

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

André Maurício Passos Liber

**Estudo morfológico e eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido  
micofenólico em coelhos utilizando um modelo de uveíte crônica experimental**

**SÃO PAULO  
2015**

**André Maurício Passos Liber**

**Estudo morfológico e eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido  
micofenólico em coelhos utilizando um modelo de uveíte crônica experimental**  
(Versão Corrigida)

Tese apresentada ao instituto de  
Psicologia da Universidade de  
São Paulo para obtenção de título  
de Doutor em Ciências. Área de  
concentração: Neurociências e  
Comportamento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dora Fix  
Ventura

Coorientador: Dr. Francisco Max  
Damico

**SÃO PAULO**  
**2015**

ANDRÉ MAURÍCIO PASSOS LIBER

**Estudo morfológico e eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico em coelhos utilizando um modelo de uveíte crônica experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências.

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr. (orientador):** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

Aprovada em: \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Local de defesa: Instituto de psicologia  
Universidade de São Paulo

*Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realiza-los.*

*Aos meus Pais, Carlos e Teresinha.*

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Dora Fix Ventura, por todos esses anos de convivência e ensinamentos, por ter puxado minha orelha quando preciso, mas também por sempre reconhecer o esforço e empenho de seus alunos, sempre nos orientando de forma leve e estando sempre à disposição.

Ao meu Coorientador Dr. Francisco Max Damico, que me acolheu dentro de sua linha pesquisa, o que me proporcionou o aprendizado de novas técnicas, além de ser uma pessoa impar de fácil convívio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa, pela ajuda com a análise estatística e todos estes anos de amizade.

Ao Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Jr. e seu aluno de doutorado Ricardo Martins Duarte Byrro da UFMG, pela colaboração no trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dânia E. Hamassaki, por sempre abrir as portas de seu laboratório, desde o meu mestrado e também agradeço a sua técnica, Priscila Sayami, por toda ajuda prestada e por sempre ter me recebido com simpatia.

Ao Dr. Balázs Vince Nagy, por sua colaboração no projeto e ajuda técnica prestada ao ERG.

À aluna de iniciação científica, Amanda Alves, pela ajuda na realização do ERG.

À oftalmologista Thais Zamudio Igami, por realizar os exames clínicos nos coelhos.

Ao mestrando Ricardo Tiosso, pela ajuda prestada.

Ao secretário do laboratório, Claudiel Luiz dos Santos, pela amizade e ajuda sempre prestada.

Às secretarias Sônia Maria Caetano de Souza e Maria Clarice Ferreira da Silva.

Em especial à Dr.<sup>a</sup> Gabriela Lourençon Ioshimoto, por todos esses anos de parceria dentro e fora do ERG.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

E não poderia de deixar de agradecer aos meus velhos e novos amigos do LabVis, pessoas com quem acabei passando mais tempo diariamente do que com a minha própria família. Obrigado a todos! (Daniela Bonci, Einat Hauzman, Valeria Duarte, Valtenice França, Flávio Theodoro, Leonardo Henriques, Mirella Barboni, Mirella Gualtieri, Thiago Costa, Amanda Bastos, Muriele Lobato, Livia Rego, Felipe Galante, Vitor Corredor, Amanda Bernardino, Luiz Baran, Aline Goto, Diego Decleva, Viviani Montovani e Luise Garcia).

*... Everything that drowns me makes me wanna fly*

*Everything that kills me makes me feel alive ...*

# **Estudo morfológico e eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico em coelhos utilizando um modelo de uveíte crônica experimental**

## **Resumo**

Uveítes são inflamações intra-oculares geralmente crônicas e constituem uma das principais causas de cegueira no mundo. Os corticosteroides são a droga de primeira escolha para o tratamento das uveítes não infecciosas, mas muitas vezes há necessidade do uso de outras drogas imunossupressoras. O micofenolato de mofetila (MMF) é um potente imunossupressor administrado por via oral que vem sendo utilizado com sucesso no tratamento das uveítes, mas cujos efeitos colaterais muitas vezes tornam necessária sua suspensão. O MMF é uma pró-droga, que é transformada no fígado em ácido micofenólico (MPA), o imunossupressor ativo. Para minimizar os efeitos colaterais do uso do MPA e permitir que o olho receba uma dose maior da droga, testamos os efeitos da injeção intravítrea do MPA em um modelo de uveíte crônica experimental (UCE) em olhos de coelhos. Os objetivos deste estudo foram: 1) reproduzir um modelo de UCE em coelhos através da injeção intravítrea de *M. tuberculosis*; 2) estabelecer uma dose segura de MPA a ser injetada no vítreo; e 3) analisar os efeitos morfológicos, clínicos e eletrofisiológicos da injeção intravítrea de MPA em coelhos utilizados como modelo de UCE. O modelo de UCE reproduzido apresentou uma inflamação autolimitada, possuindo um pico de inflamação no 17º dia após a indução da uveíte. As doses de MPA testadas (0,1 e 1mg) não foram tóxicas para a retina do coelho. O modelo de UCE recebeu uma injeção intravítrea de 0,1mg de MPA e as análises clínicas demonstraram uma redução na inflamação. As análises realizadas com o eletrorretinograma (ERG) também apontaram uma melhora na inflamação através da recuperação da latência das ondas-a e b (fotópicas e escotópica) e recuperação da amplitude da onda-a (fotópica). As análises morfológicas com HE não apresentaram alterações na estrutura retiniana, porém a imunohistoquímica para proteína GFAP evidenciou gliose das células de Müller, sinalizando um processo inflamatório. Concluímos que o modelo de UCE reproduziu uma uveíte anterior semelhante à uveíte causada em humanos e a dose de MPA utilizada apresentou efeitos terapêuticos durante o pico de inflamação, mostrando uma diminuição da inflamação e promovendo a recuperação de fotorreceptores e células bipolares-ON. Este resultado faz das injeções intravítreas de MPA um recurso promissor no tratamento de uveítes. Porém, novos experimentos são necessários para padronizar os resultados encontrados.

**Palavras-Chave:** uveíte crônica experimental, ácido micofenólico, injeção intravítrea eletrorretinograma, morfologia.

# **Morphological and electrophysiological study of the effects of the intravitreal injection of mycophenolic acid in rabbits using an experimental model of chronic uveitis**

## *Abstract*

Uveitis is an intraocular inflammation usually chronic and a major cause of blindness in the world. Corticosteroids are the first choice drug for treatment of non-infectious uveitis, but other immunosuppressive drugs are usually required. Mycophenolate mofetil is a powerful immunosuppressant orally administered that has been used successfully in the treatment of uveitis, but whose side effects often lead to the suspension of the drug intake. The Mycophenolate mofetil is a prodrug, which is converted in the liver to mycophenolic acid (MPA), the active immunosuppressant. To minimize side effects of the use of mycophenolic acid and to enable a higher administration dose in the eye, we tested the effects of the intravitreal injection of mycophenolic acid in an experimental model of chronic uveitis (ECU) in rabbit eyes. The objectives of this study were: 1) to reproduce an ECU model in rabbits by intravitreal injection of *M. tuberculosis*; 2) to establish a safe dose of mycophenolic acid to be injected into the vitreous; and 3) to analyze the morphological, clinical and electrophysiological effects of the intravitreal injection of mycophenolic acid in rabbits used as a model of ECU. The ECU model reproduced showed a self-limiting inflammation, having a peak of inflammation at 17 days after uveitis induction. Both MPA doses we tested (0.1 and 1 mg) were not toxic to the retina. The ECU model received an intravitreal injection of 0.1 mg of MPA and clinical analysis demonstrated a reduction of the inflammation. The electroretinography (ERG) analysis also indicated an improvement in the inflammation process by restoring the latency of the a-wave and b-wave (photopic and scotopic) and by the recovery of the a-wave amplitude (photopic). The morphological analysis with HE showed no changes in the retinal structure, however the immunohistochemistry for GFAP protein showed gliosis of Müller cells, indicating an inflammatory process. We conclude that the ECU model reproduced an anterior uveitis similar to the human uveitis and the MPA dose we used showed therapeutic effects during the inflammation peak, reducing the inflammation and promoting the recovery of photoreceptors and ON bipolar cells. This makes intravitreal injections of MPA a promising resource in the treatment of uveitis. Future studies are necessary to standardize the present findings.

**Keywords:** experimental chronic uveitis, mycophenolic acid, intravitreal injection electroretinogram, morphology.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1** – Esquema mostrando um corte longitudinal de um olho humano e suas estruturas, em destaque o trato uveal, composto pela coroide, corpo ciliar e íris (imagem modificada de: <http://www.nei.nih.gov/health/uveitis/uveitis.asp>, acessado em agosto/2014) .....26
- Figura 2** – Metabolismo das purinas, via de novo e de salvamento (imagem modificada de Noronha et al.,1997) .....34
- Figura 03** – Esquema ilustrando a organização celular da retina e suas camadas (imagem: modificado de Browning D, J. (2012) .....37
- Figura 4** – Ondas a e b do eletrorretinograma: a – amplitude da onda a; b – amplitude da onda b; La – latência da onda a e Lb – latência da onda b (imagem: <http://webvision.med.utah.edu> , acessado agosto/2014) .....39
- Figura 05** – Respostas escotópicas de um rato albino, um coelho albino e ser humano. São similares, porém, diferem em amplitude e latência (Modificado de Perlman, 2009) .....39
- Figura 6** – Coelho albino da espécie New zealand (imagem: <http://www.countryfarmlifestyles.com/raising-rabbits.html> – acessado em março/2014) .....46
- Figura 7** – Injeção intravítrea de MPA sendo aplicada a 3mm posteriormente do limbo corneano no olho direito de um coelho.....48
- Figura 8** – Coelho preparado e posicionado no Ganzfeld, para o início do eletrorretinograma, envolto em manta para auxiliar na manutenção da temperatura corporal, com os eletrodos posicionados nos olhos e na orelha .....51

<b>Figura 9</b> – Linha temporal evidenciando os eventos necessários para indução da uveíte crônica experimental (MT = micobactéria da tuberculose) .....	55
<b>Figura 10</b> – Linha temporal mostrando a ordem dos acontecimentos do processo de indução do modelo de uveíte crônica experimental, e os dias em que foram realizados os ERGs (eletrorretinogramas) e os exames clínicos (EC) .....	56
<b>Figura 11</b> – Linha temporal mostrando os eventos para o estudo de toxicidade do MPA, e os dias de realização dos registros eletrofisiológicos (ERG) .....	57
<b>Figura 12</b> – Linha temporal mostrando os eventos necessários para a avaliação da eficácia da injeção intravítrea de MPA (ácido micofenólico) no modelo de uveíte crônica experimental (UCE), assim como os dias em que foram realizados os eletrorretinogramas (ERG) e exames clínicos (EC) .....	58
<b>Figura 13</b> – Diagrama ilustrativo que demarca os outliers retirados da amostra. LBS 75% = Limite de borda superior (percentil 75%), LBI 25% = limite de borda inferior (percentil 25%). H = distância entre quartis (imagem modificada de: Statistica versão 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) .....	59
<b>Figura 14</b> – ERGs escotópicos de um mesmo animal modelo de UCE para as intensidades testadas em três dias distintos, pré-indução, 24 e 48 dias após indução da UCE. Intensidade: cd.s/m <sup>2</sup> ; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; μV: microvolts.....	63
<b>Figura 15</b> – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095, 0,95 e 9,5 cd.s/m <sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 log respectivamente) no modelo de UCE, nos dias pré-indução 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. <b>A)</b> Latência da onda-a; <b>B)</b> amplitude da onda-a; <b>C)</b> latência da onda-b e <b>D)</b> amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (*=P<0,05) .....	65
<b>Figura 16</b> – Médias da reposta saturada da onda-b (Vmax) no dia pré-indução e ao longo do desenvolvimento da UCE. Círculos fechados correspondem ao olho com UCE,	

círculos abertos correspondem ao olho controle. OD: olho direito; OE: olho esquerdo .....66

**Figura 17** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de b/a, antes da indução da UCE e ao longo de seu desenvolvimento. OD: olho direito, círculos fechados; OE: olho esquerdo, círculos abertos; Barras verticais: desvio padrão .....66

**Figura 18** – ERGs fotópicos de um mesmo animal modelo de UCE para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro; pré-indução, 24 e 48 dias após a indução da UCE. Há uma diminuição na amplitude da resposta para as duas intensidades. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; uV: microvolts .....67

**Figura 19** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49 cd.s/m<sup>2</sup> (0.5 e 1 log respectivamente) no modelo de UCE, nos dias pré-indução 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: Desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0,05) .....68

**Figura 20** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal modelo de UCE nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; μV: microvolts .....69

**Figura 21** – Valores médios das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz), para a UCE. Barras verticais: desvio padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0,05) .....70

**Figura 22** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – com UCE. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20μm (micrometros) .....71

**Figura 23** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle, e D, E F, cortes do olho com uveíte – direito. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado negativamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com UCE marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com UCE imunomarcado para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20 $\mu$ m (micrometros) .....72

**Figura 24** - ERGs escotópicos de um mesmo animal que recebeu injeção intravítrea de 1mg/mL de MPA, em três dias distintos, pré-injeção, 14 e 30 dias após a injeção de MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts .....73

**Figura 25** – Médias da reposta saturada da onda-b (Vmax) no dia pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga no olho, dose de 0,1mg/mL MPA. Círculos fechados correspondem ao olho com MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho com veículo (OE: olho esquerdo). Barras verticais: desvio padrão .....74

**Figura 26** – Médias e desvios padrão da amplitude de saturação da onda-b (Vmax) no dia pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga no olho, dose de 1mg/mL MPA. Círculos fechados correspondem ao olho com MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho com veículo (OE: olho esquerdo). Barras verticais: desvio padrão .....74

**Figura 27** – Média da razão da amplitude escotópica máxima de b/a nas doses de 0,1mg/mL (gráfico superior) e 1mg/mL (gráfico inferior) de MPA, pré-injeção e ao longo de 30 dias. OD: olho direito; OE: olho esquerdo. Barras verticais: desvio padrão .....75

**Figura 28** – ERGs fotópicos de um mesmo animal em que foi injetado com 1mg/mL de MPA na cavidade vítrea, para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro, pré-injeção, 14 e 30 dias após a injeção de MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts .....76

**Figura 29** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal injetado com a dose de 1mg/mL de MPA nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts .....77

**Figura 30** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – dose de 0,1mg de MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20 $\mu$ m (micrometros) .....78

**Figura 31** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – dose de 1mg de MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20 $\mu$ m (micrometros) .....79

**Figura 32** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado no estudo de toxicidade do MPA. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle, que receberam veículo. D, E, F - cortes do olho experimental (direito) – dose de 0,1mg/mL de MPA. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado positivamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com 0,1mg de MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com 0,1mg de MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20 $\mu$ m (micrometros) .....79

**Figura 33** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado no estudo de toxicidade do MPA. A, B, C - os cortes do olho esquerdo – controle, que receberam veículo. D, E, F - cortes do olho experimental (direito) – dose de 1mg de MPA. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado positivamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com 1mg de MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com 1mg de MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrometros) .....80

**Figura 34** – ERGs escotópicos de um mesmo animal modelo de UCE com MPA em três dias distintos, pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; µV: microvolts .....84

**Figura 35** – Médias das amplitudes e latências das ondas a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095, 0,95 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 logs respectivamente) no modelo de UCE com MPA, nos dias pré-Tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0.05) .....86

**Figura 36** – Médias da resposta saturada da onda-b (V<sub>max</sub>) no dia pré-tratamento e ao longo dos 48 dias de ação de 0,1mg/mL MPA no olho com UCE. Círculos fechados correspondem ao olho com UCE e MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho controle (OE: olho esquerdo) .....87

**Figura 37** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de b/a ao longo do desenvolvimento da UCE tratada com a dose de 0,1mg/mL de MPA. Barras verticais:

desvio padrão; OD: olho direito (círculos fechados); OE: olho esquerdo (círculos abertos). Os asteriscos representam significância estatística:  $P=0,0003$  .....88

**Figura 38** – ERGs fotópicos de um mesmo animal modelo de UCE tratado com 0,1mg/mL de MPA para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro, pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. Intensidade:  $\text{cd.s/m}^2$ ; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts .....89

**Figura 39** – Médias das amplitudes e latências das ondas-a e -b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49  $\text{cd.s/m}^2$  (0.5 e 1 log respectivamente) no grupo UCE com MPA, nos dias pré-tratamento, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo ( $*=P<0,05$ ) .....90

**Figura 40** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal modelo de UCE tratado com MPA nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts .....91

**Figura 41** – Valores médios e respectivos desvios padrão das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz) para UCE tratada com MPA. Barras verticais: desvio padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo ( $*=P<0,05$ ) .....92

**Figura 42** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE tratados com MPA. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – com UCE e MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20 $\mu\text{m}$  (micrometros) .....93

**Figura 43** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE tratado com MPA. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle. D, E, F - cortes de um

olho direito – com UCE + MPA. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado negativamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com UCE + MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com UCE + MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrômetros) .....94

**Figura 44** - ERGs escotópicos de dois animais registrados em três dias distintos: pré-indução/pré-tratamento, 24 dias e 48 dias após a indução da UCE. Em vermelho o modelo de UCE e em azul modelo de UCE tratado com MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; µV: microvolts .....96

**Figura 45** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095, 0,95 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 log respectivamente) no modelo de UCE x modelo de UCE tratado com MPA, nos dias pré-indução/pré-Tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais = Desvio Padrão. OD (U): olho direito UCE; OD (U+M): olho direito UCE+MPA (\*=P<0,05) .....98

