo, os principais estudos em Stargardt e DMRI com ESCs (efeito regenerativo), visa substituir o EPR primariamente doente por um patch de EPR sadio. Entretanto, sabe-se que esses pacientes com doença avançada apresentam deterioração da camada dos fotorreceptores, assim como perda dos complexos circuitos neuronais, o que justifica muitos resultados não tão animadores com esse tipo de terapia (Park et al., 2017; Radtke et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Já a terapia trófica, objeto deste estudo, não tem como objetivo uma única célula. As CHMO são uma mistura heterogênea de células, algumas com efeito parácrino e outras com capacidade de enxerto direto, assim permitem que o seu efeito possa atingir uma variedade de células da retina e, conseqüentemente, maior diversidade de doenças por não ser específica (Cotrim et al., 2017; Park et al., 2017).

Tomita et al. (2002) demonstraram em estudo com camundongos com injúria retiniana que essas células são capazes de se integrar e se diferenciar em células neuronais retinianas, no entanto se sabe que o seu principal efeito é o trófico.

Antes dos diversos estudos para outras doenças, as HSC já eram amplamente utilizadas para reconstituir o tecido hematopoiético em doenças hematológicas, como as leucemias. Atualmente, diversas áreas avaliam seus benefícios, como na cardiologia para tratamento na revascularização miocárdica após isquemia, doenças reumatológicas como doença de Crohn e, mais recente, um estudo multicêntrico com pacientes com Esclerose múltipla (Cassinotti et al., 2008; Malmegrim et al., 2018; Siqueira, 2015). Parte dessa pesquisa multicêntrica se desenvolveu no HCFMRP-USP e utilizou as mesmas células, o mesmo laboratório e a mesma equipe de hematologistas utilizados no presente estudo. Houve melhora nas funções motoras, e menor recorrência da doença quando comparado ao tratamento convencional (Malmegrim et al., 2018).

No presente estudo, foram avaliados dez pacientes com diagnóstico prévio de DMS, entre 18 e 50 anos, e com AV pior ou igual a 20/125. O diagnóstico foi confirmado por meio de avaliação clínica, ERG, AF e IR. Todos os pacientes receberam injeção intravítrea contendo 0,1 ml de FMMO no olho de pior AV. O olho contralateral recebeu injeção simulada. Não foi observado qualquer tipo de complicação como infecções, descolamento de retina, uveíte ou formação de

tumores em nenhum dos pacientes envolvidos, mostrando o principal objetivo deste estudo que é a segurança. Estudos prévios também confirmaram essa segurança em outras doenças retinianas. Jonas et al. (2008) aplicaram injeção IV de FHMO em três pacientes com diagnóstico diferente de DMRI, retinopatia diabética e glaucoma, sem qualquer complicação. Siqueira (2011) relatou a mesma segurança em três pacientes com RP e em dois casos de distrofia de cones. Park et al. (2014) realizaram estudo fase I em seis pacientes (seis olhos) com isquemia ou degeneração retiniana, não sendo encontrados efeitos colaterais. Cotrim et al. (2017) avaliaram a segurança do uso IV das mesmas células em dez pacientes com DMRI seca. Arcieri (2018) demonstrou os mesmos resultados em 20 pacientes com RP. Esses são os principais estudos no mundo sobre a utilização de CHMO.

