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

RAFAEL SARAN ARCIERI

**Uso intravítreo de fração mononuclear da medula
óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes
portadores de degeneração hereditária da retina -
retinose pigmentar (RP)**

RIBEIRÃO PRETO

2018

RAFAEL SARAN ARCIERI

Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração hereditária da retina - retinose pigmentar (RP)

Versão Corrigida

Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação

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

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

Orientador: Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Arcieri, Rafael Saran

Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração hereditária da retina - retinose pigmentar (RP). Rafael Saran Arcieri / Orientador: André Márcio Vieira Messias, Ribeirão Preto - 2018.

96p.: 23il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

1. Retinose pigmentar. 2. Fração mononuclear da medula óssea (FMMO) 3. Células tronco. 4. Distrofia hereditária da retina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: ARCIERI, Rafael Saran

Título: Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração hereditária da retina - retinose pigmentar (RP).

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

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

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Rogério e Marilza, exemplos de vida, a quem devo por minha formação, pelo carinho, apoio e pelos incentivos constantes.

Homenagem Póstuma

Ao Professor Dr. Júlio César Voltarelli, que nos deixou precocemente, minha saudosa e eterna gratidão.

*DIZEM: “QUANDO MORRE UM GRANDE MESTRE,
UMA BIBLIOTECA DESAPARECE”. VOCÊ TEVE UM
PAPEL IMPRESCINDÍVEL.*

Agradecimentos afetivos

À minha avó, Benedita, pelo apreço, incentivo, amor e alegria no convívio familiar.

Ao meu irmão, Enyr, pelo exemplo de honestidade e competência; à sua esposa Marcela pela amizade e à minha sobrinha Maria Luísa, pela inocência e alegria.

À minha tia Maria de Lourdes, pelo exemplo de dedicação e amor a seus pacientes.

Aos amigos Joaquim, Letícia Barroso, Murilo Miranda, Renato, Fabiano Sakamoto, Antônio Brunno, Vinícius Monteiro, Viviane e Alexis, pela amizade e pelo apoio em Ribeirão Preto, durante a convivência no HCFMRP/USP.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. André Márcio Vieira Messias, nosso orientador, exemplo de liderança e dedicação ao ensino e à pesquisa, pelo constante estímulo e apoio durante o período de minha subespecialização e doutorado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, além dos grandes conhecimentos e da análise estatística desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira, nosso coorientador, por ter propiciado condições para a execução deste estudo e pelo ambiente de amizade favorável à execução da segunda fase de sua pesquisa utilizando células tronco.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, Dr. Felipe Piacentini Paes Almeida, Dr. José Afonso Ribeiro Ramos Filho, Dra. Maria Leticia Paccola e Dr. Marco Sérgio Pinto Alves Folgosa, pelos ensinamentos transmitidos e pelo apoio durante o período da subespecialização no Setor de Retina e Vítreo no HCFMRP-USP.

Aos docentes e técnicos administrativos do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pelo acolhimento e auxílio durante minha estada nesta renomada instituição de ensino.

Aos médicos (as), enfermeiros (as) e funcionários dos setores

de Transplante de Medula Óssea (TMO), Terapia Celular do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, pelo trabalho fundamental e apoio na coleta e no preparo das células tronco utilizadas.

Aos pacientes que, voluntariamente, se disponibilizaram a participar desta pesquisa, meu profundo agradecimento, pois sem vocês este estudo não seria possível.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante parte da realização desta pesquisa.

À Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, pela análise e aprovação do projeto de pesquisa.

À Dra. Katharina Messias, Lucélia Albiéri, Andréia e Elisete Maia Gonçalves, pela amizade e colaboração em todas as etapas do desenvolvimento da pesquisa.

À Maria Cecília Onofre, ao Rogério Ap. Mazzucato Castania e ao Edson Lucio Beráguia, meus sinceros agradecimentos pela amizade, dedicação e pelo apoio durante a minha permanência no Departamento de Oftalmologia e durante a pós-graduação.

**"Há muitas pessoas de visão perfeita
que nada vêem. O ato
de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"**

Rubens Alves

Resumo

ARCIERI, R. S. **Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração hereditária da retina - retinose pigmentar (RP)**. 2018. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: A Retinose Pigmentar (RP) é uma doença hereditária da retina, caracterizada por perda da função visual, principalmente devido à degeneração dos fotorreceptores (bastonetes e cones). **Objetivo:** Avaliar os efeitos de uma única injeção intravítrea de fração mononuclear de células da medula óssea (FMMO) CD34+ em pacientes portadores de RP. **Métodos:** Ensaio clínico aberto, não randomizado, prospectivo, observador mascarado, no qual 20 pacientes, portadores de RP, com boa fixação ao exame de campo visual, foram incluídos. Única injeção intravítrea (IIV) de FMMO foi aplicada em apenas um dos olhos de cada paciente, enquanto que os olhos contralaterais serviram como controle e foram submetidos à injeção simulada. As avaliações incluíram: melhor acuidade visual corrigida (MAVC); campo visual estático - estratégia 30-2 (Octopus 900); microperimetria (MAIA - Center Vue) para avaliar estabilidade de fixação e sensibilidade macular; eletrorretinografia de campo total (ERG) e multifocal (mfERG) - padrão da ISCEV usando aparelho Espion E2 (Diagnosys LLC) e tomografia de coerência óptica (OCT). Os exames foram realizados antes da injeção e 4, 16, 32 e 48 semanas após. **Resultados:** Não houve diferença significativa na MAVC durante o seguimento. A diferença entre MAVC medida após 48 semanas e a basal foi de $-0,04 \pm 0,02$ logMAR nos olhos tratados frente a $-0,03 \pm 0,01$ logMAR nos controles ($p=0,3898$). A melhora da sensibilidade macular foi discretamente maior nos olhos com FMMO: $1,0 \pm 0,5$ dB do que nos olhos contralaterais: $0,2 \pm 0,5$ dB, mas sem significância estatística ($p=0,0569$). Não se observou mudança na estabilidade de fixação. A perda de desvio médio (MD) do campo visual dos olhos tratados ($0,33 \pm 0,70$ dB) foi discretamente menor do que nos olhos controle ($1,12 \pm 0,58$ dB) ($p=0,0761$). Nenhuma diferença significativa foi observada nas amplitudes e latências das respostas eletrorretinográficas durante o período avaliado. Não se verificou nenhuma complicação e nem efeito colateral após a injeção. **Conclusão:** A aplicação intravítrea de FMMO contendo células CD34+ mostrou-se segura em pacientes com RP. Observou-se, ainda, discreta melhora na sensibilidade macular, mas esta não foi significativa estatisticamente. Estudos futuros são necessários para esclarecer o potencial uso dessas células em distrofias retinianas.

Palavras chave: Retinose pigmentar. Células tronco. Fração mononuclear da medula óssea. Distrofia hereditária da retina. Células hematopoiéticas.

Abstract

ARCIERI, R. S. **Intravitreal use of bone marrow mononuclear fraction (BMMF) containing CD34+ cells in patients with hereditary retinal degeneration - retinitis pigmentosa (RP)**. 2018. 96f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary disease of the retina, characterized by loss of visual function, mainly due to degeneration of the photoreceptors (rods and cones). **Objective:** To evaluate the effects of a single intravitreal injection of bone marrow mononuclear fraction (BMMF) containing CD34+ cells in patients with RP. **Methods:** Open trial, non-randomized, prospective, masked observer, in which 20 patients with RP with good fixation in visual field examination were included. Single intravitreal injection of BMMF was performed in only one eye of each patient, while the contralateral eyes served as control and underwent sham injection. Evaluations included: best corrected visual acuity (BCVA); static visual field - strategy 30-2 (Octopus 900); microperimetry (MAIA - Center Vue) to evaluate fixation stability and macular sensitivity; full-field (ERG) and multifocal (mfERG) electroretinograms according to the ISCEV using Espion E2 (Diagnosys LLC) and optical coherence tomography (OCT). The exams were performed before the injection and 4, 16, 32 and 48 weeks after. **Results:** There was no significant difference in BCVA during follow-up. The difference measured in BCVA between 48 weeks and baseline was 0.04 ± 0.02 logMAR in treated eyes versus -0.03 ± 0.01 logMAR in controls ($p=0.3898$). The improvement in macular sensitivity was slightly higher in BMMF eyes: 1.0 ± 0.5 dB than in contralateral eyes: 0.2 ± 0.5 dB, but without statistical significance ($p=0.0569$). No change in fixation stability was observed. The mean deviation loss (MD) of the visual field in treated eyes (0.33 ± 0.70 dB) was slightly lower than in the control eyes (1.12 ± 0.58 dB) ($p=0.0761$). No significant difference was observed evaluating amplitudes and latencies of ERG and mfERG responses during the follow-up. No complications or side effects were observed after the injection. **Conclusion:** The intravitreal injection of BMMF containing CD34 + cells was shown to be safe in patients with RP. There was still a slight improvement in macular sensitivity, but this was not statistically significant. Future studies are needed to clarify the potential use of these cells in retinal dystrophies.

Keywords: Retinitis pigmentosa, Stem cells, Mononuclear bone marrow fraction, Hereditary retinal dystrophy, Hematopoietic cells.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Estímulo luminoso e ativação dos fotorreceptores.....	27
Figura 2 -	Esquema ilustrando os tipos celulares componentes da retina.....	28
Figura 3 -	Corte histológico da retina mostrando suas 10 camadas.....	29
Figura 4 -	Fotorreceptor (bastonete) com discos de membranas no segmento externo (A) e diagrama representando as principais reações de ativação celular após a absorção da luz (B)	30
Figura 5 -	Representação da proteína rodopsina. Esquerda: posição da rodopsina no do segmento externo do bastonete. Direita: Representação tridimensional da rodopsina.	31
Figura 6 -	(A) Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina: entre os pontos A e B ocorre a geração da corrente I_1 até o ponto C. A corrente I_2 atravessa as estruturas extraoculares voltando à esclera no ponto E, e o circuito se completa passando pela coróide, pelo EPR e pela retina. (B) Circuito elétrico mostrando o local de aquisição do potencial elétrico do ERG e as principais resistências elétricas envolvidas, onde R1 representa a resistência da retina; R2 do corpo vítreo, cristalino e da córnea; R3 das estruturas extraoculares e R4 (maior) do EPR.	33
Figura 7 -	Amplitude das ondas a e b em ERG normal. Os esquemas apresentam variação negativa do potencial. Onda a , gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores, seguida por uma variação positiva do potencial; onda b , creditada à despolarização das células bipolares. Sobrepondo a onda b, ocorrem variações rápidas do potencial elétrico chamado de potencial oscilatório, originário das camadas intermediárias da retina, principalmente células amácrinas.	34
Figura 8 -	Mutações nos aminoácidos da proteína rodopsina em casos de RP (alterações destacadas em vermelho).	36
Figura 9 -	Mutações nos aminoácidos da proteína periferina/RDS em casos de RP (alterações destacadas em vermelho)	37
Figura 10 -	Retinografia normal.....	38
Figura 11 -	Retinografia e autofluorescência de paciente incluído no estudo (olho direito e esquerdo).....	39
Figura 12 -	Imagem SLO microperimetria.	50
Figura 13 -	Mapa sensibilidade microperimetria.....	51

Figura 14 -	<i>Average threshold</i> (AT) e histograma de distribuição limiar de sensibilidade	52
Figura 15 -	<i>Bivariate contour ellipse area</i> (BCEA) e nuvem de pontos de fixação.....	53
Figura 16 -	Campo visual 30-2 de paciente incluído no estudo.....	54
Figura 17 -	Eletrorretinogramas de campo total - exemplos ilustrativos de padrão de resposta em indivíduos normais. Estímulos durante a adaptação ao escuro: bastonete (ROD); cone e bastões (CR). Após adaptação ao claro: cone e 30 Hz (flicker)	55
Figura 18 -	mfERG de paciente incluído no estudo.....	56
Figura 19 -	Tomografia de coerência (OCT) de paciente incluído no estudo evidenciando cistos intrarretinianos	57
Figura 20 -	OCT de paciente submetido à IIV de FMMO contendo células CD34+ antes e após terapia, com resolução dos cistos intrarretinianos.	71
Figura 21 -	Análise espessura macular em paciente submetido à IIV.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características demográficas dos participantes.	62
Tabela 2 - Melhor Acuidade Visual Corrigida - MAVC (logMAR): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos	63
Tabela 3 - Campo visual 30-2 (valores de MD em dB): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos.....	64
Tabela 4 - Sensibilidade macular (dB - microperimetria): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos.....	66
Tabela 5 - Espessura macular medida em micra (OCT): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos.....	67

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** - Variação melhor acuidade visual (logMAR) x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)63
- Gráfico 2** - Variação Mean Deviation (dB) no campo visual 30-2 x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)64
- Gráfico 3** - Variação sensibilidade macular (dB) na microperimetria x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)65

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ABMSC	Células tronco autólogas derivadas da medula óssea
AO	Ambos os olhos
AT	<i>Average Threshold</i> (média do limiar)
AV	Acuidade visual
BCEA	<i>Bivariate contour ellipse área</i>
°C	Graus centígrados medidos na escala Celsius
CD34+	<i>Cluster of Differentiation 34</i>
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
dB	Decibéis
DMRI	Doença macular relacionada à idade
DDR	Doença degenerativa da retina
EPCs	Células progenitoras endoteliais
EPR	Epitélio pigmentado da retina
ERG	Eletrorretinograma de campo total
ESCs	Células tronco embrionárias (<i>embryonic stem cells</i>)
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
FMMO	Fração mononuclear da medula óssea
HCFMRP- USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
HIV-	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HSCs	Células tronco hematopoiéticas (<i>hematopoietic stem cells</i>)
IC 95%	Medida de significância estatística, intervalo de confiança de 95 por cento
IIV	Injeção intravítrea