**Figura 46** – Médias da reposta saturada da onda-b (Vmax) no dia pré-indução/pré-tratamento e ao longo do desenvolvimento do grupo tratado com MPA e não tratado. Círculos vermelhos correspondem ao olho com UCE (OD: olho direito) e círculos azuis, correspondem ao olho com UCE tratado com MPA (OE: olho esquerdo) .....99

**Figura 47** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de b/a ao longo do desenvolvimento da UCE (círculos em vermelho) e da UCE tratada com MPA (círculos em azul). Barras verticais: desvio padrão; OD (U): olho direito UCE; OD (U+M): olho direito UCE + MPA .....100

**Figura 48** – ERGs fotópicos de dois animais registrados em três dias distintos: pré-indução/pré-tratamento, 24 e 48 dias após a indução da UCE. Em vermelho o modelo de UCE e em azul o modelo de UCE tratado com MPA. Intensidade:  $\text{cd.s/m}^2$ ; OD: olho direito; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts .....101

**Figura 49** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49  $\text{cd.s/m}^2$  (0.5 e 1 log respectivamente) no grupo de UCE sem tratamento e tratado com MPA, nos dias pré-indução/pré-tratamento, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: Desvio Padrão; OD (U): olho direito; OD: olho direito UCE+MPA (\*= $P < 0,05$ ) .....102

**Figura 50** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de dois animais, modelo de UCE (linha vermelha) modelo tratado com MPA (linha azul) nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts .....103

**Figura 51** – Valores médios e respectivos desvios padrão das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz) para UCE (círculos em vermelho) e UCE tratada com MPA (círculos em azul). OD: Olho direito (\*= $P < 0,05$ ) .....105

**Figura 52** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de coelhos albinos utilizados como modelo de UCE. **A)** corte radial de um olho direito com UCE. **B)** corte radial de um olho direito com UCE tratado com MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20 $\mu\text{m}$  (micrômetros) .....106

**Figura 53** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de coelhos albinos utilizados como modelo de UCE. A, B, C - cortes de um olho com UCE. D, E F - cortes de um olho com UCE tratado com MPA. **A)** corte radial do olho com UCE marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho com UCE imunomarcado positivamente para a proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **C)**

Sobreposição das imagens A e B; **D)** corte radial do olho com UCE tratado com MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com UCE tratado com MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrômetros) .....107

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1** – Achados clínicos do modelo de uveíte crônica experimental, mostrando o desenvolvimento do quadro infeccioso gerado pela inflamação.....62

**Tabela 2** – Achados clínicos do modelo de uveíte crônica experimental tratado com MPA, mostrando o desenvolvimento do quadro clínico.....83

## Lista de abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>ARVO</b>	Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia ( <i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i> )
<b>cd/m<sup>2</sup></b>	unidade de luminância - candela por metro quadrado
<b>cd.s/m<sup>2</sup></b>	unidade de luminância - candela por segundo por metro quadrado
<b>CCG</b>	Camada de células ganglionares
<b>CNE</b>	Camada Nuclear Externa
<b>CNI</b>	Camada Nuclear Interna
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b> ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ERG</b>	eletrorretinograma / eletrorretinografia
<b>et al.</b>	e outros / colaboradores ( <i>et alli</i> )
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>g</b>	Gramma
<b>G</b>	Gauge
<b>GFAP</b>	proteína glial fibrilar ácida ( <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato ( <i>guanosine triphosphate</i> )
<b>h</b>	Hora
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitários humanos ( <i>Human leukocyte antigens</i> )
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IEF</b>	Intervalo entre flashes
<b>IMPDH</b>	Enzima Inosina Monofosfato desidrogenase ( <i>Enzyme iosine monofosphate dehydrogenase</i> )
<b>Inc.</b>	Sociedade Anônima ( <i>Incorporated</i> )
<b>IRBP</b>	Proteína ligadora de retinoide do interfotorreceptor ( <i>interphotoreceptor retinoid-binding protein</i> )

<b>ISCEV</b>	Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão ( <i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i> )
<b>IUSG</b>	Grupo internacional de estudos das uveítes ( <i>International uveitis study group</i> )
<b>kg</b>	Quilograma
<b>log</b>	Logaritmo
<b>M</b>	Molar
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MMF</b>	Micofenolato de mofetila ( <i>Mycophenolate mofetil</i> )
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility complex</i> )
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLE</b>	Membrana limitante externa
<b>MPA</b>	Ácido micofenólico ( <i>mycophenolic acid</i> )
<b>ms</b>	Milissegundos
<b>MT</b>	Micobactéria da tuberculose ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )
<b>p</b>	Nível de significância estatística
<b>OD</b>	Olho direito
<b>OE</b>	Olho esquerdo
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SVKH</b>	Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada
<b>UAE</b>	Uveíte Autoimune Experimental
<b>UCE</b>	Uveíte Crônica Experimental
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

***V<sub>max</sub>*** Amplitude máxima

**$\mu\text{g}$**  Micrograma

**$\mu\text{V}$**  Microvolt

# Sumário

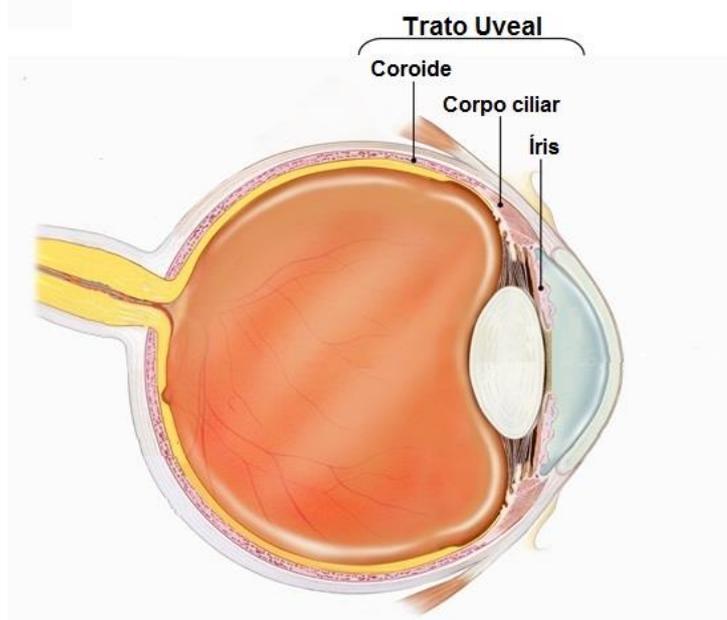
<b>I Introdução</b> .....	26
1.1 Diferentes classificações das uveítes .....	29
1.1.1 Classificação Anatômica .....	29
1.1.2 Classificação de acordo com o curso clínico .....	29
1.1.3 Classificação como uni ou bilateral .....	30
1.1.4 Classificação etiológica .....	30
1.1.5 Classificação clínica .....	30
1.2 Sinais e Sintomas das uveítes .....	30
1.3 Modelos de Uveítes .....	31
1.4 Uveítes não infecciosas .....	32
1.5 Tratamentos das Uveítes .....	33
1.5.1 Corticosteroides .....	33
1.5.2 Micofenolato de mofetila .....	33
1.5.3 Micofenolato de mofetila em uveítes .....	35
1.6 Farmacocinética .....	36
1.7 Morfologia da retina .....	36
1.8 Eletrorretinograma .....	38
<b>II Justificativa</b> .....	41
2.1 Animal Experimental .....	42
<b>III Objetivos</b> .....	44
3.1 Geral .....	44
3.2 Específicos .....	44
<b>IV Materiais e Métodos</b> .....	45
4.1 Desenho Experimental .....	45
4.2 Preparação do ácido micofenólico .....	45
4.3 Preparação Animal .....	45
4.3.1 Anestesia e sacrifício dos animais .....	47
4.3.2 Injeções intravítreas .....	47
4.4 Exames Clínicos .....	48
4.5 Eletrorretinograma .....	49
4.6 Análise Morfológica .....	51
4.6.1 Cortes Histológicos .....	52

4.6.2 Hematoxilina e Eosina (HE) .....	52
4.6.3 Imunohistoquímica .....	53
4.6.3.1 Imunofluorescência para a proteína glial ácida fibrilar (GFAP)..	54
4.7 1ª Etapa - Indução da UCE .....	55
4.8 2ª Etapa - Estudo de toxicidade do MPA .....	56
4.9 3ª Etapa - Estudo do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE.....	57
4.10 Análise Estatística .....	58
<b>V Resultados</b> .....	60
5.1 Modelo de uveíte crônica experimental .....	60
5.1.2 Achados clínicos .....	60
5.1.3 Eletroretinograma .....	63
5.1.4 Análise Morfológica .....	71
5.1.4.1 Hematoxilina e Eosina (HE) .....	71
5.1.4.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP .....	71
5.2 Estudo de toxicidade do MPA .....	72
5.2.1 Eletroretinograma .....	72
5.2.2 Análise Morfológica.....	78
5.2.2.1 Hematoxilina e Eosina (HE) .....	78
5.2.2.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP .....	79
5.3 Modelo de Uveíte tratado com MPA .....	81
5.3.1 Achados clínicos .....	81
5.3.2 Eletroretinograma .....	84
5.3.3 Análise Morfológica .....	93
5.3.3.1 Hematoxilina e Eosina (HE) .....	93
5.3.3.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP .....	93
5.4 Avaliação do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE .....	94
5.4.1 Achados Clínicos – Grupo tratado x não tratado .....	94
5.4.2 Eletroretinograma .....	95
5.4.3 Análise Morfológica.....	106
5.4.3.1 Hematoxilina e Eosina (HE) .....	106
5.4.3.2 Imunohistoquímica para a proteína GFAP .....	106
<b>VI Discussão</b> .....	108
6.1 Modelo de Uveíte Crônica Experimental .....	108
6.2 Estudo de toxicidade do MPA .....	110

6.3 Modelo de Uveíte Crônica Experimental tratado com MPA .....	112
6.4 Avaliação do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de uveíte crônica..	113
<b>VII Conclusões</b> .....	117
<b>VIII Referências Bibliográficas</b> .....	118
Anexos.....	130

## I Introdução

O termo uveíte é utilizado para nomear inflamações do trato uveal (fig.1), que é formado pela íris, corpo ciliar e coroide, e pelos tecidos adjacentes (retina, nervo óptico e esclera), que frequentemente também são acometidos pela inflamação. A inflamação é uma resposta do organismo a uma agressão. Porém, não somente a inflamação, como também o tratamento da mesma, podem apresentar riscos aos tecidos afetados e aos tecidos adjacentes (Meira, Rocha & Oréfica, 2005).



**Figura 1** – Esquema mostrando um corte longitudinal de um olho humano e suas estruturas, em destaque o trato uveal, composto pela coroide, corpo ciliar e íris (imagem modificada de: <http://www.nei.nih.gov/health/uveitis/uveitis.asp>, acessado em agosto/2014).

As uveítes acometem ambos os sexos e todas as faixas etárias, mas principalmente indivíduos entre a 3ª e a 5ª décadas de vida (Gomi, 1992; Darrel et al., 1962) - a fase mais produtiva economicamente. É uma doença crônica e uma das principais causas de cegueira no mundo. Tanto a inflamação intraocular quanto as complicações decorrentes provocam perda severa da visão. O edema macular cistoide é a principal causa de perda visual em pacientes (Durrani et al., 2004; Lardenoye, Van & Rothova, 2006). Em um levantamento realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, 65% dos portadores de uveíte apresentaram complicações que levaram à perda da acuidade visual (Gouveia et al., 2004). Nos Estados Unidos da América (EUA), as uveítes somam cerca de 150 mil casos por ano e são responsáveis por cerca de 10% das perdas visuais severas (Gritz & Wong, 2004) e estima-

se que cerca de 10% dos casos de cegueira nos EUA sejam causados por uveíte, ou seja, que cerca de 30.000 americanos por ano se tornem legalmente cegos devido à uveíte (Nussenblatt, 1990; Suttorp-Schulten & Rothova, 1996).

O comprometimento ocular pode ser isolado ou associado a doenças sistêmicas infecciosas, como tuberculose, sífilis e toxoplasmose, e doenças não infecciosas, como sarcoidose, doença de Behçet, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (SVKH). Entretanto cerca de 50% dos casos são idiopáticos (Forrester, 1991). A incidência e prevalência das uveítes podem variar de acordo com fatores raciais, genéticos, geográficos e ou sociais (De Smet et al., 2011). Em um estudo epidemiológico retrospectivo de 3.310 casos, realizado por Fernandes e Oréfice (1996), as uveítes não infecciosas difusas mais frequentes foram: SVKH (4%), doença de Behçet (3%) e oftalmia simpática (1%). Em outro estudo retrospectivo realizado também no Brasil, Gomi e colaboradores (1997) avaliaram 744 pacientes diagnosticados com uveítes. E as uveítes mais frequentes foram: SVKH (4%), doença de Behçet (4%) e oftalmia simpática (menos de 1%).

A uveíte é o principal diagnóstico em indivíduos que frequentam instituições para reabilitação visual (Kara-José et al., 1988; Alves, 1985), sugerindo que a dificuldade em controlar o processo inflamatório intraocular e as complicações da inflamação prolongada representam um grande impacto na saúde pública. A inflamação crônica causada pela uveíte aumenta a produção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, serotonina, bradicinina, histamina, leucotrienos, radicais livres e fator do crescimento do endotélio vascular (VEGF – *vascular endothelial growth factor*), que fazem parte da fisiopatogênese das uveítes e resultam em complicações que contribuem para a piora da acuidade visual (Nussenblatt, 1986; Freeman, Matos & Pavesio, 2001).

As uveítes classificadas como endógenas, possivelmente são autoimunes, devido à linhagem de linfócitos T específicos para antígenos da retina que não possuem auto tolerância (Caspi, 1999) e possivelmente podem ser desencadeadas por um estímulo exógeno em pessoas com predisposição genética (Nussenblatt, 2004).

Os corticosteroides são as drogas de primeira escolha para o tratamento das uveítes não infecciosas, podendo ser administrados por via oral, tópica ou intraocular (Olivalves, Gonçalves & Orefice, 2005; Taylor et al., 2010). Nos casos muito graves nos quais o corticosteroide não é capaz de controlar o processo inflamatório ocular, ou nos quais surgem efeitos colaterais devido ao tratamento prolongado, há necessidade do uso de outras drogas imunossupressoras. Os imunossupressores mais utilizados são os agentes antimetabólitos, inibidores de linfócitos T e agentes alquilantes. No entanto, todos têm efeitos colaterais graves

que podem levar à necessidade de diminuição da dose ou até mesmo suspensão da droga, o que pode acarretar perda visual (Jabs, Rosenbaum & Foster, 2000; Kempen et al., 2009).

O micofenolato de mofetila (MMF - mycophenolate mofetil) é um imunossupressor utilizado no tratamento da rejeição de órgãos transplantados (Wiesner et al., 2001, 2006; Warrens, 2000) e de doenças infecciosas. O MMF é uma pró-droga, convertida no fígado em ácido micofenólico (MPA - *mycophenolic acid*), que é a droga ativa. O MPA provoca a diminuição da proliferação celular, a inibição da geração de linfócitos T citotóxicos, a diminuição da produção de anticorpos por linfócitos b e a diminuição da adesão e migração leucocitária (Allison & Eugui, 2000). Existem evidências clínicas e experimentais da eficácia do MMF no tratamento de uveítes (Baltatzis et al., 2003; Thorne et al., 2005), o que faz com que seja considerado como uma droga com potencial no tratamento de uveítes. Porém, o uso do MMF causa efeitos colaterais que fazem com que cerca de 10 a 20% dos pacientes abandonem o tratamento (Baltatzis et al., 2003; Sobrin, Christen & Foster, 2008).

A gravidade das uveítes, a dificuldade no controle da inflamação ocular com medicações sistêmicas e os efeitos colaterais do uso prolongado de imunossupressores nos levaram a formular a hipótese de que a administração intravítrea de MPA possa minimizar algumas dessas limitações. Como o MPA é a droga imunossupressora ativa, enquanto o MMF é a pró-droga que é convertida em MPA no fígado, optou-se por injetar diretamente o MPA na cavidade vítrea. A administração intravítrea de drogas é cada vez mais frequente na oftalmologia, e nos últimos anos, o procedimento ganhou muita popularidade com a injeção de corticoide de longa duração e drogas anti-VEGF para o tratamento de doenças proliferativas da retina (Gragoudas et al., 2004; D'amico et al., 2006; Iturralde et al., 2006; Oshima et al., 2006), como degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética.

No entanto, não existem muitos trabalhos realizados até o momento com MPA. Nosso grupo avaliou as alterações funcionais de diferentes doses de MPA (0,005, 0,05, 0,2 e 1mg/mL) após injeção intravítrea em coelhos (Aguiar, 2011; Gasparin et al., 2014) e a farmacocinética do MPA no vítreo (Gasparin et al., 2014). Um outro estudo avaliou um implante biodegradável de microdispersão de MPA (200ug) em um modelo de uveíte experimental (Ioshimoto, 2015), Todos os trabalhos utilizaram coelhos albinos New Zealand. O presente trabalho vem complementar os trabalhos já realizados pelo nosso grupo, ao testar o efeito da injeção intravítrea de MPA em um modelo de uveíte crônica experimental (UCE). Utilizaremos um modelo de UCE, em coelhos albinos New Zealand, por meio de um protocolo já descrito por Dong e colaboradores (2006), mesmo modelo utilizado por Ioshimoto (2015) que consiste na indução de uveíte através da administração intravítrea de

micobactéria causadora da tuberculose (MT – *Mycobacterium tuberculosis*). A única diferença entre o modelo utilizado no presente trabalho e o descrito por Dong (2006), é que não realizamos a vitrectomia nos olhos dos coelhos, devido a uma limitação técnica.