Diferente do estudo realizado por Cotrim et al. (2017), em pacientes com DMRI, neste estudo foi utilizado o olho contralateral como controle, já que se trata de uma doença que obedece maior simetria entre os olhos, enquanto a DMRI, em geral, é assimétrica, podendo ter a forma seca em um olho e a úmida no outro. Assim, em relação ao primeiro critério de análise, a AV, observou-se diferença estatisticamente significativa no grupo T em todos os seguimentos. No grupo NT, não houve diferença significativa. Dos dez pacientes, quatro ganharam mais de uma linha de visão aos três meses, sendo que o maior ganho foi de quatro linhas e o menor de uma letra. É importante destacar que o tempo que essas células permanecem intraocular é incerto. Em estudo pré-clínico com camundongos, Otani et al. (2004) demonstraram a permanência dessas células até os seis meses. Park et al. (2012) identificaram, por meio de análise imuno-histoquímica, células CD34+ incorporadas na vasculatura da retina de camundongos com isquemia aguda induzida um dia após a injeção IV e sua permanência por até seis meses. Posteriormente, Park et al. (2014), em estudo clínico, detectaram por meio do *Adaptive Optics* OCT, a presença de células hiperrefletivas, que podem corresponder às células CD34+, após um mês da IV, e sua permanência na retina, mas em menor quantidade, até a última avaliação, aos seis meses. Caballero et al. (2007) detectaram a rápida incorporação de células CD34 + em modelos murinos com isquemia retiniana induzida. Assim, apesar do acompanhamento dos pacientes ter sido até aos doze meses, as avaliações funcionais mais valorizadas foram até o sexto mês, mas principalmente

até o terceiro mês, quando se acredita ser o pico da função dessas células, e pelos estudos anteriormente citados destacarem a permanência até o sexto mês. Siqueira (2011) e Siqueira et al., (2013) observaram 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 de DS, DMRI, oclusão de artéria e veia centrais da retina e RP. A melhora variou de 3 a 65 letras; Cotrim et al. (2017) observaram melhora da AV, que variou de 3 a 19 letras nos pacientes com DMRI seca. Arcieri (2108) relatou melhora na AV até o quarto mês após aplicação IV da FMMO em pacientes com RP e justificou a ausência de manutenção desse efeito nos meses subsequentes pelo provável efeito transitório dessas células injetadas em uma única aplicação.

Foi desenvolvido um estudo usando FMMO para diversas doenças, tais como neuropatia óptica imune, neuropatia óptica hereditária de Leber, coroidopatia serpinginosa, neuropatia óptica isquêmica não arterítica e combinando várias formas de infusão no mesmo paciente, como retrobulbar, subtenoniano, intravítreo, intravenoso e no casos de pior AV, sub-retiniano e intra nervo óptico. Houve melhora da AV e no campo nos pacientes tratados (Weiss; Levy; Benes, 2015; Weiss; Levy; Malkin, 2015; Weiss; Benes; Levy, 2016; Weiss; Levy; Benes, 2016).

Na análise da microperimetria, foram avaliados dois critérios, o limiar de sensibilidade (AT) e a área de fixação desse paciente (BCEA). Este exame, por mostrar com detalhes o Local de fixação do paciente, cada ponto de sensibilidade e a estabilidade na fixação, foi realizado em todas as visitas, observando-se importante diferença entre o olho T e o NT. No *baseline*, o olho T apresentava sensibilidade média de 15 dB, menor que o olho NT, que era de 16,2 dB. Ao final de 12 meses, o olho T permaneceu com média de 24,5 dB, enquanto que o olho NT com 13,2 dB, evidenciando piora da sensibilidade no olho controle. Nos primeiros três meses, oito pacientes apresentaram melhora no limiar de sensibilidade, mas a diferença foi clinicamente significativa apenas no primeiro mês. No olho NT, não houve diferença significativa em nenhum seguimento. Park et al. (2014) compararam a média do AT, 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. Cotrim et al. (2017) relataram melhora da AT em todos os meses de seguimento dos pacientes com DMRI, sendo significativa apenas a partir do sexto mês, o que se questiona o efeito aprendido.

Em relação ao BCEA, houve melhora significativa da fixação ao sexto mês pelo teste T pareado e no primeiro, sexto e nono meses, pela análise de covariância. Não houve diferença significativa no olho controle. Cotrim et al. (2017) demonstraram melhora do BCEA em todo o seguimento, porém sem significância estatística.

A angiofluoresceinografia foi um importante exame para avaliar a segurança do uso da FMMO. Foi realizada em todos os pacientes e não demonstrou formação de neovascularização coroideana ou retiniana, assim como de tumores. Apesar de estudos demonstrarem melhora da perfusão retiniana com HSCs, não foram encontradas essas alterações vasculares no presente estudo (Otani et al., 2004).