ISCEV	Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Visual Clínica (<i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>)
IV	Intravítrea
Lin+	Linhagem positiva de células
Lin-	Linhagem negativa de células
MAIA	<i>Macular integrity assessment</i> (avaliação de integridade macular)
MAVC	Melhor acuidade visual corrigida
MD	<i>Mean deviation</i>
mfERG	Eletrorretinograma multifocal
ml	Mililitro
mm	Milímetro
OBI	Oftalmoscopia binocular indireta
OCT	Tomografia de coerência óptica
OR	Medida de desfecho, abreviação para a palavra americana <i>odds ratio</i> , frequentemente traduzida como razão de chances para o português
p	Medida de significância estatística
PO	Potenciais oscilatórios
PRL	Ponto de retina preferido (fixação)
RP	Retinose pigmentar
s	Tempo medido em segundos
SLO	<i>Scanner Laser Ophthalmoscopy</i>
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Anatomia da retina	26
1.2. Histologia da retina	28
1.3. Eletrofisiologia visual	30
1.4. Eletrorretinograma (ERG)	32
1.5. Retinose pigmentar (RP)	34
1.6. Epidemiologia da RP	35
1.7. Bases genéticas da RP	35
1.8. Manifestações clínicas e oculares	37
1.9. Terapia celular	40
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	46
3.1. Desenho do estudo	47
3.2. Local do estudo	47
3.3. Aspectos éticos e gerais	47
3.4. Critérios de inclusão	48
3.5. Critérios de exclusão	48
3.6. Retirada de pacientes do estudo	49
3.7. Avaliações clínicas	49
3.7.1. Exame oftalmológico	49
3.7.2. Melhor acuidade visual corrigida (MAVC)	50
3.7.3. Microperimetria	50
3.7.4. Campimetria computadorizada	53
3.7.5. Eletrorretinograma de campo total (ERG)	54
3.7.6. Eletrorretinograma multifocal (mfERG)	55
3.7.7. Tomografia de coerência óptica (OCT)	57
3.8. Técnica cirúrgica	58
3.8.1. Coleta da medula óssea	58
3.8.2. Preparo das células tronco - FMMO contendo células CD34+	58
3.8.3. Procedimento de injeção intravítrea	59
3.9. Avaliações e acompanhamento após terapia	59
3.10. Análise estatística	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Recrutamento e características demográficas	62
4.2. Melhor acuidade visual corrigida (MAVC)	62
4.3. Campimetria computadorizada – estratégia 30-2	63
4.4. Microperimetria (MAIA)	65
4.5. Tomografia de coerência óptica (OCT)	66
4.6. Exames eletrorretinográficos (ERG e mfERG)	67
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. ANEXOS	83
9. APÊNDICES	92

1- Introdução

São cinco os sentidos principais, todos são importantes, mas a visão é essencial para a saúde e qualidade de vida. A retina é a estrutura ocular fundamental na sua gênese, pois transforma a luz em estímulo nervoso a ser interpretado pelo cérebro.

Infelizmente, o olho, como qualquer outro órgão, está sujeito a patologias e traumas, que podem comprometer seu funcionamento. No presente estudo, deu-se ênfase à distrofia retiniana, em particular à retinose pigmentar (RP) e utilização de fração mononuclear da medula óssea contendo células CD34+ intravítrea em pacientes portadores dessa doença.

1.1 Anatomia da retina

A retina é uma estrutura fundamental do olho para a formação das imagens. Trata-se de uma membrana localizada na superfície interna da parte posterior do olho, que contém os três primeiros neurônios da via visual aferente. Não possui a mesma sensibilidade em toda a extensão, sendo que na fóvea a acuidade visual é máxima, devido à maior concentração de cones e à medida que se afasta da área central, sua densidade diminui e o número de bastonetes aumenta. Os cones e os bastonetes iniciam o processo da visão quando se tornam hiperpolarizados na presença de luz (Figura 1).

Figura 1 - Estímulo luminoso e ativação dos fotorreceptores

Fonte: Modificado de Nishida, Oliveira e Troll (sd).

Na sequência, a informação visual segue por suas conexões com as células bipolares (segundo neurônio). Estas processam os sinais juntamente com as células horizontais e amácrinas e os enviam para as células ganglionares (terceiro neurônio) (Figura 2).

Os axônios das células ganglionares atingem o corpo geniculado lateral pelo trato óptico. O conjunto de axônios dos neurônios do corpo geniculado lateral constitui as radiações ópticas, que fazem suas conexões sinápticas com os neurônios do córtex visual primário, área de associação visual (KOLB et al., 2001). Estendendo-se do corpo geniculado lateral até a retina, o nervo óptico é composto por axônios das células ganglionares retinianas, que levam informações recebidas pela retina ao sistema nervoso central (SNC).

Figura 2 - Esquema ilustrando os tipos celulares componentes da retina.

Fonte: Modificado de Kolb (1995).

1.2 Histologia da retina

Histologicamente, a retina se divide em 10 camadas: epitélio pigmentado (EPR), fotorreceptores, três compostas por corpos celulares (nuclear externa, nuclear interna e células ganglionares), duas intermediárias sinápticas (plexiforme interna e plexiforme externa) e camada de fibras das células ganglionares. São consideradas, ainda, duas membranas limitantes: a externa, constituída pelas junções entre os fotorreceptores, e a interna, que faz interface da retina com a hialoide posterior do vítreo (Figura 3).

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. Seus prolongamentos sinápticos, juntamente com os das células bipolares, formam a camada plexiforme externa. Os corpos celulares das células

bipolares estão situados na camada nuclear interna, que também é constituída pelas células amácrinas e horizontais. A plexiforme interna (segunda camada sináptica) é responsável pela transmissão vertical da informação visual entre as células bipolares e as células ganglionares. Nela existe também uma complexa rede moduladora, composta pelas células amácrinas e horizontais. Por fim, os axônios das células ganglionares formam a camada de fibras nervosas, que dá origem ao nervo óptico.

Figura 3 - Corte histológico da retina mostrando suas 10 camadas.

epitélio pigmentado

fotorreceptores

limitante externa

nuclear externa

plexiforme externa

nuclear interna

plexiforme interna

ganglionares

fibras nervosas

limitante interna

Fonte: Foto cedida pelo Prof. André M. Vieira Messias.

1.3 Eletrofisiologia visual

Antes da chegada da luz, os fotorreceptores são mantidos parcialmente despolarizados por corrente elétrica intracelular, que é resultante, em maior parte, da abertura constante dos canais de íons Na^+ (GMPc dependentes) no seu segmento externo, da bomba de Na^+/K^+ presente no segmento interno, e de uma bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{+2}$ presente no segmento externo, que mantém elevada a concentração intracelular de Ca^{+2} . O fotorreceptor despolarizado libera constantemente o neurotransmissor glutamato em seu terminal sináptico com a célula bipolar (LAMB; PUGH, 2006) (Figura 4).

Figura 4 - Fotorreceptor (bastonete) com discos de membranas no segmento externo (A) e diagrama representando as principais reações de ativação celular após a absorção da luz (B)

Fonte: Modificado de Almeida (2012).

Quando um fóton de luz visível é absorvido pela molécula de rodopsina (Figura 5), a energia absorvida causa isomerização do seu cromóforo, o 11-cis *retinal* para a forma trans, o 11-trans *retinal*. Essa reação inicia a transformação da

rodopsina em metarodopsina II, que ativa a proteína G heterotrimétrica, a transducina, iniciando uma cascata de reações enzimáticas denominada fototransdução. Essas reações levam à diminuição da concentração intracelular de GMPc, que causa o fechamento dos canais de Na^+ na membrana do segmento externo dos bastonetes levando à sua hiperpolarização e redução da liberação de glutamato no terminal sináptico com a célula bipolar, gerando a transmissão do estímulo visual (LAMB; PUGH, 2006) (Figura 4).

Figura 5 - Representação da proteína rodopsina. Esquerda: posição da rodopsina no do segmento externo do bastonete. Direita: Representação tridimensional da rodopsina

Fonte: Modificado de Gregory-Evans, Pennesi, e Weleber (2012, p. 803).

Se fosse medido o potencial elétrico total gerado pela retina após a exposição luminosa, o mesmo seria composto por uma fase inicial negativa decorrente da hiperpolarização dos fotorreceptores, seguida por uma fase positiva, decorrente da despolarização das células bipolares. Essa medida é conhecida por eletrorretinograma (ERG), utilizado como exame objetivo para avaliação da função retiniana e, usado principalmente, em diagnósticos clínicos de doenças degenerativas da retina (DDR), reações tóxicas, e avaliação funcional da retina. O ERG consiste no registro das alterações de potenciais elétricos na retina quando excitada pela luz.

1.4 Eletrorretinograma (ERG)

No ERG de campo total, a retina é iluminada de forma uniforme e por inteiro. Com o eletrodo posicionado, bilateralmente, na córnea e na pele da têmpora ipsilateral, o que se mede é o potencial elétrico externamente ao olho, descrito como resposta em massa, pois é resultado da interação das respostas elétricas produzidas por toda a matriz celular da retina. Esquema simplificado de circuito elétrico formado durante registro do ERG é mostrado na Figura 6, no qual a retina representa a fonte de corrente gerada durante a apresentação da luz; que flui pelo vítreo, cristalino, humor aquoso e pela córnea. Essas são as resistências (ou impedâncias, para sinais elétricos alternados) do polo positivo. A retina, os tecidos extraoculares, a esclera, coróide e o EPR compõem as resistências do polo negativo.

Figura 6 - (A) Esquema mostrando as correntes extracelulares geradas após estimulação luminosa da retina: entre os pontos A e B ocorre a geração da corrente I_1 até o ponto C. A corrente I_2 atravessa as estruturas extraoculares voltando à esclera no ponto E, e o circuito se completa passando pela coróide, pelo EPR e pela retina. **(B)** Circuito elétrico mostrando o local de aquisição do potencial elétrico do ERG e as principais resistências elétricas envolvidas, onde R1 representa a resistência da retina; R2 do corpo vítreo, cristalino e da córnea; R3 das estruturas extraoculares e R4 (maior) do EPR

Fonte: Modificado de Almeida (2012)

Os principais componentes avaliados da resposta elétrica do ERG são: **onda a**, que representa a variação negativa do potencial elétrico da córnea gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores após o início da exposição da retina a *flash* de luz (PENN; HAGINS, 1969); **onda b**, que é variação positiva do potencial resultante da despolarização das células bipolares; e **potenciais oscilatórios (PO)**, que são variações rápidas, ou de alta frequência, no potencial elétrico, sobrepondo a onda b. (Figura 7).

Figura 7 - Amplitude das ondas **a** e **b** em ERG normal. Os esquemas apresentam variação negativa do potencial. **Onda a**, gerada pela hiperpolarização dos fotorreceptores, seguida por uma variação positiva do potencial; **onda b**, creditada à despolarização das células bipolares. Sobrepondo a onda b, ocorrem variações rápidas do potencial elétrico chamado de potencial oscilatório, originário das camadas intermediárias da retina, principalmente células amácrinas

Fonte: Modificado de Marmor e Zrenner (1998).

1.5 Retinose pigmentar (RP)

O termo RP designa a desordem hereditária que afeta difusamente os fotorreceptores e o EPR. Esta enfermidade, muitas vezes, pode progredir por vários anos até que resulte, em estágio mais avançado, na redução global ou perda da visão. A maior parte das formas da RP causa, inicialmente, a morte dos bastonetes, o que ocasiona a perda da capacidade de enxergar objetos com baixa luminosidade e também perda de campo visual, por ser a maior parte dos fotorreceptores presentes na retina periférica. Mas há, também, formas de RP com perda precoce dos cones e consequente comprometimento inicial da acuidade visual (AV) (SIEVING; CARUSO, 2011).

Apesar de não encontrar o artigo original “*Torpeur de la retine congenitale hereditaire*” - Ann Ocul, 1855 - Paris”, que comprova o pioneirismo de Donders ao descrever e denominar a patologia como degeneração retiniana familiar com

pigmentação intraneural, optou-se por deixar aqui essa informação histórica. Capítulos de livros que abordam o tema e artigos publicados em periódicos veiculam essa informação.

1.6 Epidemiologia da RP

As distrofias hereditárias da retina do tipo RP afetam cerca de um em cada 3500 indivíduos, e são caracterizadas por cegueira noturna progressiva, perda do campo visual, atrofia óptica, atenuação arteriolar, permeabilidade vascular alterada e perda da visão central progressiva com cegueira completa (HECKENLIVELY et al., 1988). Gregory-Evans, Pennesi e Weleber (2012) relataram que a prevalência mundial da forma típica é de aproximadamente 1:5000. Bunker et al. (1984) referem prevalência da forma típica no estado americano de Mainen sendo de 1:5200. A maior frequência (1:1878) foi descrita entre a população de índios Navajos (HECKENLIVELY et al., 1981). As prevalências das formas sindrômicas de RP não são muito documentadas. Kimberling et al. (2010), em duas populações pediátricas, estimaram a prevalência da síndrome de Usher (RP associada à surdez congênita) em 1: 6000. Em 2012, o Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimou a existência de aproximadamente 50.000 pessoas com RP em nosso país, e entre 2.250.000 e 3.600.000 portadores da doença.