Embora doses próximas de MPA tenham sido testadas por Aguiar (2011) e Gasparin e cols. (2014) em olhos de coelhos albinos New Zealand, os equipamentos de ERG utilizados neste e naqueles estudos são diferentes. Como este estudo também teve por objetivo avaliar os efeitos terapêuticos da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE, decidimos reproduzir o estudo eletrorretinografico com as doses utilizadas.

## **1.1 Diferentes classificações das uveítes**

As uveítes podem ser classificadas de diferentes formas, de acordo com as estruturas acometidas, progressão, uni ou bilateralidade, etiologia e aspecto clínico.

### **1.1.1 Classificação Anatômica**

Segundo o Grupo Internacional de Estudos das Uveítes (IUSG - *International Uveitis Study Group*), as uveítes, de acordo com a área acometida, podem ser classificadas em uveíte anterior, intermediária, posterior ou difusa. Tal classificação foi estabelecida em 1987. As uveítes anteriores acometem principalmente o segmento anterior (também conhecido como irite, ciclite anterior, ou ceratouveíte). Neste tipo de uveíte é comum apresentar hiperemia conjuntival, *flare* (presença de proteínas no humor aquoso) e células na câmara anterior, precipitados ceráticos e alterações da íris, podendo ser observada também discreta celularidade do corpo vítreo anterior. As uveítes posteriores (também conhecidas como coroidite, coriorretinite, retinocoroidite,) ocorrem na retina e na coroide, e podem gerar acometimento focal. As uveítes intermediárias (ciclite, iridociclite, pars planite) acometem o vítreo e a retina periférica, possuindo em geral uma progressão crônica e podem provocar a formação de agregados celulares inflamatórios no vítreo inferior, além do acúmulo de células inflamatórias ao longo da pars plana e ora serrata. As uveítes difusas (também chamadas de panuveítes) em geral acometem todas as estruturas do olho, estando associadas a uma baixa da visão considerável (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

### **1.1.2 Classificação de acordo com o curso clínico**

As uveítes também podem ser classificadas de acordo com a sua progressão, em crônicas ou agudas. As uveítes crônicas duram mais de 3 meses, apresentando sintomas

contínuos ou reincidentes. As uveítes agudas possuem um início abrupto e em geral não duram mais de 3 meses (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

### **1.1.3 Classificação como uni ou bilateral**

A maioria das uveítes acomete os dois olhos, mas o acometimento dos dois olhos pode não ser simultâneo. A classificação em uni ou bilateral é importante para o diagnóstico etiológico, mesmo após meses ou anos de doença (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

### **1.1.4 Classificação etiológica**

Podem ser classificadas como infecciosas e não infecciosas. As não infecciosas são também chamadas de autoimunes, podem ser provocadas por agentes externos ao olho ou por reação imune. As inflamações do trato uveal podem ainda ser resultantes de traumas cirúrgicos ou acidentais (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

### **1.1.5 Classificação clínica**

Na avaliação clínica são classificadas em granulomatosa e não granulomatosa. As uveítes granulomatosas apresentam precipitados na córnea, que representam acúmulo de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos. Em geral são grandes indicativos de processos inflamatórios insidiosos, crônicos e reincidentes. Os precipitados ceráticos não granulomatosos, são finos e brancos, formados por neutrófilos, linfócitos e pigmentos. Em geral, são encontrados em processos agudos (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

## **1.2 Sinais e Sintomas das uveítes**

Uma boa anamnese e um exame clínico criterioso são importantes para o diagnóstico correto e auxiliam em um diagnóstico diferencial. Os sintomas comuns às uveítes são dor, fotofobia, embaçamento visual, além de sintomas sistêmicos associados.

A dor é mais comum na fase aguda das iridociclites associadas à uveítes anteriores, posteriores e difusas, sendo em geral secundária ao espasmo do músculo ciliar. Como o corpo ciliar é inervado pelo nervo trigêmeo, a dor pode atingir toda a área do nervo além do próprio olho. O que provoca tais espasmos é uma inflamação que pode ocorrer no corpo ciliar ou em outros locais. A fotofobia, que é o desconforto causado pela exposição à luz, está presente na irite, iridociclite e ceratite e, assim como no caso da dor, surge devido aos espasmos ciliares.

A irritação ocorre através de um reflexo axonal, movimentação da íris e corpo ciliar durante a constrição pupilar gerada pela luz. Colírios cicloplégicos são usados tanto para o alívio da dor quanto da fotofobia, paralisando o corpo ciliar e o lacrimejamento que ocorre em decorrência da irritação do nervo trigêmeo (Meira, Rocha & Oréfice, 2005).

O embaçamento visual é pouco frequente na uveíte anterior ou intermediária, nas quais a visão permanece com boa qualidade. Nas uveítes posteriores ou difusas, ou nas quais existam alterações maculares, a acuidade visual pode diminuir.

Quanto aos sintomas sistêmicos associados, a grande maioria dos pacientes que os apresentam, são encaminhados para outras especialidades médicas para o tratamento efetivo do que está gerando a uveíte. Os sintomas são diversos, como por exemplo, cefaleia, surdez neurossensorial, psicose, fraqueza, vitiligo, eritema nodoso, icterícia, úlceras orais e genitais, estomatite, diarreia entre outros, que podem ser associados a uma lista de diversas doenças sistêmicas que envolvem o olho e outros órgãos (Figueroa, Soares & Oréfice, 2005).

### **1.3 Modelos de Uveítes**

Existem vários modelos experimentais de uveíte e cada um apresenta uma característica que o faz conveniente para o estudo de aspectos da doença (Caspi, 2006). A escolha do modelo e do animal é influenciada pelas necessidades do estudo. O coelho, por exemplo, tem um olho relativamente grande, o que o torna um modelo atraente para o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas locais, como injeções intravítreas e implantes de liberação lenta de droga (Gery et al., 2002).

A falta de linhagens celulares bem caracterizadas e estudadas torna a grande maioria dos modelos limitada para estudos básicos de mecanismos imunológicos. Por isso, ratos tem sido um modelo útil de forma geral, pois são animais melhor estudados do ponto de vista imunológico e imunogenético (Gery et al., 2002). Dessa forma, para estudos sobre mecanismos básicos, o rato é o modelo mais utilizado, pois possui diversas linhagens geneticamente modificadas, tornando possível fazer em ratos o que não é possível em outras espécies (Caspi, 2006).

Porém, outras espécies de animais já foram utilizadas para indução de uveíte, com diferentes finalidades, como coelhos (Biegel, 1951; Bullington & Waksman, 1958; Rosenbaun & Boney, 1992; Ohia, Mancino & KulkarnI, 1992; Rosenbaun & Boney, 1992; Jigao et al., 1993; Witmer, 1995; Goldblum, 2007), camundongos (Caspi, 1988; Brito, 1999; Rosenziweig, 2008; Agarwal & Caspi, 2004; Caspi et al., 1990; Kogiso et al., 1992; Caspi et al., 2008), e cavalos (Deeg, 2008; Deeg et al., 2004; Deeg et al, 2002; Hauck et al., 2007).

Para simular diferentes tipos de uveíte humana, são utilizadas diferentes preparações antigênicas. O primeiro modelo de uveíte autoimune foi induzido através de imunização de cobaias (porco da Índia) com extratos da retina e foi mais tarde refinado por purificação de um agente solúvel, o agente S (arrestina), a partir da camada de fotorreceptores. O resultado foi a inflamação da retina e coroide, caracterizando uma uveíte difusa severa. Esse modelo foi estendido para outras espécies, utilizando outros antígenos, e ficou conhecido como uveíte autoimune experimental (UAE) (Gery et al., 2002).

A indução da UAE é feita por imunização do animal com um antígeno. O antígeno deve ser emulsificado em um adjuvante, que é uma substância que estimula a resposta imune para imunização inata. Todos os modelos autoimunes, independentemente da preparação antigênica utilizada para indução, parecem partilhar mecanismos imunológicos essenciais. Isto inclui a capacidade de ser adaptativamente transferidos com as células T, mas não com soro, o que confere um perfil de resposta dominante de citocinas Th1 e inibição por tratamento com ciclosporina (Gery et al., 2002; Agarwal & Caspi, 2004, 2006).

Um outro modelo de UAE utilizado é o chamado modelo “humanizado”. Este modelo é desenvolvido em ratos transgênicos com expressão modificada do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) de classe II, passando a expressar antígenos transgênicos humanos de classe II (Caspi, 2006; Szpak et al., 2001; Pennesi et al., 2003).

Um modelo muito utilizado para o estudo da uveíte posterior é UAE, enquanto a uveíte induzida por endotoxina é um modelo amplamente utilizado para uveíte anterior. Juntos, estes dois modelos são responsáveis pela maioria dos estudos com modelos experimentais de uveíte (Caspi, 2006).

Algumas abordagens terapêuticas requerem a utilização de modelos em animais que possuem um olho grande, como uma cobaia ou um coelho (que é o caso do presente trabalho). No entanto, por causa da escassez de linhagens puras, reagentes imunológicos e informação genética disponível para a maioria das espécies, acaba limitando o estudo dos mecanismos básicos envolvidos (Caspi, 2006, 2011).

#### **1.4 Uveítes não infecciosas**

A etiopatogenia das uveítes não infecciosas, ou autoimunes, ainda não foi completamente elucidada. A maior parte do que se sabe hoje sobre os mecanismos envolvidos na inflamação ocular e seu desenvolvimento, foi conseguida graças a modelos animais, e o modelo mais utilizado é o UAE, no qual o processo inflamatório é induzido com o uso de um

antígeno de origem retiniana, como o antígeno-S e a proteína ligadora de retinoide do interfotorreceptor (IRBP - *Interphotoreceptor Retinoid-binding Protein*), por exemplo. Mas antígenos de origem não retiniana e de origem não ocular, como exotoxinas bacterianas, também são utilizados (Adamus & Chan, 2002; De Smet & Chan, 2001; Caspi, 2011). Nesse tipo de modelo a uveíte é desencadeada por uma resposta inflamatória mediada por linfócitos T, principalmente as células CD4+, que reconhecem os antígenos na presença das células apresentadoras de antígenos juntamente com as moléculas do MHC de classe II (Caspi, 2001).

## **1.5 Tratamento das Uveítes**

### **1.5.1 Corticosteroides**

Os corticosteroides são a droga de primeira linha, escolhida para o tratamento de uveítes e podem ser administrados por via tópica, oral, endovenosa, peri ou intraocular, de acordo com o local e da severidade da inflamação. Os efeitos colaterais mais comuns decorrentes do uso oral de corticoides são hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, obesidade central, úlcera gastrointestinal, osteoporose, distúrbios do humor e susceptibilidade a infecções (Olivalves, Gonçalves & Orefice, 2005).

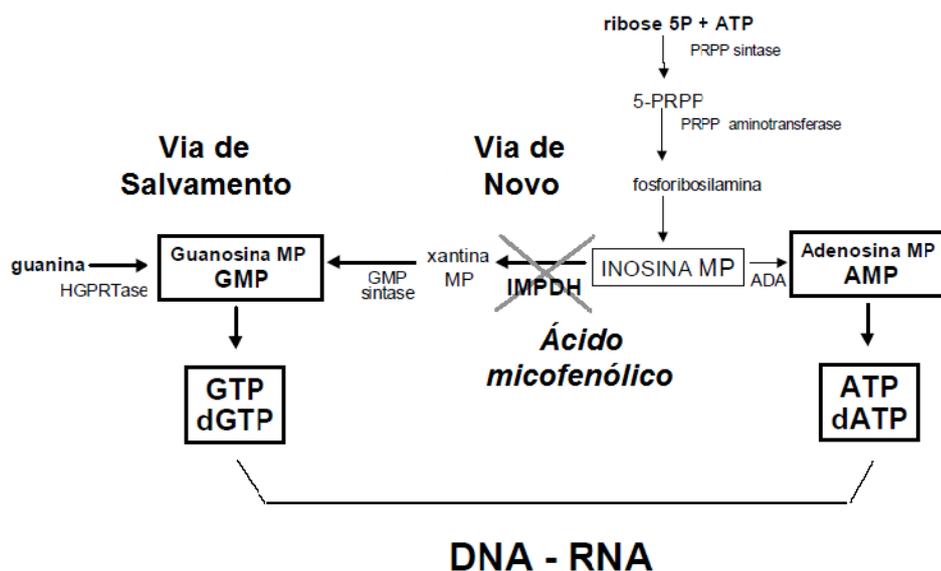
O uso endovenoso de altas doses de corticoide pode ser necessário em casos de acometimento bilateral agudo e severo de origem não infecciosa, ou com risco iminente de perda visual. Outra forma de administração é a periocular. Porém, há desvantagens, como a necessidade de várias injeções e possíveis complicações oculares associadas ao procedimento (Kuo et al., 2005), como perfuração do bulbo ocular, aumento da pressão ocular e afilamento escleral. A injeção intravítrea de corticoide é uma alternativa para o tratamento de uveítes não infecciosas, sendo indicada geralmente para pacientes que não respondem bem à terapia sistêmica ou não toleram os efeitos colaterais das medicações.

### **1.5.2 Micofenolato de mofetila**

O MMF é um imunossupressor utilizado no tratamento da rejeição de órgãos transplantados (Wiesner et al., 2001, 2006; Warrens, 2000) e de doenças autoimunes, como vasculites (Boumpas et al., 2000), lúpus eritematoso sistêmico (Chan et al., 2000), psoríase (Zhou et al., 2003), artrite reumatoide (Goldblum, 1993) e síndrome nefrótica (Schwarzs, 2001). Existem evidências experimentais e clínicas de sua eficácia no tratamento de diversas uveítes, o que o torna uma droga importante no tratamento dessa condição ocular severa e debilitante.

O MMF é uma pró-droga. Após a administração oral, é rapidamente convertido para o MPA, que é o imunossupressor ativo. O MPA é um potente inibidor não competitivo da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH - *Enzyme Inosine Monophosphate Dehydrogenase*), que é uma enzima chave da via de novo da biossíntese de purinas (Allison, 1993; Allison & Eugui, 1999; Noronha et al.,1997). Existem duas vias de síntese das purinas: a via de novo e a de salvamento (fig. 2).

A via de novo é utilizada por células mononucleares e por isso seu efeito imunossupressor se dá principalmente sobre linfócitos T e B. Inibindo a IMPDH, o MPA leva ao bloqueio da síntese de nucleotídeos de guanosina (GTP – guanosina trifosfato e dGTP - desoxiguanosina), que são substratos para síntese de DNA (Ácido Desoxirribonucleico – *Deoxyribonucleic Acid*) e RNA (Ácido Ribonucleico – *Ribonucleic Acid*). Com isso, há inibição da produção de purinas e diminuição da taxa de proliferação celular. Além de inibir a geração de linfócitos T citotóxicos, o MPA inibe a produção de anticorpos por linfócitos B19, 20 e induz a diminuição da adesão e migração leucocitária. Um fato primordial é que os linfócitos T e B dependem ativamente da vida de novo da síntese de purinas para sua proliferação, o que configura uma potente inibição da proliferação linfocitária em situações de ativação imunológica em que se faz uso do MMF (Allison, 1993; Allison & Eugui, 1999; Noronha et al.,1997).



**Figura 2** – Metabolismo das purinas, via de novo e de salvamento (imagem modificada de Noronha et al.,1997).

Os principais efeitos colaterais associados ao uso do MMF estão relacionados ao trato gastrointestinal (diarreia, náuseas e vômitos) e às alterações hematológicas (anemia e leucopenia). Um estudo multicêntrico realizado nos EUA também mostrou uma discreta tendência ao desenvolvimento de linfomas (Noronha et al., 1997; Sollinger, 1995). O MMF tem efeito teratogênico em animais (ratos e coelhos) (Tendron et al., 2002, Noronha et al., 1997); embora esse efeito não tenha sido demonstrado em humanos pela falta de estudos controlados sobre efeitos teratogênicos causados pelo MMF em gestantes, não se pode excluir a possibilidade de dano fetal, dessa forma aconselha-se a contracepção durante o seu uso (Noronha et al., 1997, Anderka et al., 2009). A excreção dos metabólitos inativos do MPA é feita pelo rim. Portanto, o uso em portadores de lesão renal deve ser muito criterioso e a dose administrada deve ser ajustada conforme a função renal.

### **1.5.3 Micofenolato de mofetila em uveítes**

A uveíte autoimune experimental (UAE) é um dos modelos animais de uveíte difusa autoimune (endógena) mais estudados e é muito utilizado para avaliar a eficácia de diversos imunossuppressores (Mochizuki et al., 1985; Whitcup & Nussenblatt, 1993). O primeiro estudo do uso de MMF em uveítes foi realizado em um modelo de UAE, quando Chanaud e cols. (1995) induziram UAE em ratos através da imunização com antígeno-S da retina e trataram os animais com doses diárias de 30 mg/kg de MMF por via oral durante 13 dias. Os autores demonstraram que o MMF inibiu o desenvolvimento de UAE nos animais tratados, atuando em pelo menos dois processos: inibição da proliferação de linfócitos e diminuição da síntese de moléculas de adesão.