Diferente dos resultados de estudos envolvendo RP, a OCT neste estudo não mostrou qualquer alteração na anatomia ou espessura retiniana. É esperada atrofia das camadas retinianas na DS, que se manteve durante todo o acompanhamento. Uma possível hipótese seria que o domínio espectral talvez não seja ainda suficiente para mostrar alterações anatômicas ao nível celular. Na RP, alguns pacientes desenvolvem edema macular com piora da AV. Assim, o OCT é um importante dado para análise. Siqueira et al. (2013) apresentaram um caso de resolução do edema macular no olho que recebeu IV da FMMO em comparação com o olho controle. O paciente já havia tratado por longo período com acetazolamida sem resultados. Segundo os autores, a FMMO pode, por meio do efeito parácrino, restaurar a barreira hematorretiniana, interferir no gradiente osmótico, favorecendo a absorção do fluido do edema. O uso de novas tecnologias, como o *Adaptive Optics*, poderia colaborar para melhor análise ao nível celular. Sua resolução axial depende das propriedades de coerência da fonte de luz, que é aproximadamente de 5 micra, o suficiente para atingir as dimensões axiais da maioria das células retinianas (Romano, 2015). Nesse sistema, a velocidade de aquisição da imagem é maior que o domínio espectral, reduzindo interferências e permitindo melhor imagem. Park et al. (2014) utilizaram essa tecnologia em pacientes submetidos à IV de células

CD34+ derivadas da medula óssea. Em três pacientes, notou-se o aparecimento de imagens hiperrreflectivas medindo o mesmo tamanho das células CD34+ (~10 µm) 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.

6. Conclusões

Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que o uso da FMMO autóloga, contendo células CD34+, mostrou-se seguro para aplicação IV em pacientes com DMS no período avaliado. O que reforça os resultados de estudos prévios com uso das mesmas células em outras doenças oculares.

A AV apresentou melhora significativa em todos os seguimentos no olho T em comparação ao olho controle (NT). Em relação ao limiar de sensibilidade na microperimetria, houve melhora, mas significativa apenas no primeiro mês. Já em relação à BCEA verificou-se melhora significativa em todo o seguimento no olho T.

O estudo envolveu um número pequeno de paciente, sendo seu principal objetivo avaliar a segurança do uso dessas células. É importante ampliar o número de pacientes para reforçar os dados de melhora encontrados. Algumas questões se mantêm sem respostas, como quanto tempo a célula sobrevive no meio intraocular, quando inicia o efeito trófico, se o congelamento do material para futuras aplicações no próprio paciente inviabilizaria o efeito das células, ou não. Considerando o principal efeito trófico da FMMO, possivelmente seria apresentada melhora mais significativa e proteção ocular em fases mais precoces da doença, quando a maioria das células ainda está em sofrimento, sem morte. Assim, além de um número maior de pacientes estudados, seria importante incluir aqueles com melhor acuidade. Outro fator importante seria utilizar tecnologia, como o *Adaptive Optics*, a fim de se obterem maiores detalhes sobre a adesão dessas células na retina, seu comportamento e tempo de permanência.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

Ahn J et al. Functional Interaction between the Two Halves of the Photoreceptor-specific ATP Binding Cassette Protein ABCR (ABCA4). *J Biol Chem.* 2003;278(41):39600-8.

Alkeus Pharmaceuticals Inc. A Phase 2 Multicenter, double-masked, randomized, placebo-controlled study to investigate the long term safety, tolerability, pharmacokinetics and effects of ALK-001 on the progression of Stargardt Disease. 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02402660?term=NCT02402660&rank=1>. Acesso em: 28 out. 2018.

Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 1997;17(1):122.

Alvarez Palomo AB et al. Prospects for clinical use of reprogrammed cells for autologous treatment of macular degeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2015;8:9.