1.7 Bases genéticas da RP

Sabe-se, atualmente, que a maioria dos casos de RP apresenta base genética e envolve a morte dos fotorreceptores por apoptose (SIEVING; CARUSO, 2011). A genética molecular da RP pode exibir padrão de herança esporádica, autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao X ou digênica (KENNAN; AHERNE; HUMPHRIES, 2005). Análises genéticas moleculares identificaram mais de 110 diferentes genes, até o momento, como responsáveis pelo desencadeamento dessas distrofias retinianas (FARRAR; KENNA; HUMPHRIES, 2002; HUMPHRIES; KENNA; FARRAR, 1992). Muitas dessas mutações estão associadas com componentes enzimáticos e estruturais do ciclo da fototransdução, incluindo a rodopsina (DRYJA et al., 1990), Guanosina monofosfato cíclica (cGMP)

Fonte: Modificado de Gregory-Evans, Pennesi, e Weleber (2012, p. 804).

Figura 9 - Mutações nos aminoácidos da proteína periferina/RDS em casos de RP (alterações destacadas em vermelho)

Fonte: Modificado de Gregory-Evans, Pennesi, e Weleber (2012, p. 806).

1.8 Manifestações clínicas e oculares

Os sintomas visuais da RP surgem principalmente devido a perda de fotorreceptores (bastonetes e cones). A cegueira noturna (nictalopia) é um dos primeiros sintomas. Os pacientes se queixam de desorientação em ambientes de pouca luz ou demora maior de adaptação em condições de baixa luminosidade. Esse sintoma pode se manifestar apenas em estágios mais avançados do comprometimento visual. A constrição progressiva do campo visual (CV) é outro achado comum. O padrão inicial mais comum é a perda do CV na média periferia (entre 30 e 50 graus excêntricos à fixação), pois é nessa região que a densidade de bastonetes é maior. Os acometidos geralmente só percebem as alterações no

campo visual quando ocorre uma constrição do mesmo para aproximadamente 50 graus (GREGORY-EVANS; PENNESI; WELEBER, 2012; HARTONG; BERSON; DRYJA, 2006; PAGON, 1988).

A AV é afetada de forma variável, podendo ocorrer boa visão por anos, apesar do CV afetado. A maioria dos pacientes se queixa de alteração na AV devido à progressão da doença. GROVER et al. (1999), em um estudo com 982 pacientes adultos portadores de RP, observaram que 52% apresentavam AV melhor ou igual 20/40 em pelo menos um olho; e 25% AV pior ou igual 20/200 em ambos os olhos (AO). Apenas 5% não tinham percepção luminosa em AO. Pacientes com RP ligada ao X tendem a ter a AV pior, aqueles com RP autossômica dominante normalmente mantêm melhor visão (BERSON et al., 1985).

Os achados oftalmoscópicos clássicos na RP são descritos como uma tríade: atenuação dos vasos sanguíneos retinianos, palidez do disco óptico e pigmentação intrarretinal em padrão de espículas ósseas (PRUETT, 1983). A Figura 10 ilustra a retinografia de um paciente sem a doença e, comparativamente na Figura 11, imagens de fundo de olho de portador de RP.

Figura 10 - Retinografia normal

Figura 11 - Retinografia e autofluorescência de paciente incluído no estudo (olho direito e esquerdo)

A retina pode parecer normal nos primeiros estágios da RP, mesmo que os testes eletrofisiológicos revelem a disfunção dos fotorreceptores. Esse estágio "inicial" pode durar décadas (GREGORY-EVANS; PENNESI; WELEBER, 2012). À medida que a doença avança os vasos retinianos tornam-se cada vez mais atenuados. A anormalidade pigmentar é visível, inicialmente, na média periferia e mais tarde, os acúmulos de pigmentos nos espaços intersticiais que cercam os vasos sanguíneos (espículas ósseas) espalham por todo equador e pela periferia (LI; POSSIN; MILAM, 1995). A mácula é acometida nas doenças moderadas e em estágios avançados, quando a degeneração dos fotorreceptores avança e

compromete os cones. Não é incomum o desenvolvimento de membrana epirretiniana e cistos intrarretinianos com acometimento foveal.

1.9 Terapia celular

Sabe-se que a medula óssea do adulto contém uma população de células tronco (HSCs) que pode ser dividida em subpopulações de linhagem positiva (Lin+) e linhagem negativa (Lin-), de acordo com seu potencial para diferenciar e formar elementos do sangue (ACLAND et al., 2001). A subpopulação Lin- contém uma variedade de células progenitoras incluindo aquelas capazes de **se tornarem** células do endotélio vascular (FRASSON et al., 1999a). Essas células progenitoras endoteliais se mobilizam da medula óssea e respondem a uma variedade de moléculas sinalizadoras e podem atingir sítios de angiogênese na vasculatura periférica isquêmica, no miocárdio ou em áreas de injúria ocular induzida (ASAHARA et al., 1997; BERSON et al., 1993; FRASSON et al., 1999b; GILL et al., 2001; GRANT et al., 2002; KALKA et al., 2000; KOCHER et al., 2001; MOHAND-SAID et al., 1998).

Otani et al. (2002) reportaram que Lin- HSCs injetadas diretamente dentro do olho poderiam ativar astrócitos e colaborar no desenvolvimento da angiogênese em ratos no período neonatal ou em ratos adultos com neovascularização induzida por uma injúria. Os autores também relataram que células tronco derivadas da medula óssea (Lin- HSCs), quando injetadas intravítreo duas semanas pós-natal, poderiam prevenir completamente a degeneração vascular retiniana, observada em modelos de ratos com degeneração retiniana (tipo rd1 e rd 10). Nesse mesmo estudo observou-se que este salvamento vascular correlacionou com o salvamento neuronal. Os autores demonstraram que a camada nuclear interna permaneceu próxima do normal e a camada nuclear externa, que contém os fotorreceptores, estava significativamente preservada com o salvamento das células, contendo predominantemente cones. Na avaliação por ERG, foram notadas respostas presentes nos ratos submetidos ao tratamento e ausência de resposta no grupo controle (OTANI et al., 2004). Outro achado desse estudo se deu na análise dos genomas dos olhos tratados e não tratados, que revelou aumento da expressão dos genes apoptóticos, demonstrando que os efeitos neurotróficos correlacionam com

preservação da vasculatura. Isto evidencia que células tronco derivadas da medula óssea podem ser utilizadas no tratamento de doenças retinianas degenerativas e vasculares.

Chiou et al. (2005) isolaram e cultivaram células tronco derivadas da medula óssea com potencial de diferenciação. Após duas e quatro semanas de cultura em meios de indução de hepatócitos, adipogênico e condrogênico, foi comprovado que as células tronco se diferenciaram em cartilagem, osso, adipócitos e células hepatócitos-*like*. Demonstraram que estas células poderiam se diferenciar em células precursoras neurais, e também foi constatada sua plasticidade em se diferenciar em células da retina e linhagens de fotorreceptores, sugerindo seu potencial para o tratamento de degenerações retinianas.

Banin et al. (2006) estudaram a utilização de células tronco embrionárias (ESCs) no tratamento de doenças degenerativas retinianas (DDR) e seu potencial em se diferenciar em células da retina, bem como sua sobrevida e integração pós-transplante. Verificaram que as células apresentaram essa capacidade de diferenciação. Outro achado importante nesse estudo foi o não surgimento de teratoma em nenhuma amostra. Os autores sugeriram, portanto, que há possibilidade de uso de células tronco para tratamento de DDR.

Meyer et al. (2005, 2006) demonstraram que as ESCs, após o implante intravítreo, se incorporaram nas camadas da retina, sofrendo diferenciação e assumindo aspecto de neurônios retinianos, em termos morfológicos. Demonstraram também que as amostras que receberam essas células tronco apresentaram maior sobrevivência das células da retina, especialmente os fotorreceptores. Os autores concluíram que as ESCs poderiam proteger as células retinianas das degenerações e sugeriram capacidade na substituição de neurônios da retina que foram perdidos. Das, Zhao e Ahmad (2005), em uma revisão sobre utilização de células tronco para tratamento de DDR ressaltaram o uso dessa terapia como possível alternativa com possibilidade, não só de aumentar a sobrevivência das células degeneradas como também de reposicionar as células danificadas pelo processo degenerativo. Minamino et al. (2005) relataram que células tronco derivadas da medula óssea podem se diferenciar em células retinianas e descreveram uma nova opção para a técnica de injeção intravítrea de células tronco, realizando, previamente, uma fotocoagulação à laser na retina. No grupo submetido ao laser, as células tronco

sobreviveram mais tempo e também apresentaram maior especificidade para ligação com as células da retina.

Vários estudos em modelos animais sugeriram que células tronco, incluindo as progenitoras da retina (MACLAREN et al., 2006), as ESCs (LAMBA et al., 2006, 2010), as células tronco pluripotentes induzidas (MEYER et al., 2009) e as células tronco mesenquimais (KICIC et al., 2003) têm capacidade de regenerar fotorreceptores perdidos e neurônios da retina, proporcionando melhora visual. Alguns relatos demonstraram a viabilidade técnica na administração intravítrea de células tronco mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (ABMSC) em pacientes com retinopatias degenerativas avançadas (Johnson et al., 2010; Jonas et al., 2008, 2010).

No presente estudo, a via de administração escolhida para introdução da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ nos olhos submetidos à terapia foi a injeção intravítrea (IIV). Essa escolha foi sustentada com base nos estudos já publicados e citados previamente, que utilizaram essa mesma abordagem para introdução das células no interior dos olhos (estudos experimentais em animais). A IIV é procedimento realizado rotineiramente por oftalmologistas.

As experiências com esta técnica tiveram início com o tratamento da endoftalmite, no qual foram utilizadas injeções de antibióticos intraoculares. Posteriormente, cirurgiões de retina começaram a utilizar esta mesma via para injeção de gás expansivo (C_3F_8) no espaço intravítreo para o tratamento de descolamentos de retina. Essa técnica também foi utilizada para administração de medicamentos diretamente na cavidade vítrea em casos de retinites provocadas por citomegalovírus em portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Mais recentemente, medicamentos anti-inflamatórios (corticoides), bem como antiangiogênicos também foram administrados pela mesma via para tratamento de diversas doenças, dentre essas, edema macular diabético, oclusões vasculares da retina, uveíte e formas exsudativas da doença macular relacionada à idade (MMRI) (BAUDOUIN et al., 1996; FISHBURNE et al., 1997; FORSTER et al., 1976; IP et al., 2004; MARTIDIS et al., 2002; SCOTT; FLYNN; ROSENFELD, 2003; TA, 2004; TORNAMBE; HILTON, 1989). Uma das complicações mais graves e temíveis da IIV é a endoftalmite (AIELLO et al., 2004; JAGER et al., 2004).

Até o momento não há tratamento eficaz para RP. Na maioria dos casos

ocorre piora progressiva da doença, com consequente comprometimento visual severo e influência direta na qualidade de vida dos indivíduos acometidos e familiares.

Considerando os resultados encontrados na literatura, que demonstram a potencialidade no uso da terapia celular nas DDRs, em particular, a pesquisa realizada previamente por nosso grupo (fase 1), fomos motivados a realizar este ensaio clínico (fase 2).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de única IIV de FMMO contendo células CD 34+ em vinte pacientes portadores de degeneração hereditária da retina do tipo RP (estudo fase 2).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar efeitos da única IIV de FMMO por um ano medindo:

- Melhor acuidade visual (MAVC), utilizando tabela ETDRS - *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*);
- Estabilidade de fixação e sensibilidade macular por meio dos exames de microperimetria e CV;
- Resposta funcional da retina por meio dos exames ERG e mfERG (eletroretinograma multifocal);
- Anatomia da retina por meio de tomografia de coerência óptica (OCT).

3. Casuística e Métodos

3.1 Desenho do estudo

Estudo clínico aberto (fase 2), prospectivo, não-randomizado, observador mascarado, com propósito de avaliar o efeito de uma única IIV de FMMO contendo células CD 34+ (autólogas) em vinte pacientes portadores de RP (quarenta olhos, sendo vinte incluídos no grupo de estudo e vinte controles). Os pacientes incluídos no estudo apresentavam RP com acometimento simétrico de AO. O projeto de pesquisa inicial previa a inclusão de cinquenta portadores de RP, porém seguindo determinação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) o número foi reduzido para vinte.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no Setor de Retina e Vítreo, centro de referência nacional em oftalmologia, que se destina ao atendimento terciário, e obteve apoio das equipes de transplante de medula óssea (TMO) e do hemocentro do mesmo hospital. O estudo teve início em 2010, com a seleção dos participantes e término no ano de 2013.

3.3 Aspectos éticos e gerais

O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinki, tendo sido aprovado pela CONEP, sob Registro nº 16018 (Anexo A) e registrado no *Clinical Trials* sob o número NCT01560715 (Anexo B). Todos os participantes foram informados sobre as características do estudo e apenas os que concordaram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C) foram incluídos.

Nenhum paciente participante desta pesquisa recebeu remuneração ou qualquer outro benefício para sua inclusão. Vinte pacientes foram selecionados no Ambulatório de Oftalmologia do HCFMRP-USP e avaliados no início do estudo, no dia seguinte à IIV e 4, 16, 32 e 48 semanas após o procedimento. Foi providenciada abertura de prontuário médico junto ao HCFMRP-USP para todos os participantes,

de modo a permitir o registro de todos os procedimentos e avaliações realizadas. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados respeitando-se as técnicas e normas de biossegurança.