Estudos clínicos mostraram que o uso sistêmico do MMF apresenta bons resultados no tratamento de uveítes. A introdução da droga como primeira opção terapêutica ou como adjuvante de corticosteroides e outros imunossuppressores, cursou com melhora da acuidade visual, controle da inflamação ocular e diminuição da dose dessas outras drogas (Kilmartin et al., 1998; Larkin & Lightman, 1999; Lau et al., 2003; Baltatzis et al., 2003). Embora nenhum desses estudos seja prospectivo e controlado, o conhecimento da história natural das uveítes e a ausência de resposta terapêutica a outros imunossuppressores mostram que o MMF é uma opção importante para o tratamento das uveítes. No entanto, 10 a 20% dos pacientes não suportam os efeitos colaterais das doses necessárias para o controle da inflamação ocular e precisam suspender o seu uso (Baltatzis et al., 2003; Thorne et al., 2005).

## 1.6 Farmacocinética

O conhecimento sobre a farmacocinética da droga utilizada, após ser injetada na cavidade vítrea é importante para determinar a meia-vida e taxas de absorção sistêmica da droga. Para tanto, é necessário determinar as concentrações da droga presente no vítreo em diferentes intervalos de tempo, o que pode ser feito por ELISA (Ensaio Imunoenzimático - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Fialho et al., 2006; Giansanti et al., 2008; Gaudreault et al., 2007) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Khoshsorur & Erwa, 2004; Bahrami & Mohammadi, 2006; Watson, 2004).

Gasparin e colaboradores (2014), realizaram o método de CLAE e concluíram que a meia vida do MPA no vítreo de coelhos albinos é de cerca de 5 dias e o mesmo permanece detectável durante 29 dias, a dose avaliada foi de 1mg/mL. Também foram analisadas amostras de sangue periférico de 16 animais, utilizando o mesmo método utilizado no vítreo, onde não foi detectada a presença de MPA. Este resultado nos leva a inferir que a droga não ultrapassa a barreira hematoretiniana, ficando restrita dentro do olho, ou que a quantidade é muito pequena, a ponto de não ser detectada pelo exame realizado. A ausência de MPA na circulação sanguínea periférica corrobora a ideia de que injeções intravítreas de MPA, diminuiriam ou suprimiriam os efeitos colaterais sistêmicos causados pela administração por via oral da droga.

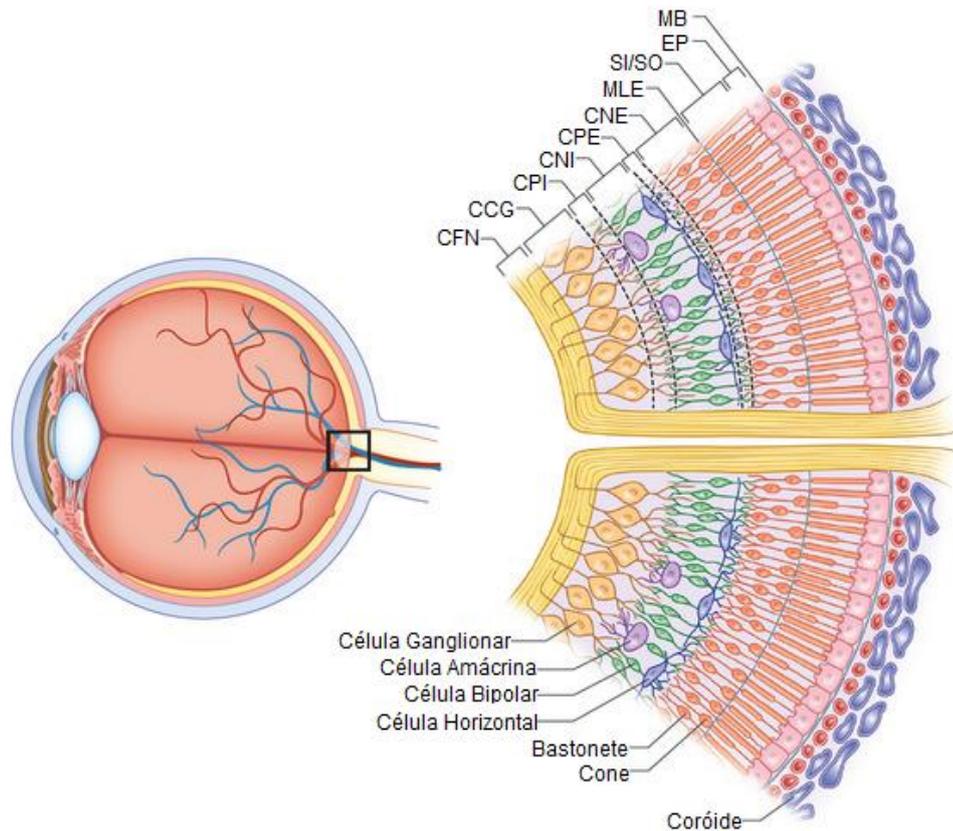
Entretanto, é necessário saber como essa administração intravítrea afeta a morfologia da retina e sua funcionalidade. Podem ser detectados efeitos tóxicos? Há alteração de funções da retina? Uma breve descrição da morfologia da retina fornecida abaixo apresenta as suas principais estruturas, a serem investigadas no contexto do presente trabalho. Em seguida é apresentada uma descrição de um indicador da funcionalidade da retina - o eletrorretinograma – extensamente usado em estudos experimentais de drogas terapêuticas (Perlman, 2009).

## 1.7 Morfologia da retina

A retina (fig. 3), camada mais interna do olho, onde é iniciado o processamento dos estímulos luminosos, é parte integrante do sistema nervoso central (SNC). Contém cinco tipos principais de neurônios que se comunicam por meio de um intrincado padrão de conexões, mas com um arranjo anatômico em camadas (Cajal, 1893).

A retina está dividida em 10 camadas: (1) epitélio pigmentado, (2) camada de fotorreceptores cones e bastonetes (segmentos externos e internos), (3) membrana limitante externa (MLE), (4) camada nuclear externa (CNE), com os núcleos dos fotorreceptores, (5) camada plexiforme externa (CPE), contendo as sinapses das células bipolares e horizontais

com os fotorreceptores, (6) camada nuclear interna (CNI) dos corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas, (7) camada plexiforme interna (CPI), contendo as conexões das células ganglionares com as células bipolares e amácrinas, (8) camada de células ganglionares (CCG), (9) camada de fibras nervosas, contendo os axônios das células ganglionares, passando para o nervo óptico, (10) membrana limitante externa.



**Figura 03** – Esquema ilustrando a organização celular da retina e suas camadas (imagem: modificado de Browning D, J. (2012).

Os cinco tipos principais de células nervosas na retina organizam-se em estágios sucessivos: neurônios de primeira ordem (fotorreceptores cones e bastonetes), que fazem a transdução da luz em sinal neural, enviando neurotransmissores para os de segunda ordem (células horizontais e bipolares), os quais por sua vez se comunicam com os de terceira ordem (células amácrinas e ganglionares). Uma exceção a essa arquitetura funcional é constituída pelas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, que são ativadas diretamente pela luz (Provencio et al., 2000; Yingbin et al., 2005; Dustim et al., 2007; Gamlin et al., 2007; Ecker et al., 2010).

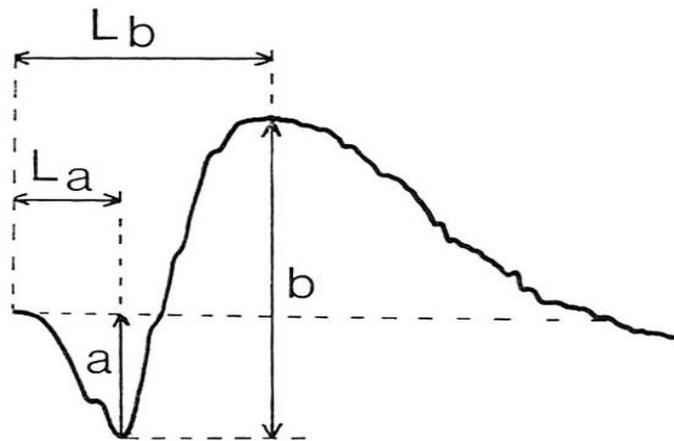
Em estudos do efeito de administração intravítrea de MPA, Gasparin e colaboradores (2014) e Ioshimoto (2015) avaliaram a integridade das camadas retinianas por meio da técnica de HE (hematoxilina e eosina), Ioshimoto ainda utilizou a técnica de imunohistoquímica para proteína glial ácida fibrilar (GFAP). Outros trabalhos também fizeram uso de técnicas histológicas em modelos de uveítes (Avichezer et al., 2000; Zhang, 2000; Dick et al., 1994; Géhl et al., 2014; Agarwal et al., 2012; Commodaro et al., 2010).

### **1.8 Eletrorretinograma**

Além de poderem afetar a integridade morfológica da retina, a administração de drogas terapêuticas pode afetar a funcionalidade da retina. Para esta avaliação estudos recorrem a um indicador consagrado - o eletrorretinograma (ERG) - para o qual existem padrões de normalidade em seres humanos e diversas espécies animais (Marmor, 2009). O ERG é um registro da atividade elétrica da retina em resposta à luz, que pode ser captada na superfície da córnea, com auxílio de um eletrodo, tendo sido, primeiramente, demonstrado em 1865, por Holmgren, em olho de rã (Perlman, 2013).

Esta resposta elétrica da retina é uma resposta de massa, obtida através da somatória das respostas dos diferentes tipos celulares da retina, assim como das células do epitélio pigmentado. Quando um flash de luz atinge o olho adaptado ao escuro, estimulando toda a retina, a resposta elétrica resultante é constituída por uma onda bifásica com um componente negativo (onda-a) e um positivo (onda-b) (Fig. 4), juntamente com potenciais oscilatórios em sua fase ascendente. Através de tais respostas e análise de seus componentes (amplitude e latência) é possível avaliar a integridade funcional da retina.

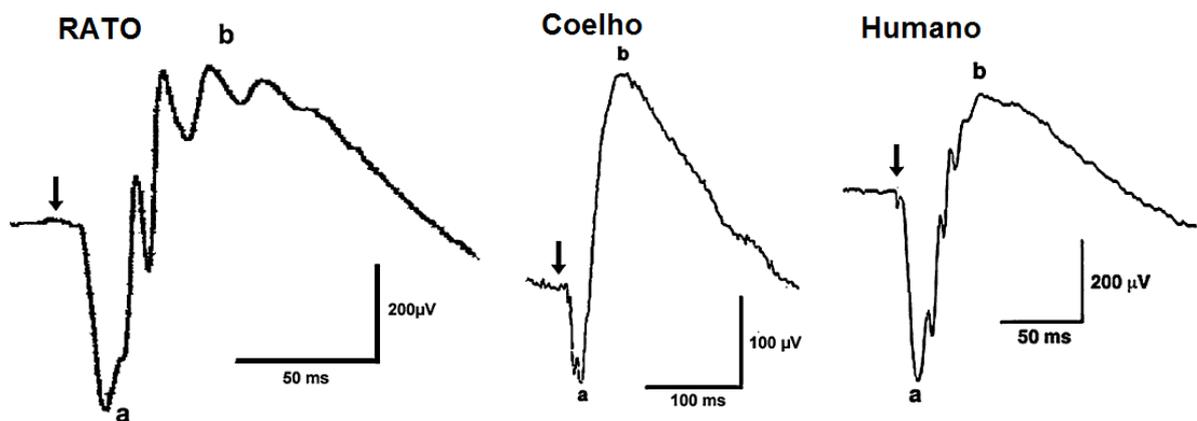
A onda-a é proveniente da hiperpolarização da membrana dos fotorreceptores (cones e bastonetes) e a onda-b resulta da atividade pós-sináptica aos fotorreceptores na camada nuclear interna (células bipolares e células de Müller). Essas ondas são caracterizadas por elementos temporais (latência e duração) e bioelétricos (medida da amplitude) (Marmor & Zrenner, 1995; Marmor et al., 2004, 2009; Perlman, 2013).



**Figura 4** – Ondas a e b do eletrorretinograma: a – amplitude da onda a; b – amplitude da onda b; La – latência da onda a e Lb – latência da onda b (imagem: <http://webvision.med.utah.edu>, acessado agosto/2014).

O ERG de campo total é o teste mais utilizado em experimentação animal para avaliação funcional da retina (Perlman, 2009; Peyman, Lad & MoshfeghI, 2009; Penha et al., 2010).

O padrão de ondas eletrorretinográficas encontrado em ratos e coelhos é similar ao humano, apresentando apenas diferenças nos valores de amplitude e tempo implícito das ondas a e b (fig.5).



**Figura 05** – Respostas escóticas de um rato albino, um coelho albino e ser humano. São similares, porém, diferem em amplitude e latência (Modificado de Perlman, 2009).

A análise do ERG pode ser realizada através da comparação entre as amplitudes e latências das ondas-a e b sob diferentes intensidades de estímulos luminosos e após a adaptação ao claro e ao escuro.

Em estudos recentes sobre toxicidade retiniana de drogas como o adalimumabe (Manzano et al., 2008, 2011), etanercepte (Kivilcim et al., 2007) e infliximabe (Giansanti et al., 2008), a avaliação funcional retiniana foi baseada na comparação da amplitude da onda-b entre os olhos que receberam injeção intravítrea da droga e os que receberam somente o veículo.

## II Justificativa

Além das questões éticas, que regulamentam pesquisas clínicas em seres humanos, existem outras vantagens que justificam o uso de modelos animais em estudos que avaliam toxicidade de drogas. A experimentação animal nos permite testar diferentes doses para determinar a dose tóxica e a dose segura, além de podermos testar separadamente diferentes componentes da formulação da droga no intuito de identificar o componente tóxico, nos permitindo também fazer uso de outras técnicas como exames eletrofisiológicos, histologia e biologia molecular e celular (Perlman, 2009).

A uveíte é uma doença crônica e uma das principais causas de cegueira no mundo. Tanto a inflamação intraocular quanto as complicações decorrentes provocam perda severa da visão. Sendo o principal diagnóstico em indivíduos que frequentam instituições para reabilitação visual (Kara-José et al., 1988; Alves, 1985), sugerindo que a dificuldade em controlar o processo inflamatório intraocular e as complicações da inflamação prolongada representam um grande impacto na saúde pública. Em casos muito graves, nos quais o corticosteroide não é capaz de controlar o processo inflamatório ocular, ou nos quais surgem efeitos colaterais devido ao tratamento prolongado, há necessidade do uso de outras drogas imunossupressoras. Entretanto, todos têm efeitos colaterais graves que podem levar à necessidade de diminuição da dose ou até mesmo suspensão da droga, o que pode acarretar perda visual (Jabs, Rosenbaum & Foster, 2000; Kempen et al., 2009).

A gravidade das uveítes, a dificuldade no controle da inflamação ocular com medicações sistêmicas e os efeitos colaterais do uso prolongado de imunossupressores nos levaram a formular a hipótese de que a administração intravítrea de MPA possa minimizar algumas dessas limitações.

A administração intravítrea de drogas é cada vez mais frequente na oftalmologia, e nos últimos anos, o procedimento ganhou muita popularidade com a injeção de corticoide de longa duração e drogas anti-VEGF para o tratamento de doenças proliferativas da retina (Gragoudas et al., 2004; D'amico et al., 2006; Iturralde et al., 2006; Oshima et al., 2006), como degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética.

A injeção intravítrea oferece vantagens, como permitir que a droga seja administrada em uma dose maior, levando a uma maior biodisponibilidade da mesma, promovendo assim, um acesso imediato aos tecidos inflamados, além de haver uma menor probabilidade de ocorrerem efeitos colaterais sistêmicos. No entanto, o risco de efeitos tóxicos na retina e em

outras estruturas oculares provenientes da administração da droga, também devem ser considerados (Kwak & D'amico 1992; Yu et al., 2006). Deve ser ressaltada importância de se realizarem estudos que analisem a viabilização da injeção intravítrea de drogas, prática já utilizada clinicamente na oftalmologia, mas ainda carente de estudos mais rigorosos. Essa abordagem pode trazer maiores benefícios para o tratamento de uveítes e de outras inflamações ou de doenças oculares, pois a droga é aplicada diretamente no tecido alvo, eliminando grande parte (ou totalmente) dos possíveis efeitos colaterais sistêmicos, o que confere uma melhor qualidade de vida ao paciente, assim como rapidez e eficácia no tratamento.

## **2.1 Animal Experimental**

A retina de ratos, assim como a humana, possui um sistema vascular bem desenvolvido e caracterizado, com artérias e veias radialmente saindo do nervo óptico, além de apresentar três camadas nucleares interpostas pelas camadas plexiforme externa e interna. Porém, ratos possuem olhos muito pequenos, o que dificulta a realização de exames oftalmológicos. Já o olho de coelhos, possui um tamanho similar ao olho humano e sua retina é semelhante às de outros mamíferos e primatas (Perlman, 2009).

A escolha da espécie animal utilizada neste trabalho levou em consideração diversos fatores, como a semelhança das estruturas oculares com as do olho humano, a disponibilidade, o custo, a facilidade para realizar os experimentos, os exames clínicos e o conhecimento prévio sobre as estruturas retinianas e suas funções. A espécie escolhida foi o coelho albino da raça New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*). Optamos pelo uso de animais albinos, pois relatos na literatura sugerem que a pigmentação possa ser um fator protetor contra efeitos tóxicos de algumas drogas, o que poderia mascarar ou diminuir os possíveis efeitos de toxicidade (Zemel et al., 1995; Bui; Sinclair; Vingrys, 1998; Perlman, 2009). Estas características explicam a razão pela qual a maior parte dos estudos de toxicidade retiniana de várias drogas por meio de injeção intravítrea foi realizada em coelhos (Kwak & D'amico, 1992; Yu et al., 2006; Fauser et al., 2004; Ishikawa et al., 2006; Manzano et al., 2006; Gao et al., 2006, Aguiar, 2011; Gasparin et al., 2014). As doses intravítreas utilizadas atualmente, assim como as de antibióticos para o tratamento de endoftalmite, foram estabelecidas com base nos resultados de estudos experimentais em coelhos.