Arcieri RS. Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração hereditária da retina - retinose pigmentar (RP). Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2018.

Asahara T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.

Astellas Institute for Regenerative Medicine Group. A Follow up study to determine the safety and tolerability of sub-retinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelial (hESC-RPE) cells in patients with stargardt's macular dystrophy (SMD). 2019. [Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT02941991+&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: 16 out. 2018.

Ávila M, Alves MR, Nishi M. As condições de saúde ocular no Brasil. 1ª Ed. São Paulo: Conselho Brasileiro de Oftalmologia, 2015, 147p.

Belfort Jr R. Stem cell therapy for outer retinal degenerations. 2017. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT02903576&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: 28 out. 2018.

Biophytis, The oxidative stress caused by A2E leads to retinal cell death 2019. Disponível em: <https://www.biophytis.com/en/aging-sciences/dmla/>. Acesso em: 05 mar. 2019.

Biswas-Fiss EE et al. Retinoid binding properties of nucleotide binding domain 1 of the Stargardt disease associated ABC transporter, ABCA4. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44097-107.

Brown GC. Vision and quality of life. *Trans Am Ophthalmol*. 1999;97():473-511.

Bunce C, Wormald R. Leading causes of certification for blindness and partial sight in England & Wales. *BMC Public Health*. 2006;6:58.

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

Caballero S et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes*. 2007;56(4):960-7.

California Institute for Regenerative Medicine (CIRM). Accelerate stem cell treatments to patients with unmet medical needs. 2018. [Disponível em: <https://www.cirm.ca.gov/>. Acesso em: 10 out. 2018.

Carr AJ et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One*. 2009; 4(12):e8152.

Cassinotti A et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(2):211-7.

Charbel Issa P et al. Rescue of the Stargardt phenotype in *Abca4* knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(27):8415-20.

Chen Y, Roorda A, Duncan JL. Advances in Imaging of Stargardt Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2010;664():333-40.

Chiou SH 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.

Cleary TS, Reichel E. Eletrofisiologia. In: Yanoff M, Duker JS. *Oftalmologia*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 545-9.

Côco 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.

Côco M, Han SW, Sallum JMF. Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina. *Arq Bras Oftalmol*. 2009;72(4):560-6.

Cotrim CC et al. Intravitreal use of bone marrow mononuclear fraction containing CD34+ stem cells in patients with atrophic age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:931-8.

Coussa RG, Utz VM, Traboulsi EI. Stargardt Disease (STGD). In: Traboulsi EI (ed.). *A Compendium of Inherited Disorders and the Eye*. Oxford University Press, 2017.

Disponível em: <https://www.aao.org/disease-review/stargardt-disease-stgd>. Acesso em: 11 out. 2018.

Cowan CA et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-6.

Cremers FP et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet*. 1998;7(3):355-62.

Crisostomo PR et al. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery*. 2008;143(5):577-81.

Cristo F. Fracionamento/Separação. s/d. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/282981/>. Acesso em: 11 out. 2018.

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

Ergun E et al. Assessment of central visual function in Stargardt's disease/ fundus flavimaculatus with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(1):310-6.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(12):1796-806.

Fishman GA et al. Variation of clinical expression in patients with Stargardt dystrophy and sequence variations in the ABCR gene. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(4):504-10.

Fujinami K et al. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmol*. 2011;89(3):297-8.

Fujinami K et al. A longitudinal study of stargardt disease: clinical and electrophysiologic assessment, progression, and genotype correlations. *Am J Ophthalmol*. 2013a;155(6):1075-88.e13.

Fujinami K et al. A longitudinal study of Stargardt disease: quantitative assessment of fundus autofluorescence, progression, and genotype correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013b;54(13):8181-90.

Fujinami K et al. Clinical and molecular analysis of Stargardt disease with preserved foveal structure and function. *Am J Ophthalmol* 2013c;156(3):487-501 e1.

Garber K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2015;33:890-1.