3.4 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes portadores de RP atendidos no Ambulatório de Retina e Vítreo do HCFMRP-USP, que contemplassem os seguintes critérios:

- Idade acima de 18 anos;
- Doença com acometimento de ambos os olhos;
- Presença de boa fixação ocular comprovada por exames complementares, independente do valor da AV aferida na seleção dos participantes;
- Ausência de infecção sistêmica ou ocular antes do início do estudo;
- Concordância e assinatura do TCLE;

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que apresentassem uma ou mais das seguintes características:

- IIV de corticoesteroides ou outras drogas antiangiogênicas seis meses antes da avaliação inicial;
- Opacidade de meios que pudessem interferir significativamente na AV, confirmada por avaliação oftalmológica clínica ou documentação do fundo de olho;
- Cirurgia intraocular nos últimos três meses antecedentes à inclusão;
- Vitrectomia posterior ou retinopexia com introflexão escleral, em qualquer época;
- Tratamento com radiação ionizante na região da face, do crânio e/ou pescoço;
- Alergia à fluoresceína;
- Etilismo e uso de drogas ilícitas;

- Condições médicas ou psicológicas que impedissem o paciente de concluir o estudo ou assinar o TCLE;
- Patologia significativa e não controlada que, na opinião do pesquisador, pudesse interferir nos resultados do presente estudo;
- História prévia de tumores malignos em qualquer época;
- Participação em outro estudo clínico nos últimos 30 dias.

3.6 Retirada de pacientes do estudo

Os pacientes tiveram a liberdade para sair do estudo a qualquer momento sem precisar alegar os motivos e foram retirados em qualquer um dos seguintes casos:

- Retirada do TCLE por parte do paciente;
- Ocorrência de um critério de exclusão que fosse clinicamente relevante e afetasse a segurança do paciente, a critério do pesquisador;
- Necessidade de realização de procedimento ou tratamento não permitido pelo protocolo;
- Ocorrência de eventos adversos que exigissem a descontinuação do estudo, a ser considerada pelo pesquisador ou paciente;
- Adesão insuficiente do paciente, caso o mesmo não comparecesse às avaliações programadas.

3.7 Avaliações clínicas

3.7.1 Exame oftalmológico

Os pacientes foram submetidos a exame oftalmológico, incluindo biomicroscopia à lâmpada de fenda, tonometria de aplanção e oftalmoscopia binocular indireta (OBI) com lente de 20 dioptrias após dilatação pupilar. A quantificação da reação inflamatória na câmara anterior, quando presente, foi classificada de acordo com o preconizado pelo artigo *Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop*

(JABS et al., 2005).

3.7.2 Melhor acuidade visual corrigida (MAVC)

A MAVC foi aferida, segundo padronização recomendada pelo ETDRS, e realizada por outro examinador que não tinha o conhecimento do olho que fora tratado e do controle (mascaramento). Os valores da MAVC foram anotados no prontuário de cada paciente para posterior análise. Esses dados foram considerados, tanto para avaliar a segurança como para confirmar a eficácia do tratamento. Para análises estatísticas, a MAVC foi convertida seguindo a tabela logMAR.

3.7.3 Microperimetria

No presente estudo utilizou-se o microperímetro MAIA - Center Vue. Esse exame é indicado para medir a sensibilidade macular, a estabilidade de fixação e o ponto de fixação. Apresenta como diferencial a associação dos valores aferidos a uma imagem real da retina obtida por *Scanner Laser Ophthalmoscopy* (SLO) (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Imagem SLO microperimetria

Figura 13 - Mapa sensibilidade microperimetria

Semelhante ao padrão da perimetria automatizada, o dispositivo realiza na retina as medidas de sensibilidade à luz projetando estímulos Goldmann III em diferentes pontos da mácula. Sua grande vantagem é a capacidade de rastrear a atividade de fixação dos pacientes enquanto avalia a sensibilidade macular, eliminando os erros causados por perdas de fixação (sistema *eye tracking*) e associa a sensibilidade das diferentes regiões sobreposta a uma imagem real da retina capturada. Além disso, apresenta uma ferramenta importante de seguimento (*follow-up*), que possibilita as comparações ao longo do estudo, exatamente com a captura obtida no início. O aparelho contém um banco de dados de referência para comparação quantitativa dos valores da sensibilidade aferida aos observados em cada olho examinado. Apresenta boa reprodutibilidade e possibilitou a comparação mais precisa do exame inicial com as avaliações subsequentes.

A sensibilidade é medida de zero a 36 decibéis (dB) e no impresso do exame há a codificação em cores - verde significa normal, amarelo suspeito, vermelho anormal e o preto representa escotoma (Figura 13). A estratégia utilizada no presente estudo foi a *Full-Threshold 4-2*, usada para avaliar a sensibilidade retiniana em detalhes. A Figura 14 exemplifica um gráfico com a distribuição de cada ponto

testado em um dos pacientes do estudo. A barra do *Average Threshold* (AT) mostra a média do limiar de sensibilidade macular do paciente examinado em dB e o classifica frente a base de dados.

Figura 14 - *Average threshold* (AT) e histograma de distribuição limiar de sensibilidade

Outra informação importante fornecida pelo exame e também muito útil é a avaliação precisa da estabilidade e do ponto de fixação (análise de fixação) de cada olho examinado. A fixação é o processo de tentar olhar para o alvo selecionado e consiste em alinhar opticamente uma área funcional da retina para esse alvo. Em indivíduos normais, a área da retina predominantemente utilizada para a fixação é a fóvea. Em algumas patologias, quando há acometimento da retina central, a fixação se degrada e os pacientes podem usar regiões extrafoveais (fixação excêntrica). Esses parâmetros são avaliados rastreando os movimentos dos olhos em uma frequência de 25 vezes por segundo (25 Hz) e traçando a distribuição resultante sobre a imagem SLO obtida. A região abrangida por esses movimentos identifica o ponto de retina preferido (PRL) e descreve a localização da fixação, enquanto a extensão deles é uma indicação da estabilidade de fixação. Estudos mostraram que a análise da estabilidade da fixação é um importante parâmetro para a avaliação do

tratamento das doenças com acometimento macular (MANDELCORN, M. S.; PODBIELSKI; MANDELCORN, E. D., 2013). A nuvem de pontos de fixação é calculada em duas elipses - *bivariate contour ellipse area* (BCEA) 63% e 95% (Figura 15).

Figura 15 - *Bivariate contour ellipse area* (BCEA) e nuvem de pontos de fixação

A BCEA mostra a área de tentativa de fixação do olho examinado. Quando o mesmo tenta fixar em diversos pontos em busca do alvo, a BCEA é maior e demonstra instabilidade de fixação. No presente estudo, os valores de AT e BCEA foram analisados antes do procedimento e nas demais reavaliações.

3.7.4 Campimetria computadorizada

Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos também ao exame de campimetria computadorizada convencional utilizando a estratégia estática 30-2 no aparelho *Haag-Streit Octopus 900*, de modo a comparar os valores de sensibilidade (MD - desvio médio) antes e após o procedimento (Figura 16).

Figura 16 - Campo visual 30-2 de paciente incluído no estudo

3.7.5 Eletrorretinograma de campo total (ERG)

A eletrofisiologia abrange vários testes que mensuram a função dos vários componentes da retina. O ERG mensura a resposta gerada pelas células retinianas. Sob condições adaptadas ao escuro, um *flash* único de luz resulta em resposta mediada por bastonetes e cones. Cerca de 80% dessa resposta são atribuídos aos bastonetes, sendo o restante proveniente dos cones. Os fotorreceptores geram o componente negativo inicial, designado onda “A”, no ERG, enquanto que as células de Miller e as bipolares são responsáveis pela onda “B”, o componente positivo corneano final (CLEARY; REICHEL, 2011).

Na Figura 17 observam-se os padrões de repostas em indivíduos sem doenças com acometimento dos fotorreceptores, nas fases escotópica e fotópica. As pequenas ondulações na fase ascendente da onda B são os potenciais oscilatórios.

Figura 17 - Eletrorretinogramas de campo total - exemplos ilustrativos de padrão de resposta em indivíduos normais. Estímulos durante a adaptação ao escuro: bastonete (ROD); cone e bastonetes (CR). Após adaptação ao claro: cone e 30 Hz (flicker)

Fonte: Foto cedida pelo Prof. André M. Vieira Messias

O aparelho Espion E² (Diagnosys LLC) associado ao estimulador *ColorDome* foi utilizado neste estudo respeitando-se as normas e os padrões da *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV). A avaliação ocorreu em duas fases, sendo a primeira em condições escotópicas (adaptação ao escuro) e a segunda após um período de adaptação à luz (fotópica). Após preparo, dois eletrodos constituindo os polos negativos (olho direito e esquerdo) foram posicionados na pele das têmporas, enquanto dois eletrodos tipo DTL foram postos em contato com os olhos. Um terceiro eletrodo foi fixado à região da glabella para funcionar como referencial elétrico (terra).

3.7.6 Eletrorretinograma multifocal (mfERG)

O mfERG foi utilizado no presente estudo para complementar as limitações do ERG, pois consegue registrar áreas diferentes da retina e, consequentemente, detectar disfunções focais. O padrão de estímulo empregado foi o de 61 hexágonos, sendo que a dimensão de cada um aumenta com a excentricidade da retina, ou seja, é inversamente proporcional à densidade dos cones no tecido retiniano (Figura 18). Os eletrodos utilizados foram os mesmos do ERG e o exame seguiu as normas da ISCEV. Utilizou-se o aparelho Espion E² (Diagnosys LLC) associado à uma tela de

LED. Nessa tela haviam 61 hexágonos escalonados compreendendo uma área de 30 graus do CV, no qual o paciente tinha uma mira em formato de cruz vermelha como ponto de fixação. A distância entre a tela e o paciente foi padronizada em quarenta centímetros.

Figura 18 - mfERG de paciente incluído no estudo

3.7.7 Tomografia de coerência óptica (OCT)

A OCT de domínio espectral é uma ferramenta útil na avaliação da retina por ser um exame de simples realização, não invasivo, rápido e que possibilita a visualização das estruturas e camadas retinianas com alto poder resolutivo. Os pacientes foram submetidos ao exame antes do procedimento e em todas as avaliações subsequentes, sob midríase medicamentosa (uso colírio tropicamida 1% e fenilefrina 10%). Os exames foram realizados com o aparelho *Spectralis-OCT* (Heidelberg Engineering), com resolução espacial de sete micra e velocidade de captura de 40.000 A scans/s, possibilitando a avaliação da anatomia da retina, com mensuração da espessura macular inicial (subcampo central da mácula) e comparação ao longo do tempo, bem como comparação entre os olhos tratados e os controles. Esse exame foi de suma importância no estudo, pois possibilitou melhor visualização das estruturas intra e subretinianas na detecção de possíveis eventos adversos da terapia empregada (tumores e neovascularização) (Figuras 19 a 21).

Figura 19 - Tomografia de coerência (OCT) de paciente incluído no estudo evidenciando cistos intrarretinianos

3.8 Técnica cirúrgica

3.8.1 Coleta da medula óssea

A técnica utilizada para a obtenção do aspirado da medula óssea neste estudo foi semelhante aos procedimentos oncológicos e hematológicos para transplante de medula óssea. O procedimento foi realizado no Setor de Transplante de Medula Óssea (TMO), no décimo segundo andar do HCFMRP-USP, por médicos hematologistas. O paciente foi posicionado em decúbito lateral e após antissepsia com iodopovidona tópica (PVPI), foi realizada anestesia local com injeção de xilocaína. Em seguida, uma agulha de aspiração de medula óssea foi introduzida na crista ilíaca posterior e aspirado o volume de 5 a 10 ml em seringa heparinizada. O mesmo procedimento foi executado da mesma forma em todos os participantes. Após a coleta o material era imediatamente transportado em recipiente apropriado até o setor de Terapia Celular do Hemocentro no HCFMRP-USP.

3.8.2 Preparo das células tronco - FMMO contendo células CD34+

No setor de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP, o material aspirado da medula óssea foi submetido à centrifugação por gradiente de Ficoll-Paque (*Amersham Pharmacia Biotech* - produto licenciado para uso humano) para isolamento das células mononucleares. A FMMO coletada foi ressuspensa em solução salina estéril e centrifugada novamente. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, após o qual as células foram ressuspensas em salina a 10% de soro autólogo com quantidade final de aproximadamente 10^7 células por milímetro. As células mononucleares obtidas foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo com um painel de anticorpos monoclonais para determinar a presença e as percentagens de células CD34+ e de células maduras das linhagens celulares hematopoéticas e linfoides. A quantidade de células a ser injetada foi de aproximadamente $1,68 \times 10^4$ células em um volume de 0,1 mililitros (ml). Foi realizada análise da viabilidade em uma amostra com emprego do corante Azul de Trypan.

3.8.3 Procedimento de injeção intravítrea

A IIV contendo a FMMO com células CD34+ foi aplicada no mesmo dia da coleta, sem o uso, portanto, de nenhum tipo de conservante no material. A técnica cirúrgica utilizada respeitou as recomendações e etapas indicadas para tal procedimento. Foram seguidos os seguintes passos: assepsia periocular com PVPI tópico e administração de colírio de PVPI 5% tópico, colocação de campo cirúrgico e blefarostato estéreis. A IIV foi realizada após anestesia tópica utilizando uma agulha com calibre de 30 gauge no quadrante temporal inferior, distante cerca de 3,5 a 4 mm do limbo (*pars plana*). Ao término do procedimento foi administrado colírio antibiótico (quinolona de quarta geração) e avaliada a perfusão do nervo óptico a fim de afastar a necessidade de paracentese de câmara anterior quando detectada alguma alteração no nervo óptico. Importante salientar que a terapia com as células tronco foi realizada, sempre, nos olhos com pior AV de cada paciente. Caso a AV fosse igual em AO, o olho submetido à IIV com FMMO foi escolhido de forma aleatória pelo cirurgião. Os participantes não tinham esse conhecimento. Os olhos contralaterais de todos os participantes foram submetidos ao mesmo processo acima descrito (injeção simulada) de modo a participarem como grupo controle. Devido a essa conduta, foi prescrito colírio antibiótico para uso no pós-operatório em AO por um período de sete dias.