Coelhos são animais fáceis de manipular e podem ser anestesiados com segurança para a realização de exames e procedimentos de curta duração, como é o caso do

eletrorretinograma, por exemplo, além de possuírem valor comercial e por isso serem amplamente comercializados, o que torna fácil sua aquisição.

### **III Objetivos**

#### **3.1 Geral**

O presente estudo teve como objetivo principal, avaliar os efeitos da injeção intravítrea de MPA na retina de coelhos New Zealand utilizando um modelo de UCE.

#### **3.2 Específicos**

- Reproduzir um modelo de uveíte crônica experimental (UCE) em coelhos albinos, com auxílio da injeção intravítrea de *M. tuberculosis* e avaliar alterações clínicas, funcionais e morfológicas causadas pela inflamação;
- Estabelecer doses seguras de MPA para serem injetadas no vítreo de coelhos através de avaliações funcionais e morfológicas;
- Avaliar a eficácia da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE através da avaliação funcional, clínica e morfológica;

## **IV Materiais e Métodos**

### **4.1 Desenho Experimental**

Foi realizado um estudo experimental, conduzido em coelhos albinos New Zealand, que consistiu em três etapas: (1) reprodução de um modelo de UCE, (2) o estabelecimento de doses seguras de MPA para a retina do coelho albino, administradas no vítreo e (3) a avaliação dos efeitos de tais injeções no modelo de UCE.

Primeiramente foram estabelecidas as doses de MPA que seriam administradas no vítreo, para avaliar as alterações anatômicas, funcionais e morfológicas nos olhos dos coelhos, para isso levamos em consideração o fato de que, 1 mg/mL de MPA é a maior quantidade da droga que pode ser mantida em suspensão, o que determinou utilizarmos a dose de 1mg/mL e uma dose uma unidade logarítmica abaixo, a dose de 0,1mg/mL. Pelo o fato do MPA ser insolúvel no veículo, a preparação de 1mg/mL em suspensão é a máxima confiável, acima disso não é possível ter certeza da uniformidade da dose injetada, pois a quantidade de pó no veículo seria muito elevada, não sendo possível saber, o quanto da droga ficaria na seringa e na agulha durante a injeção.

### **4.2 Preparação do ácido micofenólico**

O MPA foi preparado pelo laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

O MPA ( $C_{17}H_{20}O_6$ ) é um composto lipofílico pouco solúvel em água. Para ser injetado no vítreo foi preparada uma suspensão padrão de 1 mg/mL (concentração máxima em que pode ser mantido em suspensão) em frascos estéreis de uso único. O meio de suspensão utilizado foi a solução salina contendo o agente emulsificante polissorbato 80 0,4% (Tween 80®; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) e o agente suspensor carboximetilcelulose sódica (CMC) 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri). Após o preparo, o pH (Potencial Hidrogeniônico) da solução ficou entre 7 e 7,2. A partir da suspensão padrão, o MPA foi diluído para uso.

### **4.3 Preparação Animal**

Foram utilizados 47 coelhos (machos) albinos da espécie New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) (fig. 6), com peso entre 2 a 3 kg. Foram as seguintes as preparações animais para as diferentes etapas do estudo: 1ª. etapa - um grupo de 12 coelhos foi utilizado para reprodução do modelo de UCE. 2ª. etapa - 2 grupos, com 10 coelhos cada, foram utilizados

par avaliar os efeitos, funcionais e morfológicos após injeção intravítrea das doses de MPA (0,1 e 1 mg/mL). 3ª. etapa - os efeitos clínicos, funcionais e morfológicos após injeção intravítrea de umas das doses de MPA (testadas previamente na segunda etapa) foram avaliados em um grupo de 15 coelhos modelo de UCE.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Psicologia Experimental do Instituto de Psicologia da USP (Universidade de São Paulo), com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura em trono de 25°C, sistema de ventilação e iluminação ambiente. Receberam alimentação (ração e hortaliças) e água fresca à vontade durante todo o período de permanência no biotério. Em todos os momentos do estudo foram tratados de acordo com as Normas para o Uso de Animais em Pesquisa Oftalmológica e da Visão, da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*, ARVO). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo 025 de 18/5/2007; Anexo A).

O olho esquerdo de cada animal foi utilizado como seu próprio controle. Neste olho foi injetado o veículo no grupo de animais para estudo da toxicidade do MPA (2ª. etapa); nos animais em que a UCE foi induzida (1ª e 3ª etapas), nada foi injetado no olho esquerdo). Este procedimento se destina a evitar dúvidas quanto à variação intra-animal que pode existir na realização da parte experimental.



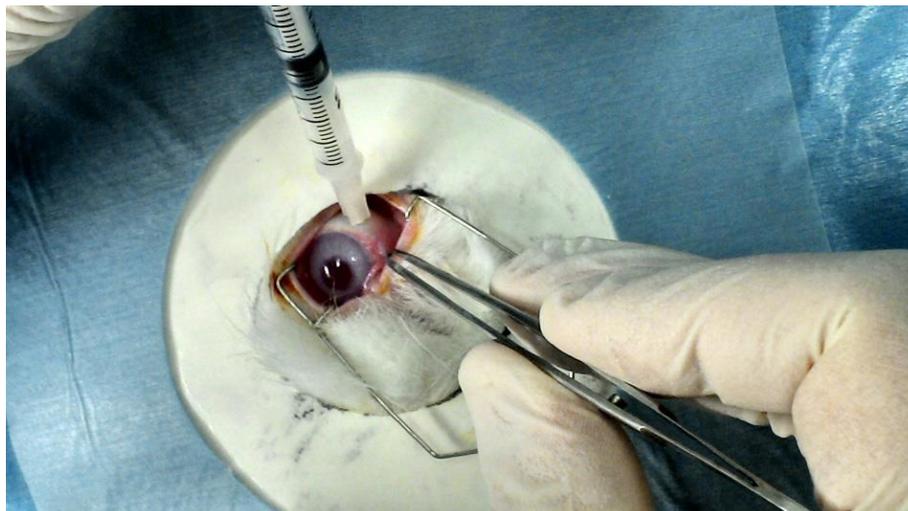
**Figura 6** – Coelho albino da espécie New zealand (imagem: <http://www.countryfarmlifestyles.com/raising-rabbits.html> – acessado em março/2014).

#### 4.3.1 Anestesia e sacrifício dos animais

Todos os animais foram anestesiados da mesma forma, antes das injeções subcutâneas de *Mycobacterium tuberculosis* (MT), injeções intravítreas de MT e ácido micofenólico (MPA) e antes dos registros eletrofisiológicos. A anestesia foi realizada através de injeção intramuscular de 6,7 mg/kg de cloridrato de xilasina 2% (Calmium®; Agener, São Paulo, Brasil) e 100 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Ketamina®; Agener, São Paulo, Brasil), não sendo esperada dor alguma após o término da anestesia. O sacrifício foi realizado através de injeção intracardíaca de 70 mg/kg de pentobarbital sódico (Euthanyle®; Brouwer, Buenos Aires, Argentina), após sedação previa do animal (a mesma descrita acima, para a realização das injeções e registro eletrofisiológico).

#### 4.3.2 Injeções intravítreas

Antes das injeções intravítreas (fig.7), os animais foram anestesiados (via intramuscular), tiveram suas pupilas dilatadas com colírio de tropicamida 1% (Mydriacyl®; Alcon, São Paulo, Brasil) e os olhos foram anestesiados com colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®; Alcon, São Paulo, Brasil). Em seguida, para assepsia foi instilada uma gota de iodopovidona (Ophthalmos; São Paulo, Brasil), em ambos os olhos. O olho do animal foi mantido aberto com o auxílio de um blefarostato, antes da injeção intravítrea, foi realizada a paracentese do olho (cerca de 0,1 mL de humor aquoso foi puncionado da câmara anterior com uma agulha de 30G (gauges) acoplada a seringa de insulina), para reduzir a pressão ocular e minimizar o refluxo após a injeção. A injeção intravítrea da solução de MPA (0,1 e 1 mg/mL) e MT foi feita no olho direito e a de veículo (polissorbato 80) no olho esquerdo, que é o olho controle, (ambas com volume de 0,1 mL), as mesmas foram realizadas a 3 mm posteriormente ao limbo corneano, na câmara posterior, como mostra a figura 7. Após as injeções foi instilado um colírio antibiótico, para prevenir infecções.



**Figura 7** – Injeção intravítrea de MPA sendo aplicada a 3mm posteriormente do limbo corneano no olho direito de um coelho albino.

Durante os procedimentos foram usados materiais estéreis (luvas, seringas, agulhas e gases) assim como campo estéril, deixando visível somente o olho do animal, e todos os materiais utilizados (blefarostato e pinças) foram autoclavados previamente, na tentativa de evitar qualquer tipo de contaminação durante as injeções.

Para as injeções subcutâneas de 10mg de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) H37ra (BD™, DIFCO™; Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, Estados Unidos) em 0,5 mL de *freund's adjuvant incomplete* (BD™, DIFCO™; Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, Estados Unidos), realizadas para dessensibilização dos animais durante o processo de indução da UCE, os animais foram anestesiados previamente e as injeções foram feitas sob a pele do pescoço, por ser abundante e de fácil manuseio. Álcool 70% foi aplicado no local, para assepsia e para tornar visível a pele do animal. As injeções foram feitas com agulha de 18G, pois o adjuvante é um óleo mineral e requer o uso de uma agulha com um calibre maior, por ser denso e viscoso.

As injeções subcutâneas e intravítreas foram realizadas no Laboratório de Psicofisiologia Sensorial do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

#### **4.4 Exames Clínicos**

Foram realizados exames oftalmológicos nos grupos experimentais em que a UCE foi induzida, para avaliar a progressão da uveíte e possíveis alterações oculares. Os exames foram realizados antes da indução da UCE, assim como nos dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 após a primeira injeção intravítrea de MT (que foi considerado como dia 0), no grupo modelo de

UCE, assim como para o grupo modelo de UCE tratado com MPA. As injeções intravítreas de MPA foram realizadas 3 dias após a primeira injeção intravítrea de MT. Os exames clínicos foram realizados após o final das sessões de ERG com os animais ainda sob efeito da anestesia. Os exames realizados foram a biomicroscopia com auxílio lâmpada de fenda (modelo SL-3G - Topcon Medical Systems, *Inc.*; Oakland, Nova Jersey, Estados Unidos) e a oftalmoscopia binocular indireta, com oftalmoscópio OSF 1.0 (Eyeteq; São Carlos, São Paulo, Brasil) e uma lente de +20 dioptrias (Nikon; Tóquio, Japão). Os exames foram realizados por um oftalmologista especialista em doenças da retina e uveítes.

A biomicroscopia analisou o segmento anterior do olho, permitindo a avaliação da câmara anterior, íris, córnea e cristalino, e a oftalmoscopia binocular indireta permitiu a avaliação do segmento posterior do olho, incluindo retina, vítreo e nervo óptico. Durante os exames eram observados se os seguintes aspectos estavam presentes ou ausentes: processos inflamatórios (células inflamatórias e *flare* na câmara anterior), sinequia anterior (aderência da íris com a córnea) ou posterior (aderência da íris ao cristalino) da íris, hipópio (acumulo de pus na câmara anterior), transparência da córnea e dos meios ópticos (corpo vítreo e humor aquoso), catarata, neovascularização tanto da conjuntiva quanto da córnea, ingurgitamento venoso da íris e as condições da retina e do nervo óptico. A avaliação da reação inflamatória foi realizada com uma fenda de 2x2 mm (milímetros) e os resultados foram quantificados de acordo com os critérios estabelecidos por Jabs e colaboradores (2005).

#### **4.5 Eletrorretinograma**

A avaliação eletrofisiológica foi realizada pelo sistema RETIport composto por amplificador e sistema computadorizado de aquisição e processamento de sinais, acoplado a um estimulador de campo total (Q450 SC; Roland Consult, Brandenburg, Alemanha).

Os ERGs foram registradas binocularmente por eletrodos bipolares do tipo lentes de contato (Goldlens; Doran Instruments Inc., Littleton, Maryland) sobre a córnea e um eletrodo terra (modelo E5; Technologies Grass, West Warwick, Rhode Island) na orelha.

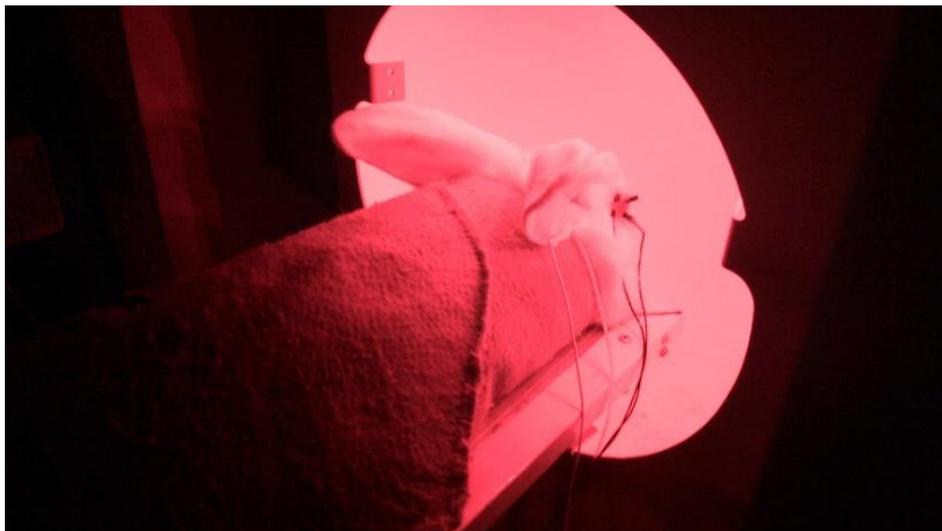
O sinal foi adquirido através do pré-amplificador e digitalizado por uma placa A/D (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha). Os dados foram exportados para o programa Excel e MATLAB para análises estatísticas e descritivas. A frequência de corte baixa foi fixada em 1 Hz (Hertz) e a alta, em 300 Hz.

Para a obtenção do registro o animal anestesiado foi acomodado na câmara de registro, em uma sala escura. Após a dilatação pupilar, os animais foram envolvidos em uma manta para ajudar na manutenção da temperatura corporal e então, colocados em decúbito ventral

com a cabeça inteiramente posicionada no interior da cúpula de estimulação (Ganzfeld do sistema RETIport). Após anestesia tópica com colírio anestésico e metilcelulose a 2% (Ophthalmos; São Paulo, Brasil), os eletrodos oculares foram posicionados, e um eletrodo terra de cúpula de ouro foi posicionado na orelha com gel eletrolítico (fig. 8).

O protocolo utilizado foi uma ampliação do protocolo clínico da ISCEV (Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica de Visão - *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) (Marmor et al, 2008), contendo diferentes intensidades de flashes na condição escotópica e variações na frequência temporal na resposta de flicker em condições fotópicas. Os registros foram realizados com os animais adaptados ao escuro por 30 minutos:

- 1) **Resposta Escotópica (resposta, predominantemente, de bastonetes):** a) foram emitidos 10 flashes de  $0,00095 \text{ cd.s/m}^2$  (unidade de luminância - candela por metro quadrado) com intervalos entre flashes (IEF) de 5s; b) foram emitidos 6 flashes de  $0,0095 \text{ cd.s/m}^2$  com IEF de 5s; c) foram emitidos 6 flashes de  $0,095 \text{ cd.s/m}^2$  com IEF de 10s; d) foram emitidos 6 flashes de  $0,95 \text{ cd.s/m}^2$  com um IEF de 15s.
- 2) **Resposta Escotópica Máxima (resposta de bastonetes e cones):** foram emitidos 3 flashes de  $9,5 \text{ cd.s/m}^2$  com um IEF de 15s.
- 3) **Resposta Fotópica (resposta de cones):** após 2 minutos de adaptação à luz de fundo de  $25 \text{ cd/m}^2$  (luz branca); a) foram emitidos 6 flashes de  $3,0 \text{ cd.s/m}^2$  com um IEF de 1s. b) foram emitidos 6 flashes de  $9,49 \text{ cd.s/m}^2$  com um IEF de 1s.
- 4) **Resposta Intermitente (Flicker):** Com uma luz de fundo de  $25 \text{ cd/m}^2$  (luz branca) foram emitidos pulsos de luz com 4 diferentes frequências. a) 12 Hz com um IEF de 0,084s; b) 18 Hz com um IEF de 0,056s; C) 24 Hz com um IEF de 0,045s e d) 30 Hz com um IEF de 0,034s.



**Figura 8** – Coelho preparado e posicionado no Ganzfeld, para o início do eletrorretinograma, envolto em manta para auxiliar na manutenção da temperatura corporal, com os eletrodos posicionados nos olhos e na orelha.