Gerth C et al. Phenotypes of 16 Stargardt macular dystrophy/fundus flavimaculatus patients with known ABCA4 mutations and evaluation of genotype-phenotype correlation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002;240(8):628-38.

Gill M et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88(2):167-74.

Gomes NL et al. A comparison of fundus autofluorescence and retinal structure in patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(8):3953–9.

Gordois A, Pezzullo L, Cutler H. The Global Economic Cost of Visual Impairment. AMD Alliance International. 2010. 88p. Disponível em: http://www.icoph.org/dynamic/attachments/resources/globalcostofvi_finalreport.pdf. Acesso em: 26 out 2018.

Grant MB 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 USA*. 1979;76(11):5665-8.

Guo XL, Chen JS. Research on induced pluripotent stem cells and the application in ocular tissues. *Int J Ophthalmol*. 2015;8(4):818-25.

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.

Hood DC 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 et al. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11331-6.

Jin ZB et al. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retin Eye Res*. 2018;S1350-9462(17)30123-4.

Jonas JB et al. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol*. 2008;86(20):225-6.

Kawai H et al. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(8):1487-93.

Kocher AA 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.

Kong J et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:5210.

Kretschmann U et al. Multifocal electroretinography in patients with Stargardt's macular dystrophy. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(3):267-75.

Kuppersmann B. jCyte presents results of clinical testing in retinitis pigmentosa. (2019a). Disponível em: <http://jcyte.com/2017/12/jcyte-presents-results-of-clinical-testing-in-retinitis-pigmentosa/>. Acesso em: 10 nov. 2018.

Kuppersmann B. Safety and efficacy of intravitreal injection of human retinal progenitor cells in adults with retinitis pigmentosa. (2019b). Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03073733?term=jCyte&rank=1>.

Lambertus S et al. Early-onset stargardt disease: phenotypic and genotypic characteristics. *Ophthalmology*. 2015;122(2):335-44.

Lanza G 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.

Lanza R et al. (eds.). *Essentials of stem cell biology*, 2nd ed. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2009.

Leeper NJ, Hunter AL, Cooke JP. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2010;122(5):517-26.

Li Y et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med*. 2012;18:1312-9.

Liu Y et al. Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):209.

Lois N et al. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(3):359-69.

Lu B et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009;21(9): 2125-35.

Lund RD et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic rats. *Cloning Stem Cells*. 2006;8(3):189-99.

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

Maia Jr OO et al. Estudo macular na doença de Stargardt. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(1):7-12.

Malmegrim KCR et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases: From Mechanistic Insights to Biomarkers. *Front Immunol.* 2018;9:2602.

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.

Markel TA et al. 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.

Mata NL, Weng J, Travis GH. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7154-9.

Mead B et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res.* 2015;14(3):243-57.

Mehat MS et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2018;125(11):1765-75.

Meyer JS et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(39):16698-703.

Michaelides M, Hunt DM, Moore AT. The genetics of inherited macular dystrophies. *J Med Genet.* 2003;40(9):641-50.

Minamino K et al. Long-term survival of bone marrow-derived retinal nerve cells in the retina. *Neuroreport.* 2005;16(12):1255-9.

Mitchell P et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(1):2-13.

Molday RS, Zhong M, Quazi F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(7):573-83.

Mukherjee N et al. Diagnosis and managemet Stargardt Disease. *Eynet*, 2014. 29-31.

Noble KG, Carr RE. Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(7):1281-5.

Nóbrega L. Medula Óssea: Definição e Anatomia. In: O Legado de: Carlos Nicola Perim - Dr. Coragem. 2017. Disponível em: <http://carlosnicolaperim.com.br/medula-ossea-definicao-e-anatomia>. Acesso em 10/11/2018.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.

Oh KT et al. Clinical phenotype as a prognostic factor in Stargardt disease. *Retina*. 2004;24(2):254-62.

Oh JY 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.

Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(4):373-81.

Osakada F 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 et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med*. 2002;8(9):1004-10.

Otani A 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 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 et al. 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 et al. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction. *Prog Retin Eye Res*. 2017;56:148-65.