3.9 Avaliações e acompanhamento após terapia

Como já descrito anteriormente, os pacientes foram reexaminados no dia seguinte após o procedimento, sendo submetidos a exame oftalmológico geral à lâmpada de fenda e também com OBI para detectar possíveis complicações relacionadas à IIV. Na ocasião, os participantes foram esclarecidos e orientados sobre a possibilidade de ocorrência de eventos adversos, que caso surgissem, deveriam ser comunicados imediatamente a qualquer membro da equipe envolvida na pesquisa.

Todos os participantes foram reavaliados no período de 4, 16, 32 e 48 semanas após o procedimento. Nessas visitas, passaram por avaliação

oftalmológica geral, com aferição da AV (MAVC), bem como realizaram todos os exames complementares descritos acima (microperimetria, campimetria computadorizada, ERG, mfERG e OCT).

3.10 Análise estatística

As seguintes variáveis foram avaliadas: MAVC em logMAR, valores obtidos nos exames de microperimetria (sensibilidade macular e a área de fixação), valores de MD do CV 30-2, valores obtidos nos exames de ERG e mfERG e análise das imagens de OCT. Todos os dados obtidos foram compilados em planilhas e, posteriormente, analisados pelo programa JMP[®]. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de Fisher ou qui-quadrado. Foi utilizado o teste de Bartlett para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. As variáveis com distribuição normal foram analisadas usando ANCOVA, enquanto as demais submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Wilcoxon 2, caso fossem encontradas diferenças estatisticamente significativas. As diferenças dentro dos grupos em relação aos valores iniciais foram analisadas pelo teste T pareado.

4. Resultados

4.1 Recrutamento e características demográficas

No presente estudo foram incluídos vinte portadores de RP, sendo que vinte olhos foram submetidos à terapia de IIV de FMMO contendo células CD34+ e os olhos contralaterais serviram como controle (injeção simulada). Dentre os participantes, treze eram do gênero masculino e sete do gênero feminino. A média de idade foi de $35,2 \pm 11,73$ anos (variando de 21 a 59 anos de idade) (Tabela 1). Todos completaram a avaliação de acompanhamento durante os doze meses, sem nenhuma perda ou exclusão. Foram submetidos a avaliações e realizaram exames oftalmológicos antes do início do estudo e após a intervenção, nas semanas 4, 16, 32 e 48.

Tabela 1 - Características demográficas dos participantes

Gênero n (%)	Portadores de RP
Feminino	7 (35%)
Masculino	13 (65%)
Idade (anos)	$35,2 \pm 11,73$

4.2 Melhor acuidade visual corrigida (MAVC)

Todos os valores da MAVC encontram-se no Apêndice A. Foi constatada melhora na AV dos olhos tratados em comparação aos controles, nas semanas 4 e 16. Porém, o mesmo não ocorreu nas semanas 32 e 48 (Gráfico 1 e Tabela 2). A diferença entre MAVC medida após 48 semanas e a basal foi de $-0,04 \pm 0,02$ logMAR nos olhos tratados frente a $-0,03 \pm 0,01$ logMAR nos controles ($p=0,3898$). Considerando o desvio padrão encontrado na AV inicial de 0,05 e buscando detectar a diferença de 0,1 logMAR, o estudo necessitaria de seis pacientes por grupo para obter um poder de 95%.

Gráfico 1 - Variação melhor acuidade visual (logMAR) x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)

Tabela 2 - Melhor Acuidade Visual Corrigida - MAVC (logMAR): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos

Semana	Grupo controle (GC)	Grupo tratado (GT)	Diferença intraindividual (GC)	Diferença intraindividual (GT)	P
0	0,22 ± 0,03	0,35 ± 0,05			
4	0,19 ± 0,03	0,29 ± 0,05	0,0±0,0[0,0393**]	-0,1±0,0[<0,01**]	0,0322*
16	0,18 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,0±0,0[0,0167**]	-0,1±0,0[<0,01**]	0,0153*
32	0,17 ± 0,03	0,25 ± 0,05	-0,1±0,0[0,0058**]	-0,1±0,0[<0,01**]	0,0527
48	0,19 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,0±0,0[0,0417**]	0,0±0,0[0,0672]	0,3210

MAVC logMar; **GC**= grupo controle; **GT**= grupo tratado; média ± erro padrão; [] - teste t pareado; ** estatisticamente significativo teste t pareado; * estatisticamente significativo - ANCOVA.

4.3 Campimetria computadorizada - estratégia 30-2

A piora nos valores de MD, no CV 30-2, foi observada após a semana 16 nos olhos do grupo controle, mas não para os olhos submetidos à IIV de FMMO (Gráfico

2 e Tabela 3). A perda de MD do CV dos olhos tratados ($0,33 \pm 0,70$ dB) foi discretamente menor do que nos olhos controles ($1,12 \pm 0,58$ dB) ($p=0,0761$) após 48 semanas de tratamento em relação aos valores iniciais. O Apêndice B apresenta todos os valores de MD dos grupos tratado e controle ao longo do estudo. Todos os participantes do estudo já estavam habituados a realizar o exame de CV.

Gráfico 2 - Variação Mean Deviation (dB) no campo visual 30-2 x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)

Tabela 3 - Campo visual 30-2 (valores de MD em dB): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos

Semana	Grupo controle (GC)	Grupo tratado (GT)	Diferença intraindividual (GC)	Diferença intraindividual (GT)	P
0	4,47 ± 1,95	3,85 ± 1,36			
4	2,78 ± 0,83	2,65 ± 0,75	0,9 ± 0,5 [0,0537]	0,3 ± 0,5 [0,2921]	0,0432*
16	1,86 ± 0,42	1,83 ± 0,32	0,9 ± 0,5 [0,0298**]	0,1 ± 0,5 [0,4244]	0,0122*
32	1,91 ± 0,55	1,96 ± 0,63	0,9 ± 0,4 [0,0223**]	0,1 ± 0,3 [0,3623]	0,0179*
48	2,39 ± 0,57	1,93 ± 0,53	1,1 ± 0,6 [0,0372**]	0,3 ± 0,7 [0,3231]	0,0803

MD= valor MD (*Octopus 900*); GC= grupo controle; GT= grupo tratado; média ± erro padrão; [] - teste t pareado; ** estatisticamente significativo teste t pareado; * estatisticamente significativo - ANCOVA

4.4 Microperimetria (MAIA)

Observou-se melhora na sensibilidade macular, detectada no exame de microperimetria, nos olhos submetidos à injeção nas semanas 16 e 32 (Gráfico 3 e Tabela 4). Essas mudanças não foram estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Quando comparado os grupos, não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na área de fixação (BCEA). A melhora da sensibilidade macular foi discretamente maior nos olhos com FMMO: $1,0 \pm 0,5$ dB do que nos contralaterais: $0,2 \pm 0,5$ dB, mas sem significância estatística ($p=0,0569$), quando comparados os resultados finais (48 semanas) em relação aos valores basais. Os valores da sensibilidade macular avaliados no exame de microperimetria nos grupos tratado e controle, ao longo do estudo, estão apresentados no Apêndice C. Todos os participantes do estudo já estavam habituados a realizar o exame de microperimetria, de modo a se evitar a influência do efeito aprendido nos resultados obtidos.

Gráfico 3 - Variação sensibilidade macular (dB) na microperimetria x tempo (semanas) para o grupo controle (rosa) e tratado (azul)

Tabela 4 - Sensibilidade macular (dB - microperimetria): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos

Semana	Grupo controle (GC)	Grupo tratado (GT)	Diferença intraindividual (GC)	Diferença intraindividual (GT)	P
0	12,82 ± 1,55	11,90 ± 1,45			
4	13,23 ± 1,49	12,15 ± 1,49	0,4 ± 0,6 [0,2647]	0,3 ± 1,1 [0,4128]	0,4415
16	13,59 ± 1,47	13,46 ± 1,67	0,8 ± 0,4 [0,0431*]	1,6 ± 0,6 [0,0065*]	0,1014
32	13,20 ± 1,54	12,88 ± 1,57	0,4 ± 0,3 [0,1336]	1,0 ± 0,5 [0,0258*]	0,1058
48	12,87 ± 1,58	12,61 ± 1,78	0,1 ± 0,5 [0,4531]	0,7 ± 0,7 [0,1551]	0,1598

GC= grupo controle; **GT**= grupo tratado; media ± erro padrão; [] – test t pareado; * estatisticamente significativo teste t pareado.

4.5 Tomografia de coerência óptica (OCT)

Os valores da espessura macular (subcampo central da mácula) em micra, obtidos no exame de OCT nos grupos tratado e controle, ao longo do estudo, estão apresentados no Apêndice D.

No exame inicial de OCT dos olhos submetidos à IIV de FMMO, foram encontrados: cistos intrarretinianos em quatro olhos, alterações em fotorreceptores na região foveal em quatro e membrana epirretiniana (MER) em quatro. Entre os olhos do grupo controle, os achados foram os seguintes: cistos intrarretinianos em cinco, alterações em fotorreceptores na região foveal em quatro e MER em três. Os dados relacionados à espessura macular encontram-se na Tabela 5. Não foram observadas mudanças estatisticamente significativas durante o acompanhamento.

Tabela 5 - Espessura macular medida em micra (OCT): média da avaliação inicial (semana 0) e média das diferenças intraindividuais de cada grupo. O valor “P” se refere à comparação entre as diferenças encontradas nos dois grupos

Semana	Grupo controle (GC)	Grupo tratado (GT)	Diferença intraindividual (GC)	Diferença intraindividual (GT)	P
0	286,10 ± 56,36	293,25 ± 69,56			
4	285,90 ± 50,40	295,45 ± 76,45	-0,20 ± 9,98 [0,4648]	2,20 ± 23,10 [0,3375]	0,6436
16	286,75 ± 56,31	293,25 ± 78,63	0,85 ± 13,03 [0,3868]	-2,20 ± 16,71 [0,2814]	0,7654
32	284,55 ± 59,25	290,70 ± 82,49	-2,20 ± 7,00 [0,0880]	-2,55 ± 10,12 [0,1368]	0,7880
48	286,55 ± 61,70	288,55 ± 79,03	2,00 ± 10,21 [0,1959]	-2,15 ± 11,04 [0,1974]	0,9294

GC= grupo controle; GT= grupo tratado; media ± erro padrão; [] – test t pareado

4.6 Exames eletrorretinográficos (ERG e mfERG)

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada avaliando-se amplitudes e latências das respostas eletrorretinográficas entre os grupos (ERG, campo total fotópico e escotópico). De forma análoga, também não se foram detectadas mudanças estatisticamente significativas entre os grupos avaliando-se os exames de mfERG ao longo do acompanhamento. A análise inicial dos ERGs escotópicos evidenciou presença de resposta em um paciente, resposta residual em um e ERG abolido em 18 pacientes. No ERG fotópico, os achados foram: resposta residual em 11 pacientes e ausência de resposta em nove. Todos apresentaram o mesmo padrão de resposta em AO.

5. Discussão

A RP é doença que abrange diversas desordens hereditárias e afeta difusamente os fotorreceptores e o EPR. Apresenta, na maioria dos casos, progressão lenta até resultar, nos estágios mais avançados, em redução global ou perda da visão. No entanto, determinadas formas podem causar perda dos cones, e já inicialmente, comprometer a AV central.

Alguns estudos e relatos demonstraram a viabilidade clínica na administração intravítrea de ABMSC em pacientes com retinopatias degenerativas avançadas (JOHNSON et al., 2010; JONAS et al., 2008, 2010).

Até o presente momento não há um tratamento definitivo e nem cura para tal enfermidade. A terapia celular com o uso de células tronco tem sido indicada para o tratamento das diversas DDRs (PELLEGRINI; De LUCA; ARSENIJEVIC, 2007; TIBBETTS et al., 2012). O olho, pelas suas características anatômicas e pela barreira hematorretiniana existente, apresenta vantagens na utilização da terapia celular em comparação com outros órgãos (MEAD et al., 2015; TIBBETTS et al., 2012).

As células tronco mais utilizadas atualmente em estudos clínicos são as adultas, que apesar de não substituírem as células de um órgão lesado, recuperam parcialmente a função desses órgãos por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, mas que provavelmente envolvem a secreção de vários fatores (citocinas, fatores de crescimento e antiapoptóticos). Esse efeito parácrino tem sido cada vez mais valorizado, uma vez que a sobrevivência dessas células no órgão lesado não parece ser longa (SIQUEIRA, 2009).

Park et al. (2017) afirmam que os distúrbios da retina, frequentemente, envolvem a disfunção de mais de um tipo de célula e que os circuitos neuronais dentro da retina podem estar permanentemente alterados por essa disfunção crônica. Por isso, acreditam que os efeitos tróficos na retina danificada podem representar uma abordagem mais viável para o tratamento da disfunção retiniana do que a substituição direta de células danificadas. Dessa forma, a terapia celular não seria específica e poderia ser mais amplamente aplicada nas diferentes apresentações das doenças retinianas.

Os resultados do presente estudo evidenciaram MAVC dos olhos tratados, em relação aos controles, nas semanas 4 e 16, e isso parece corroborar com esse

provável efeito trófico inicial (resgate funcional) desempenhado pelas células injetadas. Nas avaliações posteriores à semana 16 não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Entende-se que essa constatação possa ser explicada pelo provável efeito transitório das células injetadas em única aplicação.

Apesar de o estudo não identificar diferença estatisticamente significativa na comparação da sensibilidade macular avaliada pelo exame de microperimetria entre os grupos tratado e controle durante o acompanhamento, observou-se um indício de melhora da sensibilidade macular dos olhos submetidos à IIV com FMMO contendo células CD34+, nas semanas 16 e 32 (Gráfico 3 - diferença intraindividual), sugerindo possível efeito trófico exercido pelas células injetadas.