ERGs registrados antes das injeções foram comparados com os ERGs realizados após as injeções. Os valores de amplitude e latência das ondas-a e b dos ERGs foram analisados. Em cada grupo, foram realizadas comparações apenas entre os olhos que receberam MPA, e entre os olhos que receberam veículo, antes e ao longo de 30 dias, após a injeção intravítrea de MPA nas duas doses testadas para o grupo de estudo de toxicidade do MPA. No grupo do modelo de UCE foram feitas as seguintes comparações: 1. Olhos com uveíte foram comparados aos controles ao longo de 48 dias a partir da primeira injeção intravítrea de MT, no grupo modelo de UCE e no grupo modelo de UCE tratado com MPA; 2. Olhos direitos do grupo com UCE foram comparados com os olhos direitos do grupo com UCE tratado com MPA, para verificar se houve um efeito terapêutico da dose de MPA utilizada.

Outro método realizado para análise do ERG foi o estudo da relação entre a amplitude da onda-b e a amplitude da onda-a ou razão de b/a da resposta escotópica máxima. Como a maior contribuição para a onda-a é de fotorreceptores e para a onda-b é de células bipolares-ON a dependência da onda-b em relação à onda-a reflete a integridade funcional dos fotorreceptores, das células bipolares-ON e da transmissão do sinal entre estes tipos celulares (Perlman, 2009). Para nossa amostra, foi considerado como normal a razão com resultado a partir de 2.

#### **4.6 Análise Morfológica**

Todos os olhos enucleados foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0,1M por 3 horas. Somente foi fixada a cuia óptica, a câmara anterior (córnea e

íris) e cristalino foram removidos no momento da enucleação dos olhos. Após o período de fixação as cuias ópticas foram mantidas em tampão fosfato (PB) 0,1M com pH 7,2, por no mínimo 9 horas (três vezes o tempo de fixação) a 4°C, até o momento do uso.

#### **4.6.1 Cortes Histológicos**

As cuias ópticas foram crio-protegidas por meio de um gradiente crescente de sacarose (10, 20 e 30%), a 4°C até o material submergir, totalmente impregnado com sacarose. Após esse período as cuias foram limpas e o excesso de humor vítreo retirado com auxílio de uma lupa e em seguida foram emblocadas com o meio de montagem Tissue Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrence, CA) em gelo seco. A cuia óptica foi emblocada de forma direcionada com o intuito de se obter cortes seriados da região central, eixo dorso ventral no mesmo corte, tendo o nervo óptico como referência. O bloco foi aderido com OCT na posição vertical sobre o porta espécime do criostato. Cortes com 12 µm (micrometros) de espessura foram obtidos a -25°C no criostato (Leica, JUNG CM 3000) pertencente ao Laboratório de Biologia da Retina do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Biociências I da Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa Dra. Dânia Emi Hamassaki. Os cortes foram colocados em lâminas histológicas previamente gelatinizadas (quatro cortes por lâmina) e secos em placa aquecedora a 37°C por uma hora. Os cortes foram armazenados em caixas plásticas para lâminas em freezer a -20°C até o momento do uso.

Os cortes confeccionados no criostato foram utilizados para duas técnicas distintas, a técnica de coloração básica com hematoxilina e eosina (HE), e para imunohistoquímica.

#### **4.6.2 Hematoxilina e Eosina (HE)**

É a técnica mais usada na histologia e histopatologia. A combinação dos corantes hematoxilina e eosina, permitem uma visão geral do tecido corado. A hematoxilina é um corante ácido, que cora de azul-purpura as estruturas acidófilas dos tecidos, como proteínas, ricas em radicais amina, como os núcleos e ácidos nucleicos. A eosina, entretanto, é um corante básico, que cora de rosa-vermelho as estruturas basófilas ou eosinófilas dos tecidos, predominantemente, o citoplasma e fibras colágeno, entre outras estruturas de caráter básico. A técnica de coloração consiste em uma bateria de desidratação, composta por diferentes graduações alcoólicas, pelos corantes hematoxilina e eosina, e pelo xilol, responsável pela diafanização do material, fazendo com o que mesmo fique translucido e possa ser analisado em microscópio com campo claro.

Em geral, tal técnica é utilizada para materiais emblocados em parafina ou paraplast. Porém, adaptamos o protocolo clássico para utilizar a técnica em cortes crio-protégidos feitos em criostato.

Antes da utilização das lâminas, as mesmas foram colocadas em placa aquecedora ou estufa a 37°C por cerca de 30 minutos para retirar o excesso de água proveniente do descongelamento e em seguida foram submetidas ao seguinte protocolo:

- 1 min.. Água destilada
- 1 min.. Álcool 60%
- 1 min.. Álcool 70%
- 1 min.. Álcool 80%
- 1 min. e 30 sec. Água corrente
- 2 mergulhos em água destilada
- 3 min. Hematoxilina
- 1 min. e 30 sec. Água corrente
- 2 mergulhos em água destilada
- 30 sec. Eosina
- 1 min. e 40 sec. Álcool 90%
- 1 min. Álcool 100% - I
- 1 min. Álcool 100% - II
- 1 min. Álcool + xilol 1:1
- 1 min. xilol - I
- 1 min. xilol - II

As lâminas embebidas em xilol foram montadas com lamínula e D.P.X (Sigma aldrich, Alemanha) e ficaram secando por cerca de 48 horas em temperatura ambiente. Tais lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de fluorescência e campo claro (DM RBE; Leica, Alemanha) com câmera digital (DS-Ri1; Nikon, Japão) acoplada a um computador (aumento 40x oil).

#### **4.6.3 Imunohistoquímica**

É uma técnica de identificação de antígenos, que ocorre através da ligação específica de anticorpos a antígenos. Para observar tal ligação, podemos conjugar uma enzima (como por exemplo a peroxidase) ao anticorpo, que irá catalisar uma reação resultante em uma coloração ou o anticorpo pode ser conjugado a uma molécula fluorescente, um fluoróforo.

Quando o anticorpo é conjugado a um fluoróforo, a técnica é denominada de imunofluorescência, na qual os fluoróforos absorvem luz quando são excitados com um determinado comprimento de onda e emitem fluorescência em um outro comprimento de onda.

Utilizamos a imunohistoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein* - GFAP).

#### **4.6.3.1 Imunofluorescência para a proteína glial ácida fibrilar (GFAP)**

A técnica de imunohistoquímica foi realizada para identificar a presença da proteína glial ácida fibrilar (GFAP), o aumento de sua expressão é um marcador de gliose das células de Müller.

Antes da utilização das lâminas, as mesmas foram colocadas em placa aquecedora ou estufa a 37°C por cerca de 30 minutos para retirar o excesso de água proveniente do descongelamento e em seguida os cortes foram circundados um a um, com uma Aqua-Hold Pap-pen (Scientific Device Laboratory; Illinois, USA) (caneta hidrofóbica), a fim de separar os cortes em poços individuais. A imunohistoquímica foi feita de acordo com o seguinte protocolo:

Os cortes foram primeiramente lavados tampão fosfato (PB) 0,1 M pH 7,2, com Triton X-100 a 0,3% (3 lavagens de 10 minutos cada), incubados por 1 hora em soro normal de cabra 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em PB a 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubados *overnight* com o anticorpo primário contra GFAP, anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra a proteína glial ácida fibrilar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:1000 em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, mantido em câmara úmida em temperatura ambiente. Após lavagens com PB 0,1 M pH 7,2, com Triton X-100 a 0,3% (3 lavagens de 10 minutos cada), os cortes foram incubados por 2 horas no anticorpo secundário CY3 (1:200, Sigma). Após o período de incubação do anticorpo secundário, os cortes foram lavados mais uma vez, porém, somente com PB 0,1M pH 7,2 (3 lavagens de 10 minutos cada). As lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield com DAPI (Vector Laboratories Inc, California, USA), marcador fluorescente que se liga às regiões ricas em adenina e timina em sequências de DNA, marcando os núcleos celulares e lamínulas, vedadas com esmalte. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de fluorescência e campo claro (DM RBE; Leica, Alemanha) com câmera digital (DS-Ri1; Nikon, Japão) acoplada a um computador (aumento 40x).

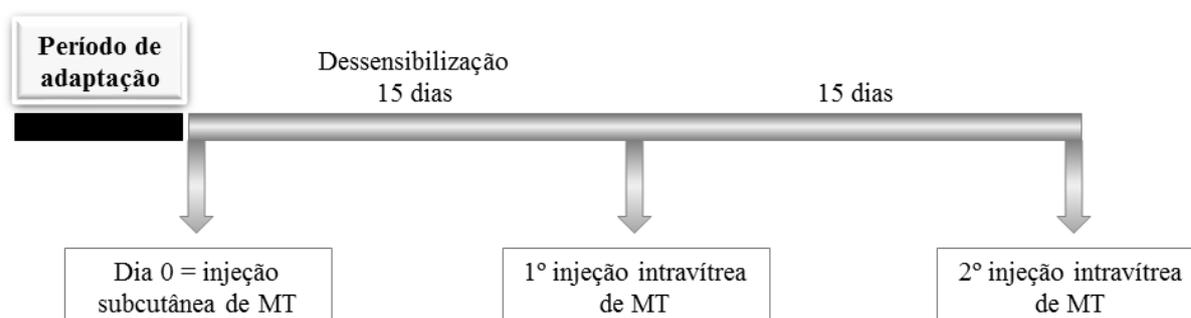
O controle negativo para o anticorpo primário (anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra GFAP) utilizado foi realizado, omitindo o mesmo no protocolo descrito acima, para verificar se não há marcações inespecíficas pelo anticorpo secundário.

#### 4.7 1ª Etapa - Indução da UCE

A indução da UCE foi feita de acordo com o protocolo utilizado por Dong, X. e colaboradores (2006). Entretanto, não foi possível realizar a vitrectomia nos coelhos, por não haver um vitreografo a disposição para o uso em animais.

A uveíte é induzida com o auxílio da cepa morta da *Mycobacterium Tuberculosis* (MT) H37ra, (BD™, DIFCO™; Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, Estados Unidos). O protocolo de indução é composto por duas etapas: primeiramente é feita uma única injeção subcutânea de 10 mg de MT suspensa em 0,5 mL de óleo mineral (*freund's adjuvant incomplete* - BD™, DIFCO™; Becton Dickinson and Company, Nova Jersey, Estados Unidos), para dessensibilização do animal. Após 15 dias, realiza-se uma injeção intravítrea de 25 µg de MT suspensa em 0,1 mL de solução salina centrifugada a 4000 RPM (rotações por minuto). Uma segunda injeção intravítrea de MT foi realizada após 15 dias da primeira, para simular um uveíte crônica recidivante (fig. 9).

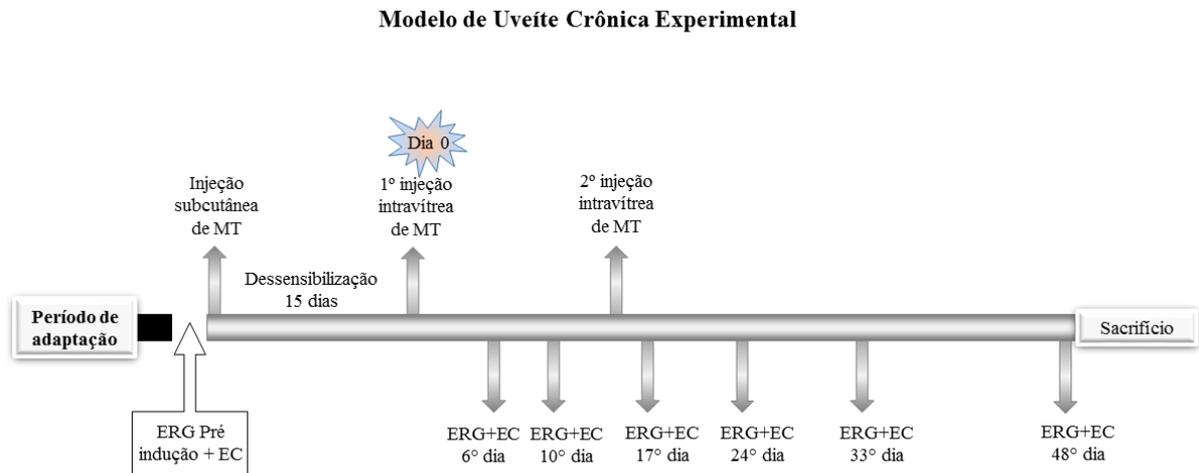
#### Indução da Uveíte Crônica Experimental



**Figura 9**– Linha temporal evidenciando os eventos necessários para indução da uveíte crônica experimental (MT = micobactéria da tuberculose).

Neste grupo foram utilizados 12 animais. Antes de iniciar o processo de indução da UCE, os animais foram submetidos ao ERG (pré-indução) e exames clínicos, e após a primeira injeção intravítrea de MT, os ERGs foram realizados juntamente com a análise clínica, nos dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (fig. 10).

Após o último ERG os animais foram sacrificados e os olhos foram enucleados e fixados em paraformaldeído 4% (Synth; Diadema, São Paulo, Brasil) por 3 horas, para análise morfológica (HE e imunohistoquímica) posterior, sendo mantidos em tampão fosfato (TF) a 0,1 M (Molar) pH 7,2, a 4°C, até o momento do uso.



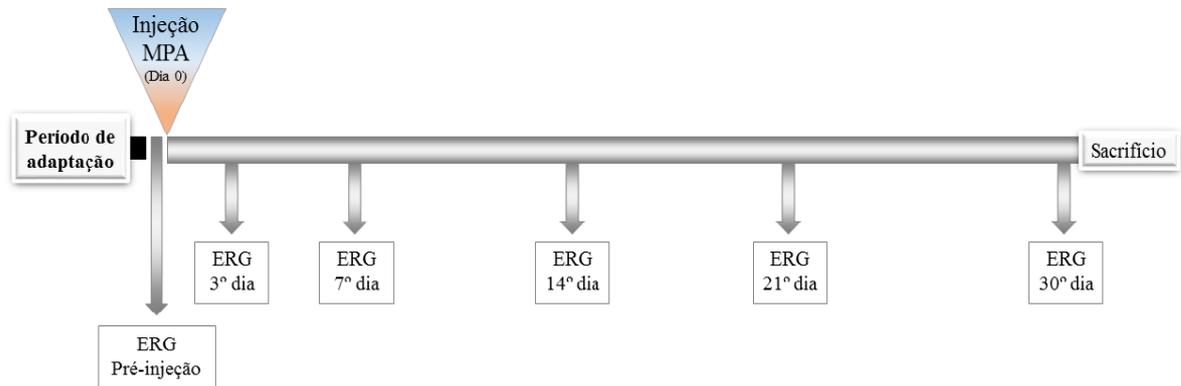
**Figura 10** – Linha temporal mostrando a ordem dos acontecimentos do processo de indução do modelo de uveíte crônica experimental, e os dias em que foram realizados os ERGs (eletrorretinogramas) e os exames clínicos (EC).

#### 4.8 2ª Etapa - Estudo de toxicidade do MPA

Foram testadas duas doses diferentes de MPA, 0,1 e 1 mg, com 10 animais em cada grupo. Todos os procedimentos necessários para realização das injeções intravítreas e do ERG já foram descritos.

Os animais passaram por um período de adaptação de no mínimo de 3 dias após a chegada no biotério, para evitar estresse. Após o período de adaptação foi realizado um ERG pré-injeção, seguido das injeções intravítreas de MPA. Como a droga é detectável por cerca de 29 dias dentro do vítreo do animal (Gasparin et al., 2014), os mesmos foram seguidos por 30 dias após a injeção intravítrea e os ERGs foram realizados nos dias 3, 7, 14, 21 e 30 após a injeção intravítrea (fig.11). No último ERG os animais foram sacrificados logo após a realização do exame e os olhos foram enucleados e fixados em paraformaldeído 4% (Synth; Diadema, São Paulo, Brasil) por 3 horas, para análise morfológica (HE e imunohistoquímica) posterior, sendo mantidos em TF (tampão fosfato a 0,1M pH 7,2, a 4°C até o momento do uso).

### Estudo de Toxicidade do MPA



**Figura 11** – Linha temporal mostrando os eventos para o estudo de toxicidade do MPA, e os dias de realização dos registros eletrofisiológicos (ERG).

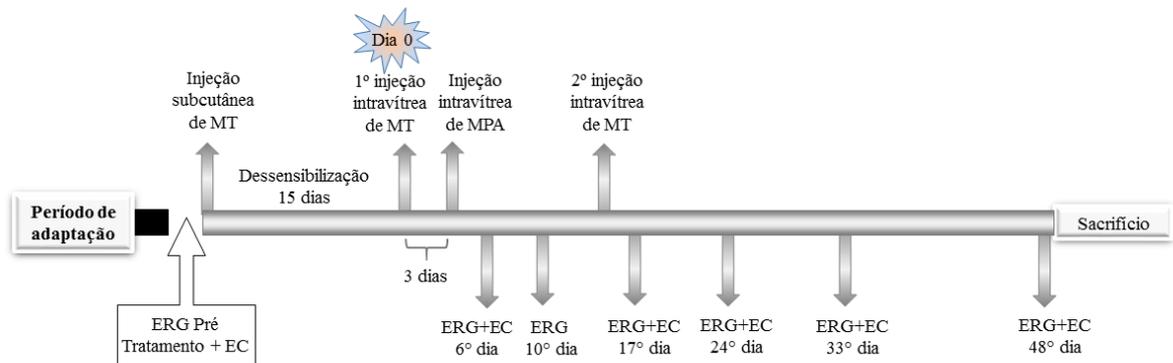
#### 4.9 3ª Etapa - Estudo do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE

Os procedimentos para realização do ERG e das injeções intravítreas foram os mesmos descritos previamente.