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

Petrus-Reurer S et al. Integration of subretinal suspension transplants of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells in a large-eyed model of geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(2):1314-22.

Radtke ND et al. Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients. *Am. J. Ophthalmol*. 2002;133(4):544-50.

Regenerative Patch Technologies Group. Long term follow up of sub-retinal transplantation of hesc derived rpe cells in Stargardt macular dystrophy patients. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT02445612&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: 28 out. 2018.

Regenerative Patch Technologies Group. Study of subretinal implantation of human embryonic stem cell-derived RPE cells in advanced dry AMD. 2019. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02590692?cond=dry+amd&draw=2&rank=11>. Acesso em: 28 out. 2018.

Romano ACO. Perspectivas futuras na tomografia de coerência óptica. e-Oftalmo. CBO: Rev Dig Oftalmol. 2015;1:1.

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

Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5(2):a017111.

Sanofi. Phase I/II Study of SAR422459 in Patients With Stargardt's Macular Degeneration. 2019. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01367444?term=NCT01367444&rank=1>. Acesso em: 15 jan 2019.

Schachat A et al. Ryan's Retina. 6th Ed. V. 2. Elsevier, 2017. p. 965.

Schindler EI et al. Deducing the pathogenic contribution of recessive ABCA4 alleles in an outbred population. Hum Mol Genet. 2010;19(19):3693-701.

Schwartz SD et al. Embryonic stem cell trials for & macular degeneration: a preliminary report. Lancet. 2012;379(9817):713-20.

Schwartz SD et al. 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.

Semo M et al. Efficacy and safety of human retinal progenitor cells. Transl Vis Sci Technol. 2016;5(4):6.

Silva FNA et al. Stargardt disease/Fundus flavimaculatus. 2014. Disponível em: https://eyewiki.aao.org/Stargardt_disease/Fundus_flavimaculatus. Acesso em: 2 fev. 2019.

Siqueira RC et al. 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 et al. 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 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 et al. Improvement of ischaemic macular edema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived haematopoietic stem cells. *Acta Ophthalmol*. 2015b;93(2):e174-6.

Sohn EH, Mullins RF, Stone EM. Macular dystrophy. In: Schachat A et al. (aut.). *Ryan's Retina*. 6th Ed. V. 2. Elsevier, 2017. cap. 44, p. 968.

Soliman MK et al. High-Resolution Imaging of Parafoveal Cones in Different Stages of Diabetic Retinopathy Using Adaptive Optics Fundus Camera. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152788.

Stargardt K. Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1909;71:534-50.

Strauss RW et al. The natural history of the progression of atrophy secondary to Stargardt disease (ProgStar) studies: design and baseline characteristics: ProgStar Report No. 1. *Ophthalmology*. 2016;123(4):817-28.

Strom SP, Gorin MB. Evaluation of autosomal dominant retinal dystrophy genes in an unaffected cohort suggests rare or private missense variants may often be benign. *Mol Vis*. 2013;19:980-5.

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.

Tanna P et al. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(1):25-30.

Thomson JA 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 et al. Stem cell therapy for retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23(3):226-34.

Timmers AM, van Groningen-Luyben DA, de Grip WJ. Uptake and isomerization of

all-trans retinol by isolated bovine retinal pigment epithelial cells: further clues to the visual cycle. *Exp Eye Res.* 1991;52(2):129-38.

Tomita M et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells.* 2002;20(4):279-83.

Travis GH et al. Diseases caused by defects in the visual cycle. Retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:469-512.

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.

Van Huet RA et al. Foveal sparing in Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(11):7467-78.

Vasireddy V, Wong P, Ayyagari R. Genetics and molecular pathology of Stargardt-like macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(3): 191-207.

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 et al. Embryonic stem cells and retinal repair. *Mech Dev.* 2007;124(11-12):807-29.

Weiss JN, Levy S, Benes SC. Stem cell ophthalmology treatment study (Scots) for retinal and optic nerve diseases: a case report of improvement in relapsing autoimmune optic neuropathy. *Neural Regen. Res.* 2015;10(9):1507-15.