Avaliando as imagens e os achados dos exames de OCT não foram evidenciadas mudanças estatisticamente significativas na anatomia da retina e nem na espessura macular, comparando-se os grupos tratado e controle. Não foi detectada neovascularização subretiniana até o término do estudo em nenhum olho submetido à terapia com FMMO. Também não foi notada piora da MER pré-existente.

Cotrim (2016), utilizando o mesmo tipo de células, porém em pacientes portadores de DMRI forma atrófica, e avaliando os achados de OCT obteve resultados semelhantes aos da presente pesquisa.

Um paciente incluído no presente estudo apresentou resolução dos cistos intrarretinianos após IIV com FMMO. Isso ocorreu apenas no olho tratado com FMMO e foi confirmado pelo exame de OCT controle na semana quatro, sem recidiva até o final da pesquisa (semana 48) (Figuras 22 e 23), corroborando os achados de Siqueira et al. (2013).

Figura 20 - OCT de paciente submetido à IIV de FMMO contendo células CD34+ antes e após terapia, com resolução dos cistos intrarretinianos

Figura 21 - Análise espessura macular em paciente submetido à IIV

Analisando os dados obtidos nos exames de ERG de campo total escotópico e fotópico, bem como de mfERG, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os dois grupos, antes e após o procedimento. Importante salientar que a doença em estudo causa alterações eletroretinográficas pelo acometimento dos fotorreceptores (disfunção de bastonetes e cones). Levando em consideração a melhora inicial na MAVC nos olhos tratados, frente aos controles, e menor degradação nos valores de MD nos olhos tratados ao longo do acompanhamento frente aos do grupo controle, sugere-se que os métodos utilizados para mensurar a atividade elétrica nesse tipo de doença não foram eficazes para confirmar eventuais melhoras nos potenciais elétricos nesse período.

Siqueira et al. (2015) avaliaram a qualidade de vida relacionada à visão dos vinte pacientes que participaram do presente estudo. Foram analisadas as respostas desses pacientes a um questionário específico (National Eye Institute Visual

Functioning Questionnaire 25 - NEI VFQ-25), aplicado antes da terapia e no terceiro e décimo segundo mês pós a IIV.

Nessa avaliação subjetiva, foi comprovada melhora na qualidade de vida relacionada à visão no terceiro mês, dado esse com significância estatística ($p < 0,05$). Porém, no décimo segundo mês não foi verificada diferença estatisticamente significativa frente ao questionário inicial. Confrontando os resultados desta pesquisa com os achados de Siqueira et al. (2015), é possível inferir que a melhora na qualidade de vida relacionada à visão está diretamente associada à melhora da MAVC, verificada nas semanas 4 e 16 após a IIV.

Um tema que deve ser discutido em futuros estudos é a duração do efeito das células tronco sobre as células retinianas na RP e demais doenças da retina, bem como se o aumento do número de IIV ampliaria o efeito inicial detectado na terapia.

Conforme descrito previamente, as células utilizadas no presente estudo foram as de origem hematopoiética, obtidas por aspiração da medula óssea de cada paciente e aplicadas na cavidade vítrea do mesmo (células autólogas). O tipo de célula utilizado na pesquisa, se comparado com as ESCs, apresenta menor risco de formação de tumores.

Segundo Siqueira et al. (2009, 2011), as ABMSC são de mais fácil obtenção e envolvem menores problemas éticos por não utilizarem embriões, fato esse também comprovado neste estudo. Siqueira et al. (2011), em estudo prospectivo, relataram a segurança do uso intraocular de ABMSC em distrofias retinianas. Neste ensaio clínico, também se confirmou a segurança durante o período de 12 meses de avaliação após o uso IV de FMMO contendo células CD34+. A terapia foi segura e bem tolerada por todos os pacientes incluídos. Não se observou nenhuma ocorrência de uveíte, endoftalmite e/ou toxicidade ocular. De forma análoga, não foram constatados nenhum desenvolvimento de tumores intraoculares e nem formação de neovasos retinianos associados à terapia instituída.

6. Conclusões

Considerando os resultados obtidos concluiu-se que a terapia envolvendo o uso intravítreo de FMMO autóloga contendo células CD 34+ demonstrou ser segura no período avaliado (12 meses), sem ocorrência de complicações e nem eventos adversos relacionados à IIV (OCT não demonstrou surgimento de edema e tampouco neovascularização subretiniana).

Apesar da melhora estatisticamente significativa observada na MAVC dos olhos submetidos à IIV com FMMO no início da pesquisa (semanas 4 e 16), esse resultado não foi sustentado até o fim do estudo.

Observou-se piora nos valores de MD no CV do grupo controle após a semana 16, e isso não foi notado no grupo submetido à IIV contendo FMMO. Em relação ao exame de microperimetria não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na sensibilidade macular e na área de fixação (BCEA), comparando-se os grupos.

Os exames ERG e mfERG não foram capazes de detectar nenhuma diferença estatisticamente significativa avaliando amplitudes e latências das respostas entre os grupos.

O exame de OCT não foi capaz de evidenciar mudanças anatômicas estatisticamente significativas entre os grupos ao longo do estudo.

7. Referências Bibliográficas¹

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

ACLAND, G. M. et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. **Nat Genet**, v. 28, n. 1, p. 92-95, 2001.

AIELLO, L. P. et al. Evolving guidelines for intravitreal injections. **Retina**, v. 24, n. 5 Suppl., p. S3-19, 2004.

ALLI, R. R. et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 306-310, 2000.

ALMEIDA, F. P. P. Estudo da farmacocinética vítrea e toxicidade da ciclosporina intravítrea em olhos de coelhos. 2012. 93f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.

BANIN, E. et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 246-257, 2006.

BAUDOUIN, C. et al. Treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS patients using intravitreal injections of highly concentrated ganciclovir. **Ophthalmologica**, v. 210, n. 6, p. 329-335, 1996.

BERSON, E. L. et al. Natural course of retinitis pigmentosa over a three-year interval. **Am J Ophthalmol.**, v. 99, n. 3, p. 240-251, 1985.

BERSON, E. L. et al. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. **Arch Ophthalmol.**, v. 111, n. 6, p. 761-772, 1993.

BOWES, C. et al. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. **Nature**, v. 347, p. 677-680, 1990.

BUNKER, C. H. et al. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. **Am J Ophthalmol.**, v. 97, p. 357-365, 1984.

CHIOU, S. H. 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**, v. 326, n. 3, p. 578-585, 2005.

CLEARY, T. S.; REICHEL, E. Eletrofisiologia. in: YANOFF, M.; DUKER, J. S. **Oftalmologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 545-549, 2011.

COTRIM, C. C. Uso intravítreo de fração mononuclear da medula óssea (FMMO) contendo células CD34+ em pacientes portadores de degeneração macular relacionada com a idade na forma atrófica. 2016. 114p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2016.

DAS, A. M.; ZHAO, X.; AHMAD, I. Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal

neurons from heterologous sources. **Semin Ophthalmol**, v. 20, n. 1, p. 3-10, 2005.

DRYJA, T. P. et al. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. **Nature**, v. 343, p. 364-366, 1990.

FARRAR, G. J.; KENNA P. F.; HUMPHRIES, P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. **Embo J**, v. 21, p. 857-864, 2002.

FISHBURNE, B. C. et al. Intravitreal methotrexate as an adjunctive treatment of intraocular lymphoma. **Arch Ophthalmol**, v. 115, n. 9, p. 1152-1156, 1997.

FORSTER, R. K. et al. Further observations on the diagnosis cause, and treatment of endophthalmitis. **Am J Ophthalmol**, v. 81, n. 1, p. 52-56, 1976.

FRASSON, M. et al. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. **Nat Med**, v. 5, n. 10, p. 1183-1187, 1999a.

FRASSON, M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n. 11, p. 2724-2734, 1999b.

GILL, M. et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. **Circ Res**, v. 88, p. 167-174, 2001.

GRANT, M. B. et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. **Nat Med**, v. 8, p. 607-612, 2002.

GREGORY-EVANS, K; PENNESI, M. E.; WELEBER, R. G. Retinitis pigmentosa and allied disorders. In: RYAN, S. et al. **Retina**, 5th ed., v. II. Elsevier Saunders, 2012, cap 40, p. 761-835.

GROVER, S. et al. Visual acuity impairment in patients with retinitis pigmentosa at age 45 years or older. **Ophthalmology**, v. 106, n. 9, p. 1780-1785, 1999.

GU, S. M. et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. **Nat Genet**, v. 17, n. 2, p. 194-197, 1997.

HARTONG, D. T.; BERSON, E. L.; DRYJA, T. P. Retinitis pigmentosa. **Lancet**, v. 368, p. 1795-1809, 2006.

HECKENLIVELY, J. et al. Retinitis pigmentosa in the Navajo. **Metab Pediatr Ophthalmol**, v. 5, p. 201-206, 1981.

HECKENLIVELY, J. R. **Retinitis pigmentosa**. Philadelphia, Pennsylvania, USA: J.B. Lippincott Co., 1988, 269p.

HUMPHRIES, P.; KENNA, P.; FARRAR, G. J. On the molecular genetics of retinitis

pigmentosa. **Science**, v. 256, p. 804-808, 1992.

IP, M. S. et al. Intravitreal triamcinolone for the treatment of macular edema associated with central retinal vein occlusion. **Arch Ophthalmol.**, v. 122, n. 8, p. 1131-1136, 2004.

JABS, D. A. et al. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. **Am J Ophthalmol.**, v. 140, n. 3, p. 509-516, 2005.

JAGER, R. D. et al. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. **Retina**, v. 24, n. 5, p. 676-698, 2004.

JOHNSON, T. V. et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 51, p. 2051-2059, 2010.

JONAS, J. B. et al. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. **Acta Ophthalmol**, v. 86, n. 2, p. 225-226, 2008.

JONAS, J. B. et al. Intravitreal autologous bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation. **Acta Ophthalmol**, v. 88, n. 4, p. e131-2, 2010.

KAJIWARA, K. et al. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. **Nature**, v. 354, p. 480-483, 1991.

KALKA, C. et al. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. **Circ Res.**, v. 86, p. 1198-1202, 2000.

KENNAN A.; AHERNE A.; HUMPHRIES P. Light in retinitis pigmentosa. **Trends Genet**, v. 21, n. 2, p. 103-110, 2005.

KICIC, A. et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. **J Neurosci**, v. 23, n. 21, p. 7742-7749, 2003.

KIMBERLING, W. J. et al. Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. **Genet Med**, v. 12, p. 512-516, 2010.

KOCHER, A. A. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med**, v. 7, p. 430-436, 2001.

KOLB, H. Gross Anatomy of the Eye. In: KOLB, H.; NELSON, R.; FERNANDEZ, E; JONES, B. (Eds.). **Webvision The organization of the retina and visual system**. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995. Disponível em: <http://webvision.med.utah.edu>. Acesso em janeiro 2018.

- KOLB, H. et al. Cellular organization of the vertebrate retina. **Prog Brain Res**, v. 131, p.3-26, 2001.
- LAMB, T. D.; PUGH Jr., E. N. Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, p. 5137-5152, 2006.
- LAMBA, D. A. et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 34, p. 12769-12774, 2006.
- LAMBA, D. A. et al. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. **PLoS One**, v. 5, n. 1, 2010.
- LI, Z. Y.; POSSIN, D. E.; MILAM, A. H. Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. **Ophthalmology**, v. 102, n. 5, p. 805-816, 1995.
- MACLAREN, R. E. et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. **Nature**, v. 444, p. 203-207, 2006.
- MANDELCORN, M. S.; PODBIELSKI, D.W.; MANDELCORN, E.D. Fixation stability as a goal in the treatment of macular disease. **Can J Ophthalmol**, v. 48, n. 5, p. 364-367, 2013.
- MARMOR, M. F.; ZRENNER, E. Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. **Doc Ophthalmol**, v. 97, n. 2, p. 143-56, 1998.
- MARTIDIS, A. et al. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 109, n. 5, p. 920-927, 2002.
- MEAD, B. et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease. **Stem Cell Res**, v. 14, n. 3, p. 243-257, 2015.
- MEYER, J. S.; KATZ, M. L.; KIRK, M. D. Stem cells for retinal degenerative disorders. **Ann N Y Acad. Sci**, v. 1049, p. 135-145, 2005.
- MEYER, J. S. et al. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 274-283, 2006.
- MEYER, J. S. et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 39, p. 16698-16703, 2009.
- MINAMINO, K. et al. Long-term survival of bone marrow-derived retinal nerve cells in the retina. **Neuroreport**, v. 16, n. 12, p. 1255-1259, 2005.

MOHAND-SAID, S. et al. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 14, p. 8357-8362, 1998.

NISHIDA, S. M.; OLIVEIRA, F. A. K.; TROLL, J. **O corpo humano - Formação da imagem e percepção visual.** (sd). Disponível em: http://www2.ibb.unesp.br/nadi/Museu2_qualidade/Museu2_corpo_humano/Museu2_como_funciona/Museu_homem_nervoso/Museu_homem_nervoso_visao/Museu2_homem_nervoso_visao_mecanismo.htm. Acesso em janeiro 2018.

OTANI, A. et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. **Nat Med**, v. 8, p. 1004-1010, 2002.

OTANI, A. et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. **J Clin Invest**, v. 114, p. 765-774, 2004.

PAGON, R. A. Retinitis pigmentosa. **Surv Ophthalmol.**, v. 33, n. 3, p. 137-177, 1988.

PARK, S. S. et al. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction. **Prog Retin Eye Res**, v. 56, p. 148-165, 2017.