Para o estudo do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE, a dose de 0,1mg/mL de MPA foi escolhida de acordo com os resultados obtidos na segunda fase de experimentação com o auxílio do ERG e morfologia.

Um grupo de 15 animais passou pelo processo de indução da UCE, descrito previamente, a injeção intravítrea de MPA foi realizada 3 dias após a primeira injeção intravítrea de MT, para não sobrecarregar o olho do animal com duas injeções intravítreas no mesmo dia, os animais foram acompanhados com ERG nos dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT e os exames de biomicroscopia e oftalmoscopia direta e indireta binocular, foram realizados antes da injeção subcutânea de MT, assim como nos dias que foram realizados ERG (exceto no decimo dia, por ser muito próximo da primeira avaliação) (fig.12).

### Modelo de Uveíte Crônica Experimental tratado com MPA



**Figura 12** – Linha temporal mostrando os eventos necessários para a avaliação da eficácia da injeção intravítrea de MPA (ácido micofenólico) no modelo de uveíte crônica experimental (UCE), assim como os dias em que foram realizados os eletrorretinogramas (ERG) e exames clínicos (EC).

O sacrifício dos animais foi feito após último ERG e os olhos foram enucleados e fixados em paraformaldeído 4% (Synth; Diadema, São Paulo, Brasil) por 3 horas, para análise morfológica (HE e imunohistoquímica) posterior, sendo mantidos em TF a 0,1M pH 7,2, a 4°C, até o momento do uso.

#### 4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistica versão 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA) e foi adotado um nível de significância de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ). Realizamos uma análise estatística descritiva para cada olho, dia, dose e grupo respectivo. Comparações estatísticas foram efetuadas por uma ANOVA (análise de variância) de Medidas Repetidas tendo como grupos o olho, o dia e a dose de MPA (para o estudo de toxicidade do MPA), grupo modelo de UCE e grupo com UCE tratado com MPA. Para nosso estudo, buscamos efeitos de interação entre os grupos. O teste *post hoc* de Tuckey *test* foi utilizado para analisar quais eram as diferenças entre as médias dos grupos para os efeitos de interação estatisticamente significantes.

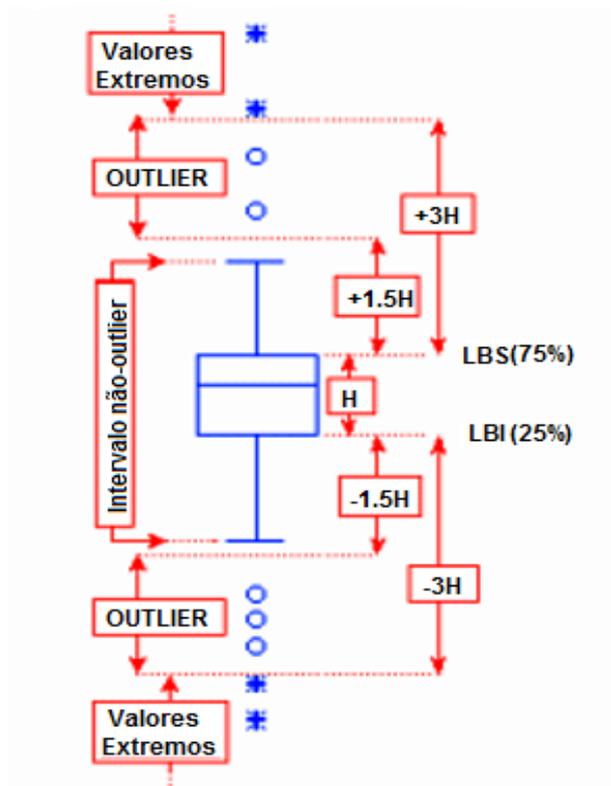
As comparações entre os grupos foram feitas antes (ERG pré- injeção) e 3, 7, 14, 21 e 30 dias depois das injeções intravítreas de MPA para os grupos de estudo da toxicidade do MPA, nas duas doses testadas, antes (ERG pré-indução/tratamento) e depois da indução da UCE, nos dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48, após a primeira injeção intravítrea de MT, para o grupo

modelo de uveíte tratado e não tratado com MPA. Foram comparados valores de amplitude e latência das ondas-a e b, expressos em microvolts ( $\mu\text{V}$ ) e milissegundos (ms) respectivamente.

Os valores da razão da amplitude da onda-b escotópica máxima sobre a amplitude da onda-a (razão de b/a) também foram comparadas utilizando os mesmos parâmetros, um teste de análise de variância (ANOVA de um fator,  $\alpha = 0,05$ ), o *post hoc* utilizado foi o mesmo usado nas outras análises.

O componente do 1º harmônio do flicker foi analisado através da Transformada de Fourier com o auxílio do programa Matlab (The Math Works, EUA). A análise estatística foi realizada com o mesmo teste estatístico e *post hoc* adotado para as outras análises, comparando os olhos experimentais com os controles nos diferentes dias e frequências testadas.

Os olhos que apresentaram medidas aberrantes, tanto para amplitude ou latência das ondas-a e b, foram retirados da amostra levando em consideração o seguinte cálculo:  $LI - 2 \times 1.5 \times (LS - LI)$  e  $LS + 2 \times 1.5 \times (LS - LI)$ , onde LI é o limite inferior e LS é o limite superior, que correspondem aos valores de desvio padrão (fig.13).



**Figura 13** – Diagrama ilustrativo que demarca os outliers retirados da amostra. LBS 75% = Limite de borda superior (percentil 75%), LBI 25% = limite de borda inferior (percentil 25%). H = distância entre quartis (imagem modificada de: Statistica versão 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA)).

## **V Resultados**

### **5.1 Modelo de uveíte crônica experimental**

#### **5.1.2 Achados clínicos**

A Tabela 1 resume os achados clínicos no grupo de UCE observados através da biomicroscopia.

Após 6 dias da indução da UCE foi realizado o primeiro exame clínico (tais exames foram realizados igualmente antes da indução da UCE e nenhuma alteração foi observada), 75% dos animais apresentaram uma hiperemia leve (1+) da conjuntiva, que se manteve estável até o 24º dia e a partir de então diminuiu de forma que no último exame clínico realizado nenhum dos animais apresentou hiperemia conjuntival.

Na avaliação da córnea, 100% dos animais apresentaram córnea clara durante todo o experimento, no 17º dia foi observada a presença de neovascularização na córnea em alguns animais e 37% dos mesmos terminaram os experimentos com a presença de neovasos.

A reação inflamatória da câmara anterior foi considerada intensa na primeira semana em 62% dos animais, devido à presença de células (inflamatórias) (3+), diminuindo para leve (1+) no 10º dia e voltando a ser classificada como severa (3+) em 100% dos animais no 17º dia, diminuindo gradativamente até o 48º dia, sendo classificada como leve (1+) em 100% dos animais. O flare foi considerado moderado (2+) na primeira semana em 87% dos animais, no 10º dia foi classificado como leve (1+), voltando a ser classificado como moderado (2+) no 17º dia em 100% dos animais, diminuindo gradativamente até o último dia de experimento, sendo classificado como leve (1+). Somente um animal apresentou ausência de flare.

Todos os animais apresentaram um cristalino transparente até o 17º dia, a partir de então foi observado o surgimento de catarata subcapsular em cerca de 57% dos animais, no 24º dia todos animais apresentavam catarata, que é irreversível, se mantendo dessa forma até o final dos experimentos.

Foi observado ingurgitamento venoso da íris (obstrução dos vasos sanguíneos) logo na primeira semana em cerca de 87% dos animais, o mesmo se manteve até o 17º dia, onde 100% dos animais apresentavam ingurgitamento venoso da íris, que teve uma pequena diminuição até o último dia de experimento. Sinequias posteriores (aderência da íris ao cristalino) também foram observadas na íris, cerca de 87% dos animais apresentaram sinequias logo na primeira semana, assim como no ingurgitamento da íris, as sinequias se mantiveram estáveis até o 17º dia, onde 100% dos animais apresentaram sinequias, ocorrendo também uma discreta diminuição até o 48º dia, onde 80% dos animais continuaram apresentando sinequias.

Não foi observada a presença de hipópio (acúmulo de pus na câmara anterior) em nenhum dos animais durante os 48 dias em que os mesmos foram avaliados.

A fundoscopia foi considerada normal, não havendo relato da presença de células inflamatórias no vítreo, descolamento de retina ou algum tipo de comprometimento da retina e nervo óptico. Nenhuma alteração foi encontrada nos olhos controles (olhos esquerdos).

O exame clínico sugere que a UCE gerada é uma uveíte anterior, uma vez que a avaliação fundoscópica não observou nenhum dano ou comprometimento da retina e nervo óptico e também não demonstrou a presença de células inflamatória na câmara posterior (corpo vítreo).

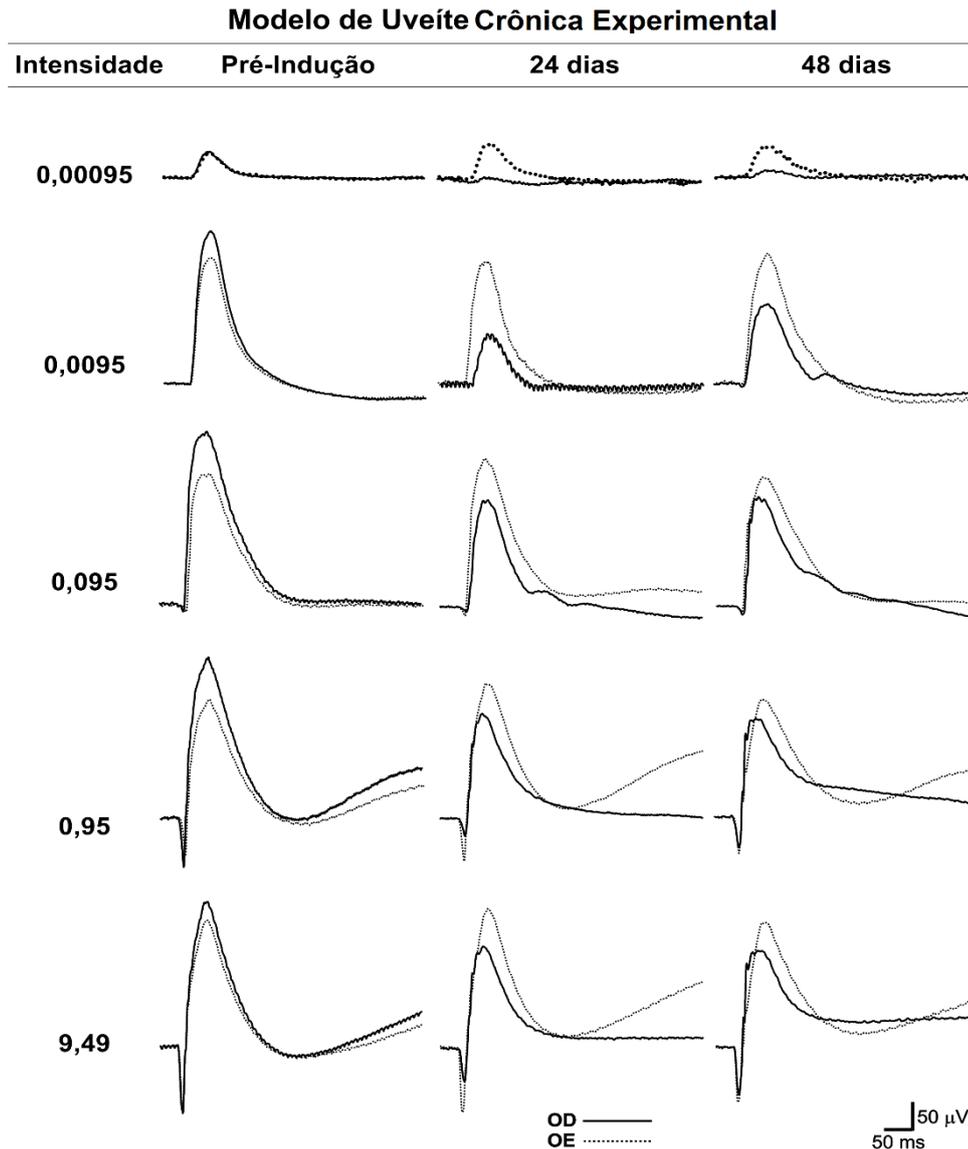
O 17º dia após a indução da UCE pode ser considerado como o pico da inflamação, que se mantém até o 24º dia, a partir de então os efeitos da inflamação regridem de forma natural. Este resultado mostra que a inflamação gerada pelo modelo de UCE utilizado é moderada (durante seu pico de inflamação), sendo limitada. Esse pico inflamatório pode ser explicado devido à segunda injeção intravítrea de MT, realizada 15 dias após a primeira injeção (dia 0), para simular uma uveíte crônica recidivante.

**Tabela 1** – Achados clínicos do modelo de uveíte crônica experimental, mostrando o desenvolvimento do quadro infeccioso gerado pela inflamação.

Dias	Conjuntiva			Córnea		células			Flare			Cristalino		Ingurgitamento - íris		Sinequia		Hipópio		
	calma	1+	2+ 3+	clara	neovasos	ausente	1+	2+ 3+	ausente	1+	2+ 3+	transparente	catarata	presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente	
06 dias (n=8)	2	6		8		1	2	5	1	7	8			7	1	7	1			8
10 dias (n=8)	3	5		8		7	1			7	1	8		8		6	2			8
17 dias (n=7)		6	1	7	2			7		7	4	3		7		7				7
24 dias (n=6)		6		6	5		1	5		2	3	1	5	5	1	6				6
33 dias (n=6)	2	4		6	5		4	2	1	3	2	6	6	4	2	5	1			6
48 dias (n=5)	5			5	3		5		1	3	1	5	5	4	1	4	1			5

### 5.1.3 Eletrorretinograma

Podemos observar na figura 14 a representação das respostas escóticas nas intensidades testadas no modelo de UCE (olho controle – linha tracejada e olho experimental com uveíte – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-indução, 24 e 48 dias após a indução da UCE).

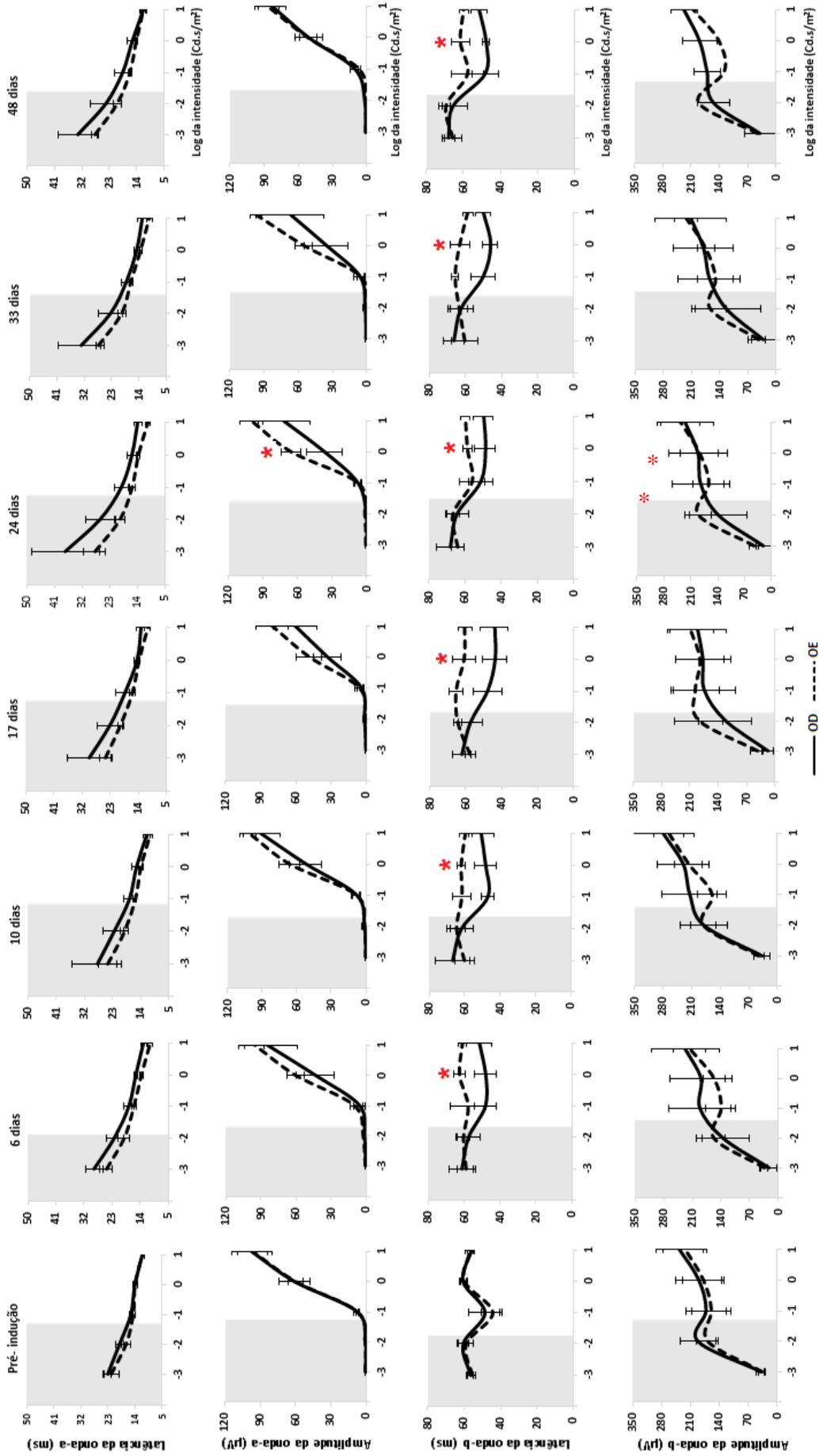


**Figura 14** – ERGs escotópicos de um mesmo animal modelo de UCE para as intensidades testadas em três dias distintos, pré-indução, 24 e 48 dias após indução da UCE. Intensidade:  $\text{cd.s/m}^2$ ; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts.