Weiss JN, Levy S, Malkin A. Stem cell ophthalmology treatment study (Scots) for retinal and optic nerve diseases: a preliminary report. *Neural Regen Res.* 2015;10(6):982-8.

Weiss JN, Benes SC, Levy S. Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS): improvement in serpiginous choroidopathy following autologous bone marrow derived stem cell treatment. *Neural Regen Res.* 2016;11(9):1512-6.

Weiss JN, Levy S, Benes SC. Stem cell ophthalmology treatment study (Scots): bone marrow-derived stem cells in the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. *Neural Regen Res.* 2016;11(10):1685-94.

Westeneng-van Haaften SC et al. Clinical and genetic characteristics of late-onset Stargardt's disease. *Ophthalmology.* 2012;119(6):1199-210.

Wirtitsch MG et al. Ultrahigh resolution optical coherence tomography in macular dystrophy. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(6):976-83.

Yin Z-Q. Clinical study of subretinal transplantation of human embryo stem cell derived retinal pigment epitheliums in treatment of macular degeneration diseases. 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=NCT02749734&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: 12 out. 2018.

Zarbin M. Cell-Based Therapy for Retinal Disease: The New Frontier. *Methods Mol Biol*. 2019;1834:367-81.

Zernant J et al. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8479-87.

Zhang K et al. Molecular genetics of macular dystrophies. *British J Ophthalmol*. 1996;80(11):1018-22.

Zhang Y et al. Limitation of anatomical integration between subretinal transplants and the host retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(1):324-31.

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

Zhou Q. Treatment of dry age related macular degeneration disease with retinal pigment epithelium derived from human embryonic stem cells. 2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03046407?cond=dry+amd&draw=4&rank=37>. Acesso em: 12 out. 2018.

8. Anexos

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL INFANTE D.
HENRIQUE / ASSOCIAÇÃO
BENEFICÊNCIA PORTUGUESA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo Prospectivo Unicêntrico de Aplicação Intraocular de Células Tronco Mononucleares Autólogas em Pacientes Portadores de Doenças Degenerativas e Isquêmicas da Retina com Alto Risco de Cegueira

Pesquisador: Rubens Camargo Siqueira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66839617.2.0000.5629

Instituição Proponente: CENTRO ESPECIALIZADO RETINA E VITREO LTDA - EPP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.879.573

Apresentação do Projeto:

Apesar das diversas observações apresentadas as Distrofias Hereditárias da Retina, não tem ainda tratamento efetivo, para atrasar a evolução, ou reverter estas doenças^{7,8,9}. E também até os dias de hoje não há tratamento disponível para recuperar funcionalmente ou melhorar a visão em pacientes com retinopatia isquêmica³⁷⁻⁴⁰. Até o momento, os estudos clínicos com a Terapia Celular Hematopoiética Autóloga, mostraram a segurança do procedimento, e também a possibilidade de melhora do campo visual e funcional da retina

identificado pelo eletrorretinograma. Sem ter apresentado Eventos Adversos relacionados com esta Terapia. Em pacientes portadores de doença vascular e especial edema macular, apresentaram melhora do edema após a injeção intravítrea de células tronco derivadas da medula óssea. O objetivo deste Projeto é ampliar esta experiência, do uso de células tronco derivadas da medula óssea para tratamento de doenças da retina progressivas com alto risco de levar a cegueira e que não possuem outra opção de tratamento. Todo o procedimento será realizado de acordo com os procedimentos Éticos exigidos e baseado em protocolos já aprovados pelo CONEP. Estes dados poderão futuramente ser utilizados para publicação científica, contribuindo também com mais informações para os protocolos já em andamento. Por isso este Estudo vem hoje propor um novo Tratamento para estas Patologias que são tão nocivas para o um grande número da população e que atingem diretamente a sua

Endereço: Rua Luiz Vaz de Camões, 3150

Bairro: VILA REDENTORA

CEP: 15.015-750

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)2139-1800

Fax: (17)2139-1800

E-mail: cep@benepreito.com.br

HOSPITAL INFANTE D.
HENRIQUE / ASSOCIAÇÃO
BENEFICÊNCIA PORTUGUESA

Continuação do Parecer: 2.879.573

qualidade de vida cotidiana.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Utilização de células mononucleares contendo células tronco derivadas da medula óssea para tratamento de doenças degenerativas e isquêmicas da retina com alto risco de levar a cegueira e que não possuem outra opção de tratamento.