PELLEGRINI, G.; De LUCA, M.; ARSENIJEVIC, Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. **Semin Cell Dev Biol**, v. 18, n. 6, p. 805-818, 2007.

PENN, R. D.; HAGINS, W. A. Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. **Nature**, v. 223, p. 201-204, 1969.

PRUETT, R. C. Retinitis pigmentosa: clinical observations and correlations. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 81, p. 693-735, 1983.

RYAN, S. et al. **Retina**, 5th ed., v. II. Elsevier Saunders, 2012.

SCOTT, I. U.; FLYNN, H. W. Jr.; ROSENFELD, P.J. Intravitreal triamcinolone acetonide for idiopathic cystoid macular edema. **Am J Ophthalmol**, v. 136, n. 4, p. 737-739, 2003.

SIEVING, P. A.; CARUSO, R. C. Retinose pigmentar e desordens relacionadas. in: YANOFF, M.; DUKER, J.S. **Oftalmologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 550-559.

SIQUEIRA, R. C. O uso de células-tronco na oftalmologia. **Rev Bras Oftalmol**, v. 68, n. 2, p. 71-72, 2009.

SIQUEIRA, R. C. et al. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. **Retina**, v. 31, n. 6, p. 1207-1214, 2011.

SIQUEIRA, R. C. et al. Resolution of macular oedema associated with retinitis pigmentosa after intravitreal use of autologous BM-derived hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 48, n. 4, p. 612-613, 2013.

SIQUEIRA, R. C. 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**, v. 6, n. 1, 2015.

TA, C. N. Minimizing the risk of endophthalmitis following intravitreal injections. **Retina**, v. 24, n. 5, p. 699-705, 2004.

TAKAHASHI, M. et al. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. **J Virol**, v. 73, n. 9, p. 7812-7816, 1999.

TIBBETTS, M. D. et al. Stem cell therapy for retinal disease. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 23, n. 3, p. 226-234, 2012.

TORNAMBE, P. E.; HILTON, G. F. Pneumatic Retinopexy: A Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial Comparing Pneumatic Retinopexy with Scleral Buckling. **Ophthalmology**, v. 96, n. 6, p.772-784, 1989.

UNIVERSITY OF IOWA HEALTH CARE. **Drack Research. Electroretinography.** (sd). Disponível em: <http://www.drackresearch.com/ERG>. Acesso em janeiro 2018.

8. *Anexos*

ANEXO A

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

3532/2010

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N°646/2010

Registro CONEP 16018 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0098.0.290.000-10

Processo n° 25000.105448/2010-20

Projeto de Pesquisa: "Utilização de células-tronco derivadas da medula óssea em pacientes portadores de degeneração hereditária da Retina do tipo retinose pigmentar (estudo prospectivo de 50 casos) - fase II do estudo clínico"

Pesquisador Responsável: Rubens Camargo Siqueira

Instituição: Centro único; Centro de Pesquisa Rubens Siqueira (CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: das Faculdades Integradas "Padre Albino"

Área Temática Especial: Novos procedimentos

Patrocinador: Centro de Pesquisa Rubens Siqueira.

Sumário geral do protocolo

Distrofias hereditárias da retina afetam 1 em cada 3500 indivíduos e são caracterizadas por cegueira noturna progressiva, perda do campo visual, atrofia óptica, atenuação arteriolar, permeabilidade vascular alterada e perda da visão central progressiva com cegueira completa. Análise genética molecular destas doenças tem identificado acima de 110 diferentes genes, identificados até o momento, responsáveis pelo desencadeamento destes eventos. Muitas destas mutações estão associadas com componentes enzimáticos e estruturais da maquinaria da fototransdução incluindo rodopsina, cGMP fosfodiesterase, periferrina e RPE65. Apesar destas observações, não existe ainda tratamento efetivo para atrasar a evolução ou reverter estas doenças.

Sabe-se que a medula óssea do adulto contém uma população de células tronco (HSCs) que podem ser divididas em subpopulações de linhagem positiva (Lin+) e linhagem negativa (Lin-) de acordo com seu potencial para diferenciar e formar elementos do sangue. A subpopulação Lin- contém uma variedade de células progenitoras incluindo aquelas capazes de tornar células do endotélio vascular. Estas células progenitoras endoteliais (EPCs) se mobilizam da medula óssea e respondem a uma variedade de moléculas sinalizadoras e podem atingir sítios de angiogênese na vasculatura periférica isquêmica, miocárdio ou áreas de injúria ocular induzida. Lin- HSCs injetada diretamente dentro do olho podem ativar astrócitos e participar no desenvolvimento da angiogênese em ratos no período neonatal ou em ratos adultos com neovascularização induzida por uma injúria. Também foi reportado que células-tronco derivadas da medula óssea (Lin-HSCs), quando injetadas intravítreo 2 semanas pós-natal poderiam prevenir completamente degeneração vascular retiniana observada em modelos de ratos de degeneração retiniana (tipo rd1 e rd 10). Neste mesmo estudo foi observado que este salvamento vascular correlacionou com o salvamento neuronal. Foi demonstrado que a camada nuclear interna permaneceu próxima do normal e a camada nuclear externa que contém os fotorreceptores estava significativamente preservada com salvamento das células contendo predominantemente cones. No estudo eletrorretinográfico (ERG) foi notado respostas presentes nos ratos que foram submetidos ao tratamento e respostas ausentes no grupo controle.

Cont. Parecer CONEP 646/10

Estudos sobre o potencial da utilização de células-tronco embrionárias no tratamento de doenças degenerativas da retina e seu potencial em diferenciar em células da retina, sua sobrevivência e integração após o transplante, relataram que as células apresentaram diferenciação em células da retina e que o meio subretiniano para a colocação das células foi o que ofereceu melhor resultado comparado com os meios intravítreo e subretiniano em ratos. Outro achado importante foi o não desenvolvimento de teratoma em nenhuma amostra. Os autores sugeriram a utilização das células-tronco no tratamento de doenças degenerativas da retina. Foi demonstrado que células-tronco embrionárias após implante intravítreo incorporaram nas camadas da retina, sofrendo diferenciação, assumindo aspecto de neurônios retinianos em termos morfológicos.

Após a aprovação pela CONEP (Registro 14885) foi realizada a fase I do estudo em 5 pacientes. Os pacientes foram submetidos à aplicação intravítrea de células-tronco autólogas derivadas da medula óssea em maio de 2009 e até o presente momento não foi identificado qualquer complicação ou efeitos adversos comprovando, portanto, a segurança do procedimento. Além disso, foi observada uma melhora no campo visual e eletroretinograma, principalmente nos 3 primeiros meses em 3 pacientes. Portanto para dar seqüência ao estudo, está sendo solicitada ao comitê de ética a ampliação da amostra para que possa ser iniciada a fase II do estudo clínico na qual será oportunizada uma melhor avaliação da eficácia do procedimento e também informações mais detalhadas sobre a segurança.

O objetivo geral é "avaliar os efeitos na acuidade visual, angiofluoresceinografia e tomografia de coerência óptica em 50 pacientes portadores de degeneração hereditária da retina do tipo retinose pigmentar submetidos à injeção intravítrea de células tronco derivada da medula óssea".

Os objetivos específicos são: "1- Avaliar prospectivamente 50 pacientes submetidos à injeção intravítrea de células tronco derivada da medula óssea avaliando os seguintes aspectos; 2- acuidade visual, avaliação funcional da retina através do eletroretinograma, avaliar as características do tecido retiniano e complexo epitélio pigmentado e coróide através da tomografia de coerência óptica (OCT); 3- avaliar as características do tecido retiniano e sua vasculatura através da angiofluoresceinografia, avaliar viabilidade das células do epitélio pigmentado através do exame de autofluorescência".

Os pacientes serão selecionados no Centro de Pesquisa Rubens Siqueira em São José do Rio Preto. Serão utilizados 2 laboratórios para separação das células tronco derivadas da medula óssea. O Centro de Terapia Celular do IMC (Instituto de Moléstias Cardiovasculares) de São José do Rio Preto-SP e o laboratório de terapia celular do hemocentro da USP de Ribeirão Preto-SP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).

Para inclusão no estudo, todos os critérios de inclusão a seguir devem ser atendidos: Paciente portador de degeneração hereditária da retina com idade superior a 18 anos, Presença de retinose pigmentar em estágio avançado, MAVC (melhor acuidade visual corrigida) pior ou igual a 20/200 (cegueira legal), Termo de consentimento livre e esclarecido por escrito devidamente assinado.

Os critérios de exclusão são: Injeção intra-vítrea de corticoesteróides ou outras drogas antiangiogênicas a 6 meses da avaliação de entrada; Opacidades de meios que possam interferir significativamente na AV, avaliação oftalmológica clínica, documentação do fundo de olho e realização de laserterapia; Cirurgia intra-ocular nos últimos 3 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; Uso conhecido abusivo de álcool ou drogas; Condições médicas ou psicológicas que impeçam o paciente de concluir o estudo ou assinar o consentimento informado; Doença significativa e não controlada que, na opinião do investigador, possa

Cont. Parecer CONEP 646/10

Estudos sobre o potencial da utilização de células-tronco embrionárias no tratamento de doenças degenerativas da retina e seu potencial em diferenciar em células da retina, sua sobrevivência e integração após o transplante, relataram que as células apresentaram diferenciação em células da retina e que o meio subretiniano para a colocação das células foi o que ofereceu melhor resultado comparado com os meios intravítreo e subretiniano em ratos. Outro achado importante foi o não desenvolvimento de teratoma em nenhuma amostra. Os autores sugeriram a utilização das células-tronco no tratamento de doenças degenerativas da retina. Foi demonstrado que células-tronco embrionárias após implante intravítreo incorporaram nas camadas da retina, sofrendo diferenciação, assumindo aspecto de neurônios retinianos em termos morfológicos.

Após a aprovação pela CONEP (Registro 14885) foi realizada a fase I do estudo em 5 pacientes. Os pacientes foram submetidos à aplicação intravítrea de células-tronco autólogas derivadas da medula óssea em maio de 2009 e até o presente momento não foi identificado qualquer complicação ou efeitos adversos comprovando, portanto, a segurança do procedimento. Além disso, foi observada uma melhora no campo visual e eletroretinograma, principalmente nos 3 primeiros meses em 3 pacientes. Portanto para dar seqüência ao estudo, está sendo solicitada ao comitê de ética a ampliação da amostra para que possa ser iniciada a fase II do estudo clínico na qual será oportunizada uma melhor avaliação da eficácia do procedimento e também informações mais detalhadas sobre a segurança.

O objetivo geral é "avaliar os efeitos na acuidade visual, angiofluoresceinografia e tomografia de coerência óptica em 50 pacientes portadores de degeneração hereditária da retina do tipo retinose pigmentar submetidos à injeção intravítrea de células tronco derivada da medula óssea".

Os objetivos específicos são: "1- Avaliar prospectivamente 50 pacientes submetidos à injeção intravítrea de células tronco derivada da medula óssea avaliando os seguintes aspectos; 2- acuidade visual, avaliação funcional da retina através do eletroretinograma, avaliar as características do tecido retiniano e complexo epitélio pigmentado e coróide através da tomografia de coerência óptica (OCT); 3- avaliar as características do tecido retiniano e sua vasculatura através da angiofluoresceinografia, avaliar viabilidade das células do epitélio pigmentado através do exame de autofluorescência".

Os pacientes serão selecionados no Centro de Pesquisa Rubens Siqueira em São José do Rio Preto. Serão utilizados 2 laboratórios para separação das células tronco derivadas da medula óssea. O Centro de Terapia Celular do IMC (Instituto de Moléstias Cardiovasculares) de São José do Rio Preto-SP e o laboratório de terapia celular do hemocentro da USP de Ribeirão Preto-SP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).

Para inclusão no estudo, todos os critérios de inclusão a seguir devem ser atendidos: Paciente portador de degeneração hereditária da retina com idade superior a 18 anos, Presença de retinose pigmentar em estágio avançado, MAVC (melhor acuidade visual corrigida) pior ou igual a 20/200 (cegueira legal), Termo de consentimento livre e esclarecido por escrito devidamente assinado.

Os critérios de exclusão são: Injeção intra-vítrea de corticoesteróides ou outras drogas antiangiogênicas a 6 meses da avaliação de entrada; Opacidades de meios que possam interferir significativamente na AV, avaliação oftalmológica clínica, documentação do fundo de olho e realização de laserterapia; Cirurgia intra-ocular nos últimos 3 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; Uso conhecido abusivo de álcool ou drogas; Condições médicas ou psicológicas que impeçam o paciente de concluir o estudo ou assinar o consentimento informado; Doença significativa e não controlada que, na opinião do investigador, possa

Cont. Parecer CONEP 646/10

excluir o paciente do estudo; Impedimento ou capacidade legal limitada; Participação em outro estudo clínico nos últimos 30 dias.

Os pacientes que tiverem participado de algum estudo clínico nos últimos 12 meses, ainda que tenham terminado sua participação anteriormente aos últimos 30 dias, somente poderão ser incluídos se a participação no presente protocolo puder trazer claro benefício para o paciente. Os pacientes estarão livres para sair do estudo a qualquer momento sem precisar alegar os motivos.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico. O número de sujeitos de pesquisa no centro em tela é de 50.

O estudo será realizado no Centro de Pesquisa Rubens Siqueira, com participação do Departamento de Oftalmologia das Faculdades Integradas "Padre Albino" como instituição vinculada.

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto (páginas 03-04, numeração do CEP) está devidamente preenchida e assinada.