Objetivos Secundários

Avaliar prospectivamente 30 pacientes submetidos a injeção intravítrea de células mononucleares derivada da medula óssea avaliando os seguintes aspectos

- acuidade visual
- Avaliação funcional da retina através do eletrorretinograma
- avaliar as características do tecido retiniano e complexo epitélio pigmentado e coróide através da tomografia de coerência óptica (OCT)
- avaliar as características do tecido retiniano e sua vasculatura através da angiofluoresceinografia
- avaliar viabilidade das células do epitélio pigmentado através do exame de autofluorescência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Existe um risco mínimo para o implante de células tronco como; infecção intraocular, hemorragia, descolamento da retina, atrofia ocular.

Benefícios

A possibilidade de benefícios poderá ou não se remota, o que realmente se espera é que tenha alguma melhora e se não tiver que o seu problema não se agrave, ou seja, a não piora do quadro clínico e também este estudo poderá trazer informações que serão benéficas futuramente para o tratamento desta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem considerações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo apresentado esta de acordo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendência.

Endereço: Rua Luiz Vaz de Camões, 3150

Bairro: VILA REDENTORA

CEP: 15.015-750

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)2139-1800

Fax: (17)2139-1800

E-mail: cep@beneriopreto.com.br

HOSPITAL INFANTE D. HENRIQUE / ASSOCIAÇÃO BENEFICÊNCIA PORTUGUESA

Continuação do Parecer: 2.879.573

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada referente a inclusão de um cetro participante sendo ele o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP e dos seguintes Membros a equipe Rodrigo Jorge e Carina Costa Cotrim.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1211963_E1.pdf	31/08/2018 10:23:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_Laboratorio.pdf	10/04/2017 10:34:20	LUIZ GUSTAVO DE QUADROS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/04/2017 17:45:47	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	09/04/2017 17:45:38	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade_Investigador.pdf	09/04/2017 17:20:06	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	09/04/2017 17:19:51	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/04/2017 17:19:32	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	09/04/2017 17:19:20	Rubens Camargo Siqueira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	07/04/2017 10:56:35	Rubens Camargo Siqueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Luiz Vaz de Camões, 3150

Bairro: VILA REDENTORA

CEP: 15.015-750

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)2139-1800

Fax: (17)2139-1800

E-mail: cep@benepioproto.com.br

HOSPITAL INFANTE D.
HENRIQUE / ASSOCIAÇÃO
BENEFICÊNCIA PORTUGUESA

Continuação do Parecer: 2.879.573

SAO JOSE DO RIO PRETO, 06 de Setembro de 2018

Assinado por:
LUIZ GUSTAVO DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Rua Luiz Vaz de Camões, 3150

Bairro: VILA REDENTORA

CEP: 15.015-750

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)2139-1800

Fax: (17)2139-1800

E-mail: cep@beneriopreto.com.br

ANEXO B - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES PORTADORES DE Distrofia Macular Tipo Stargardt (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 à injeção e um, três, seis e doze meses realizaremos exames para acompanhamento do caso e verificação do sucesso do tratamento (estes exames são: acuidade visual, microperimetria, eletrorretinografia).

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 trimestralmente 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 pelo Dr. Rubens Camargo Siqueira.

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 ou sua equipe através do telefone (17) 32345858. 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

Nome Assinatura do Participante Data

Nome Assinatura do Pesquisador Data

Nome Assinatura da Testemunha Data