O TCLE (página 60-63, numeração do CEP) se encontra redigido em forma de convite, conciso, claro, objetivo. Neste documento estão descritos: a motivação do estudo, os objetivos, procedimentos a serem realizados, desconfortos e benefícios da participação, forma de acompanhamento e assistência, garantia de esclarecimento, liberdade de recusa e garantia de sigilo, custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos e o campo para assinatura. Embora apresentado na folha de rosto que não há patrocinador, consta declaração de patrocínio na página 37 (numeração do CEP). O orçamento detalhado foi apresentado na página 38 (numeração do CEP).

Considerações sobre a análise das respostas às recomendações do Parecer CONEP Nº 478/2010, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. O orçamento apresentado encontra-se incompleto, não apresentando os valores relativos aos exames: eletroretinografia e tomografia. Solicita-se apresentação do orçamento completo, bem como as fontes financiadoras.

Resposta: Foi anexado o orçamento detalhando os custos relacionados aos procedimentos e exames a serem realizados. A fonte financiadora será o Centro de Pesquisa Rubens Siqueira, de São José do Rio Preto (SP), conforme documento da instituição anexada ao processo.

Análise: Pendência atendida.

2. Com relação ao TCLE no item riscos e desconfortos solicitam-se:

- a. Informar ao sujeito de pesquisa o risco mínimo de: infecção ocular, hemorragia, descolamento da retina e atrofia. Na opinião da CONEP não se trata de riscos mínimos devendo ser retirada essa terminologia. Além disso, deve ser acrescentado o risco de endoftalmite descrito no protocolo.

Resposta: TCLE foi modificado conforme solicitado.

Análise: Pendência atendida.

- b. O TCLE deve ser claro em relação à gratuidade da participação na pesquisa, bem como em relação ao ressarcimento das despesas para o deslocamento desses pacientes para todas as visitas.

Resposta: TCLE foi modificado conforme solicitado.

Análise: Pendência atendida.

Cont. Parecer CONEP 646/10

3. A CONEP considera que dado o aspecto inovador do procedimento proposto, bem como as características de estudos com terapias celulares, o prazo proposto de 6 meses para o acompanhamento desses participantes não é adequado. Solicita-se justificativa/adequação do prazo.

Resposta: O prazo de acompanhamento dos sujeitos de pesquisa será de 1 ano.

Análise: Pendência atendida.

4. A amostra proposta de 50 pacientes foi considerada excessiva em relação ao princípio da cautela, tratando-se de um estudo fase II. A CONEP solicita que sejam recrutados inicialmente até 20 participantes e, a depender da avaliação da CONEP sobre relatório de 48 semanas, aprovando sua continuidade, seja incluído o restante da amostra.

Resposta: A amostra de 50 pacientes será reduzida para 20, conforme solicitação desta Comissão, e após a avaliação de 48 semanas, caso os resultados sejam favoráveis, solicitarão o aumento da amostra com novo recrutamento de pacientes, conforme requerido pela CONEP.

Análise: Pendência atendida.

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

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 09 de novembro de 2010.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO B

REGISTRO DO ESTUDO NO CLINICAL TRIAL

We updated the design of this site on December 18, 2017. [Learn more.](#)

U.S. National Library of Medicine

ClinicalTrials.gov

[Find Studies](#) [About Studies](#) [Submit Studies](#) [Resources](#) [About Site](#)

[Home](#) > [Study Record Detail](#) Save this study

Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells Transplantation For Retinitis Pigmentosa (RETICELL)

The safety and scientific validity of this study is the responsibility of the study sponsor and investigators. Listing a study does not mean it has been evaluated by the U.S. Federal Government. Read our [disclaimer](#) for details.

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01560715

Recruitment Status : Completed

First Posted : March 22, 2012

Last Update Posted : July 21, 2017

Sponsor:
University of Sao Paulo

Information provided by (Responsible Party):
Rubens Camargo Siqueira, University of Sao Paulo

Study Details **Tabular View** **No Results Posted** [Disclaimer](#) [How to Read a Study Record](#)

Study Description Go to

Brief Summary:
The purpose of this study is to evaluate the short-term safety and efficacy of a single intravitreal injection of autologous bone marrow stem cells in patients with retinitis pigmentosa.

Condition or disease	Intervention/treatment	Phase
Retinitis Pigmentosa	Biological: intravitreal injection of autologous bone marrow stem cells	Phase 2

ANEXO C

TERMO 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 degeneração hereditária da retina – retinose pigmentar (estudo prospectivo de 20 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, a pesquisa se justifica, portanto numa possibilidade de tratamento destas doenças.

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

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

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

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

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

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS

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

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

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

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

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

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO

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

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

ARCIERI. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

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

Telefone comitê de ética de Brasília : (61) 33152150

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

9. Apêndices

APÊNDICE A - Valores de melhor acuidade visual corrigida (MAVC) -

Valores no grupo submetido à IIV destacado com fundo cinza e no grupo controle fundo branco.

Paciente	Olho tratado	Baseline	4	16	32	48	Baseline	4	16	32	48
1	OE	0,70	0,46	0,54	0,54	0,52	0,50	0,44	0,48	0,24	0,46
2	OE	0,60	0,64	0,36	0,32	0,42	0,20	0,26	0,34	0,18	0,20
3	OE	0,30	0,32	0,16	0,16	0,34	0,24	0,20	0,16	0,12	0,12
4	OE	0,18	0,08	0,00	0,02	0,04	0,04	0,02	0,04	0,00	0,04
5	OD	0,88	0,88	0,46	0,76	0,76	0,42	0,44	0,36	0,48	0,50
6	OE	0,48	0,58	0,46	0,42	0,52	0,50	0,58	0,52	0,48	0,46
7	OE	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,00	0,02	0,02	0,04	0,04
8	OD	0,22	0,08	0,12	0,12	0,14	0,14	0,12	0,12	0,12	0,14
9	OD	0,36	0,08	0,28	0,28	0,30	0,22	0,10	0,18	0,18	0,14
10	OD	0,40	0,22	0,26	0,20	0,20	0,34	0,20	0,16	0,20	0,20
11	OD	0,58	0,52	0,48	0,52	0,60	0,20	0,16	0,12	0,18	0,14
12	OE	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02
13	OD	0,32	0,38	0,30	0,24	0,44	0,20	0,26	0,16	0,10	0,14
14	OE	0,58	0,52	0,58	0,58	0,68	0,40	0,26	0,26	0,26	0,30
15	OE	0,40	0,26	0,26	0,16	0,16	0,20	0,16	0,16	0,14	0,14
16	OD	0,14	0,14	0,10	0,26	0,30	0,14	0,04	0,04	0,10	0,20
17	OD	0,20	0,22	0,12	0,18	0,10	0,10	0,16	0,18	0,18	0,20
18	OD	0,26	0,10	0,18	0,08	0,24	0,24	0,20	0,14	0,24	0,24
19	OE	0,22	0,20	0,06	0,10	0,30	0,20	0,18	0,06	0,00	0,14
20	OD	0,06	0,00	0,04	0,02	0,00	0,06	0,02	0,06	0,04	0,04

APÊNDICE B - Valores de MD (dB) no campo visual 30-2.

Valores no grupo submetido à IIV destacado com fundo cinza e no grupo controle fundo branco.

Paciente	Olio tratado	Baseline	4	16	32	48	Baseline	4	16	32	48
1	OE	-28,30	-28,60	-28,20	-28,60	-27,90	-28,40	-27,90	-27,80	-27,30	-27,90
2	OE	-18,80	-15,60	-17,10	-16,50	-18,90	-19,80	-17,20	-16,80	-18,40	-17,90
3	OE	-14,20	-14,50	-6,80	-12,60	-2,00	-11,70	-10,60	-6,30	-8,60	-4,70
4	OE	-24,40	-22,80	-23,30	-22,20	-23,10	-25,50	-24,30	-20,80	-23,40	-24,00
5	OD	-27,00	-28,50	-28,40	-27,10	-27,10	-26,10	-27,90	-27,30	-22,60	-22,60
6	OE	-17,60	-12,00	-14,10	-14,60	-15,90	-20,20	-10,20	-15,20	-13,40	-11,70
7	OE	-16,90	-16,90	-18,60	-18,20	-17,80	-16,80	-16,50	-15,20	-16,60	-16,10
8	OD	-25,80	-25,10	-25,20	-24,20	-24,90	-24,80	-25,20	-25,40	-25,00	-26,00
9	OD	-27,70	-28,40	-28,20	-28,30	-27,70	-27,90	-28,50	-28,30	-28,60	-28,00
10	OD	-20,70	-22,20	-22,00	-22,10	-23,50	-21,40	-21,10	-21,50	-21,60	-23,10
11	OD	-27,30	-27,90	-28,10	-27,70	-27,50	-28,00	-28,30	-27,70	-28,20	-27,90
12	OE	-26,40	-22,20	-28,10	-27,30	-28,40	-24,40	-22,50	-25,20	-26,20	-25,60
13	OD	-27,40	-25,80	-26,20	-26,00	-26,20	-26,60	-24,40	-25,20	-24,80	-24,70
14	OE	-27,90	-28,30	-28,40	-28,00	-27,80	-26,20	-26,70	-28,10	-27,20	-27,10
15	OE	-27,10	-26,70	-27,10	-27,00	-27,00	-26,80	-26,70	-26,80	-26,60	-26,90
16	OD	-20,90	-21,20	-22,10	-21,70	-22,80	-23,20	-22,60	-22,30	-22,20	-22,30
17	OD	-21,10	-25,70	-25,00	-24,60	-24,60	-21,80	-22,60	-22,20	-21,90	-21,90
18	OD	-24,50	-25,90	-25,70	-25,90	-25,50	-24,80	-25,00	-25,00	-24,50	-25,50
19	OE	-27,70	-27,40	-27,60	-27,10	-26,60	-26,90	-26,70	-26,30	-26,20	-25,20
20	OD	-25,90	-26,40	-25,40	-25,40	-25,90	-26,60	-24,80	-26,00	-26,30	-26,70

APÊNDICE C - Valores de sensibilidade macular (dB) obtidos na microperimetria (MAIA).

Valores no grupo submetido à IIV destacado com fundo cinza e no grupo controle fundo branco.

Paciente	Olho tratado	Baseline	4	16	32	48	Baseline	4	16	32	48
1	OE	21,40	2,00	21,60	19,80	20,30	22,30	19,20	20,80	19,70	19,90
2	OE	15,80	16,10	17,00	15,60	17,90	17,50	16,70	17,40	17,80	16,20
3	OE	24,30	29,30	33,00	30,90	31,70	29,30	27,40	30,50	30,70	31,60
4	OE	10,70	11,20	12,40	10,30	10,70	7,20	12,00	10,70	10,10	11,30
5	OD	11,10	13,70	10,20	10,80	4,10	7,40	8,10	11,20	9,10	7,00
6	OE	17,60	18,50	18,50	20,30	21,90	18,90	20,00	19,50	20,10	21,40
7	OE	22,20	20,00	22,90	22,40	23,40	21,30	20,90	18,90	23,00	22,70
8	OD	9,40	11,10	14,00	8,70	8,20	9,90	12,30	11,20	9,40	9,00
9	OD	1,80	3,00	0,90	1,70	1,10	2,00	2,00	1,40	1,70	1,10
10	OD	12,50	17,40	18,00	16,30	15,60	18,00	19,80	18,70	17,40	15,10
11	OD	4,80	6,20	5,20	5,40	4,00	6,20	7,00	7,20	7,40	5,70
12	OE	5,30	7,40	7,20	7,40	5,50	8,10	12,10	9,60	9,40	9,00
13	OD	10,40	9,50	11,20	11,80	11,50	11,80	12,80	14,00	11,60	13,10
14	OE	4,40	3,30	3,10	3,50	2,80	5,30	4,60	4,10	4,00	4,30
15	OE	8,90	11,40	10,00	11,40	11,80	12,50	14,00	12,40	11,50	11,90
16	OD	18,90	18,30	18,10	18,70	19,70	17,10	19,30	19,10	17,40	15,10
17	OD	12,60	11,90	14,60	12,80	13,80	11,50	3,00	13,10	13,00	11,90
18	OD	13,10	13,90	13,00	11,90	10,50	14,70	14,50	12,70	12,80	12,40
19	OE	3,40	6,90	8,40	7,80	8,00	5,20	8,90	9,90	8,00	9,50
20	OD	9,40	11,90	9,90	10,10	9,60	10,10	9,90	9,40	9,80	9,20

APÊNDICE D - Valores de espessura macular (micra) obtidos no exame de OCT.

Valores no grupo submetido à IIV destacado com fundo cinza e no grupo controle fundo branco.

Paciente	Olho tratado	Baseline	4	16	32	48	Baseline	4	16	32	48
1	OE	197	196	213	198	198	207	224	228	225	216
2	OE	348	289	244	226	199	279	295	252	245	232
3	OE	488	527	537	557	537	437	436	443	447	474
4	OE	286	289	283	295	279	270	266	264	259	263
5	OD	203	201	208	201	215	245	260	256	254	270
6	OE	397	426	439	430	412	434	403	437	447	432
7	OE	306	306	309	309	305	300	299	302	302	301
8	OD	271	274	271	270	274	278	276	277	277	278
9	OD	269	272	272	272	268	259	259	264	259	262
10	OD	344	306	318	297	302	299	294	300	288	304
11	OD	229	225	218	231	226	262	261	257	251	263
12	OE	252	254	257	258	252	299	291	296	301	297
13	OD	277	330	282	275	275	274	273	276	274	272
14	OE	236	244	238	232	232	235	234	238	230	230
15	OE	275	278	288	287	296	261	262	262	266	272
16	OD	305	304	307	300	304	305	306	306	285	288
17	OD	282	281	284	276	281	273	270	270	269	274
18	OD	277	279	278	284	298	262	267	269	277	268
19	OE	375	378	371	370	376	289	286	284	283	284
20	OD	248	250	248	246	242	254	256	254	252	251