As amplitudes e latência médias e respectivos desvios padrão das ondas-a e b para a condição escotópica nas cinco intensidades testadas ( $0,00095 = \text{Log I}^{-3}$ ;  $0,0095 = \text{Log I}^{-2}$ ;

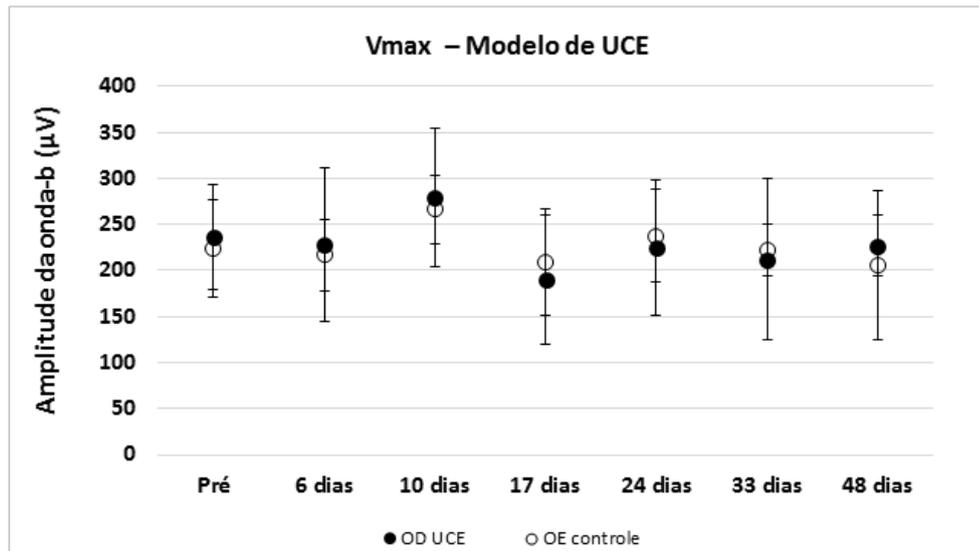
0,095 = Log I -1; 0,95 = Log I 0 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> = Log I 1) em todos os dias de registro (Pré-indução, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução) estão apresentadas na Figura 15. A comparação entre olhos com uveíte e olhos sem uveíte, realizada no teste estatístico descrito, foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciando as seguintes diferenças:

- Amplitude da onda-a (escotópico) para Log I 0 para o dia 24 (F= 4,7 P= 0,002);
- Latência da onda-b (escotópico) para Log I 0 para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (F= 4,89, P= 0,002);

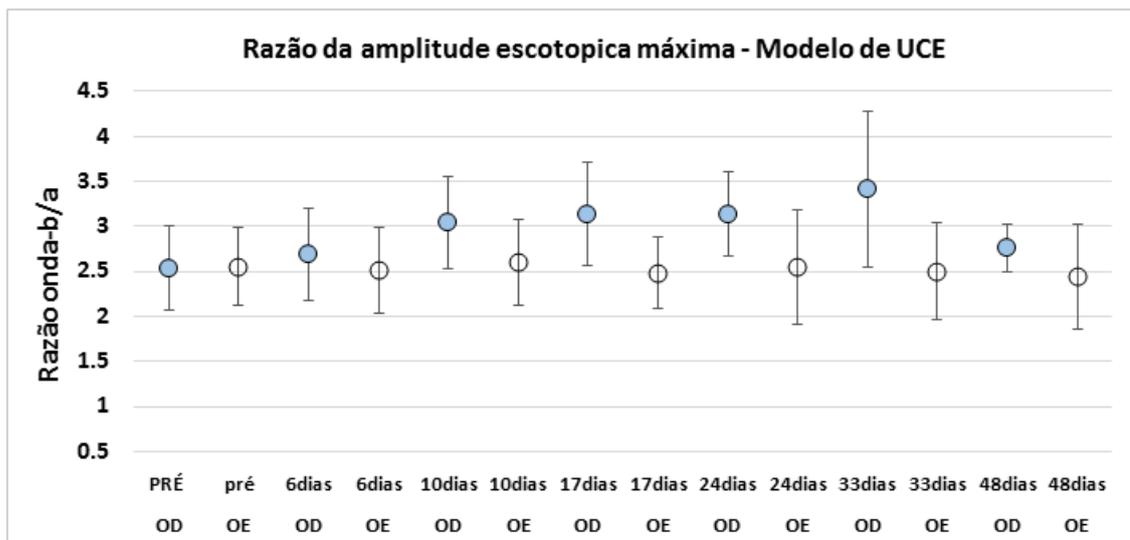


**Figura 15** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 log respectivamente) no modelo de UCE, nos dias pré-indução 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0,05).

A figura 16 apresenta as médias e desvios padrão da amplitude de saturação da onda-b ( $V_{max}$ ) para o dia pré-indução e ao longo dos 48 dias de desenvolvimento da inflamação da uveíte no modelo de UCE e a figura 17 apresenta a razão da amplitude escotópica máxima da onda-b sobre a amplitude da onda-a ( $b/a$ ).



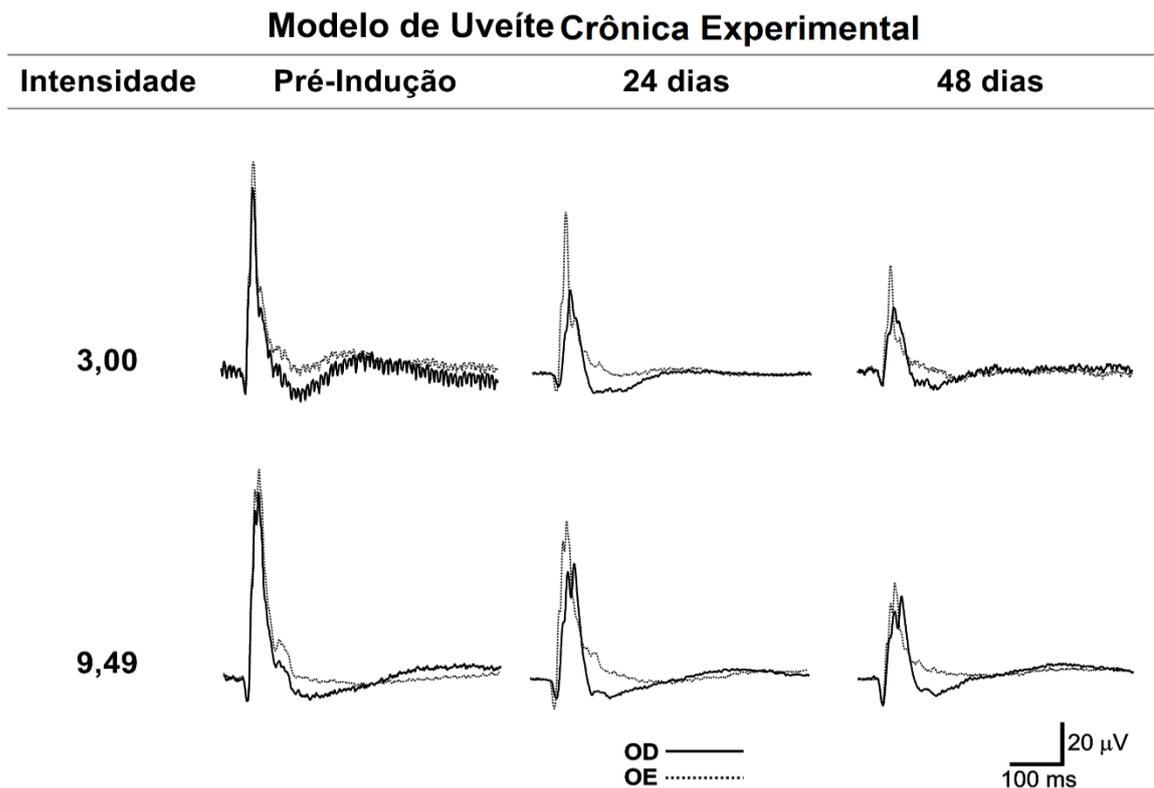
**Figura 16** – Médias da reposta saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) no dia pré-indução e ao longo do desenvolvimento da UCE. Círculos fechados correspondem ao olho com UCE, círculos abertos correspondem ao olho controle. OD: olho direito; OE: olho esquerdo.



**Figura 17** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de  $b/a$ , antes da indução da UCE e ao longo de seu desenvolvimento. OD: olho direito, círculos fechados; OE: olho esquerdo, círculos abertos; Barras verticais: desvio padrão.

As análises da razão da amplitude b/a para o modelo de UCE não apresentou diferença estatística. A média dos resultados da razão de b/a, como podemos ver no gráfico (fig.17) estão bem próximo de 2 ou são superiores.

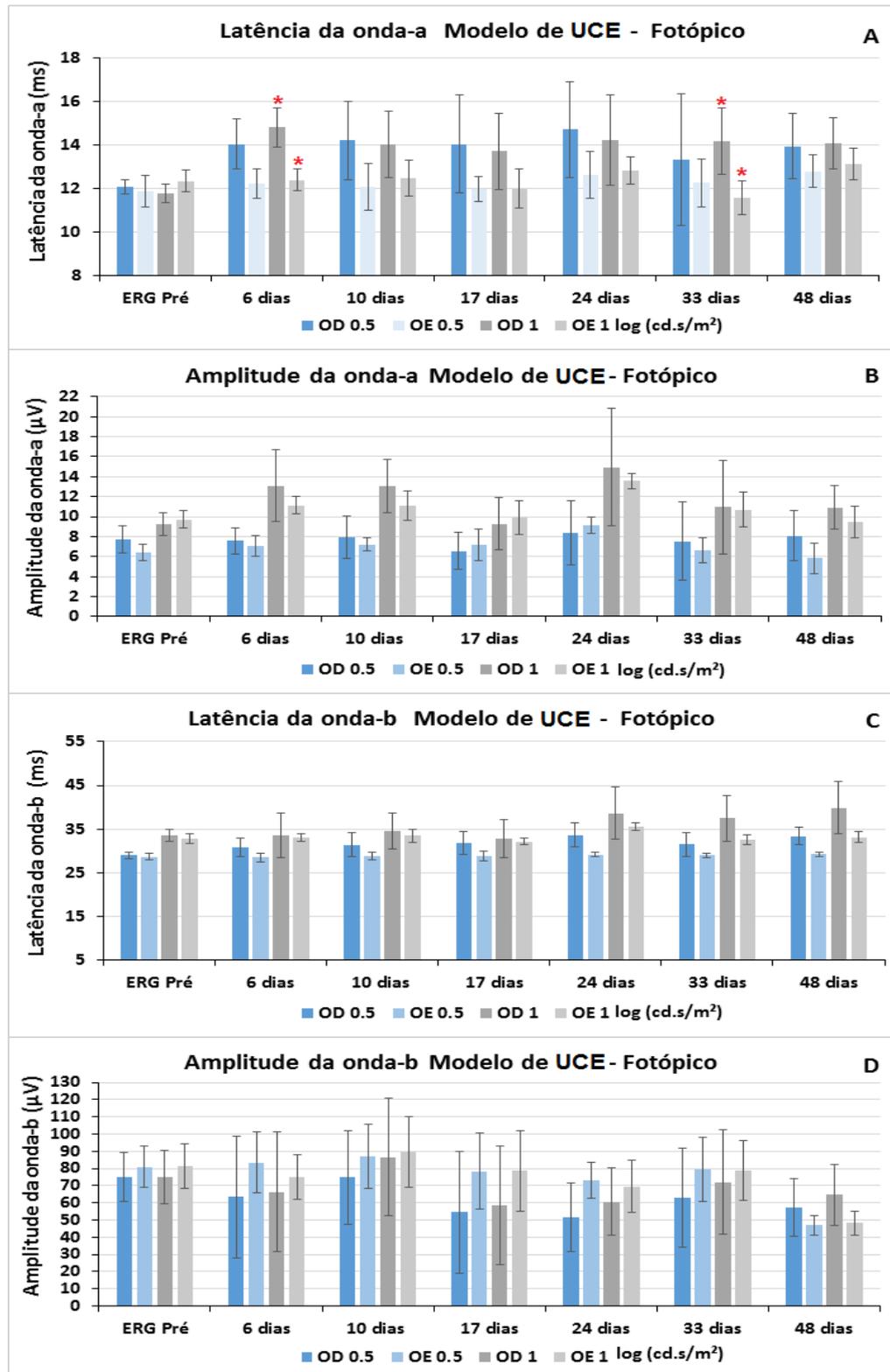
Os ERGs fotópicos nas intensidades testadas no modelo de UCE (olho controle – linha tracejada e olho experimental com uveíte – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-indução, 24 e 48 dias após a indução da UAE) são apresentados na Figura 18.



**Figura 18** – ERGs fotópicos de um mesmo animal modelo de UCE para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro; pré-indução, 24 e 48 dias após a indução da UCE. Há uma diminuição na amplitude da resposta para as duas intensidades. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; uV: microvolts.

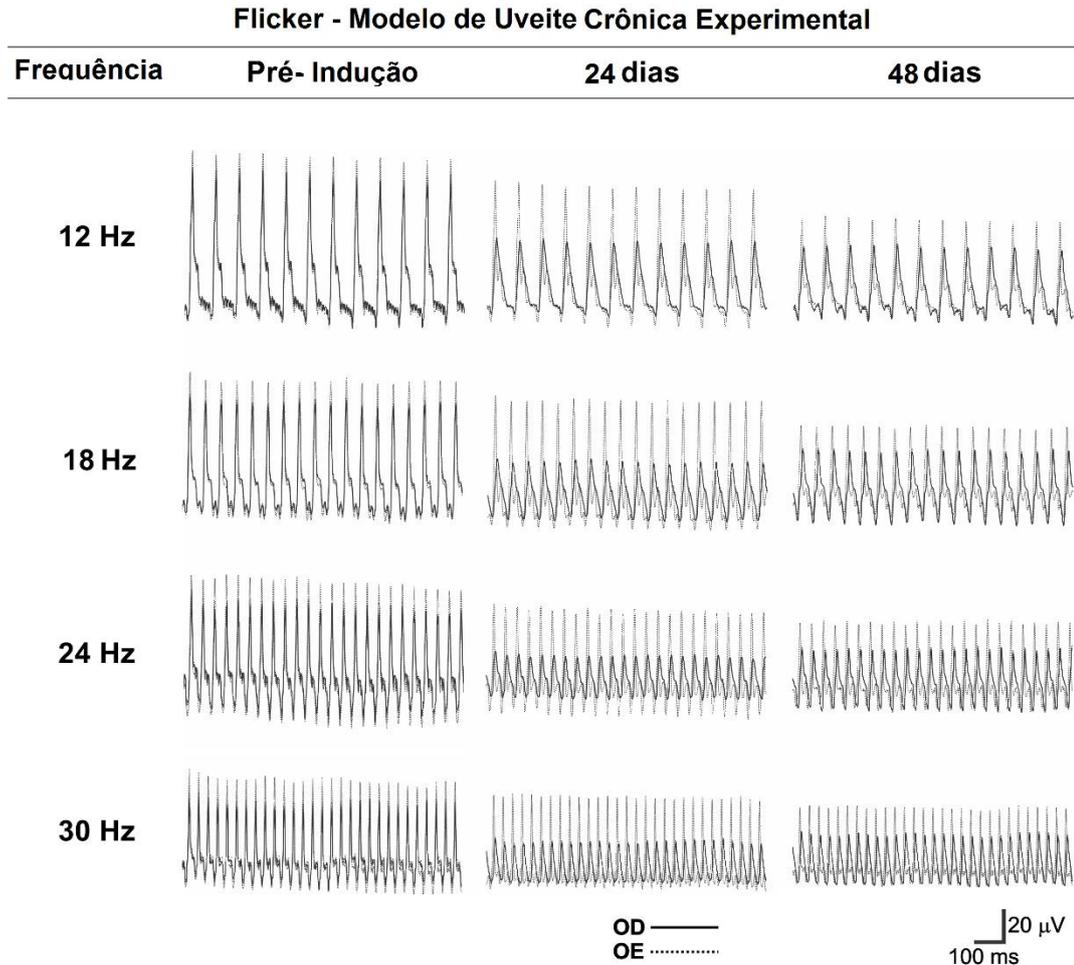
A média e desvio padrão da amplitude e da latência das ondas-a e b estão apresentadas na Figura 19, para a condição Fotópica nas duas intensidades testadas (3,0 = Log I 0.5; 9.49 cd.s/m<sup>2</sup> = Log I 1) em todos os dias de registro (Pré indução, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução) (fig.19). A comparação estatística entre olhos com uveíte e olhos sem uveíte foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey test mostrou as seguintes diferenças:

- Latência da onda-a (fotópico) para Log I 1 para os dias 6 e 33 (F= 2,6, p= 0,022);



**Figura 19** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49  $\text{cd.s/m}^2$  (0.5 e 1 log respectivamente) no modelo de UCE, nos dias pré-indução 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: Desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*= $P < 0,05$ ).

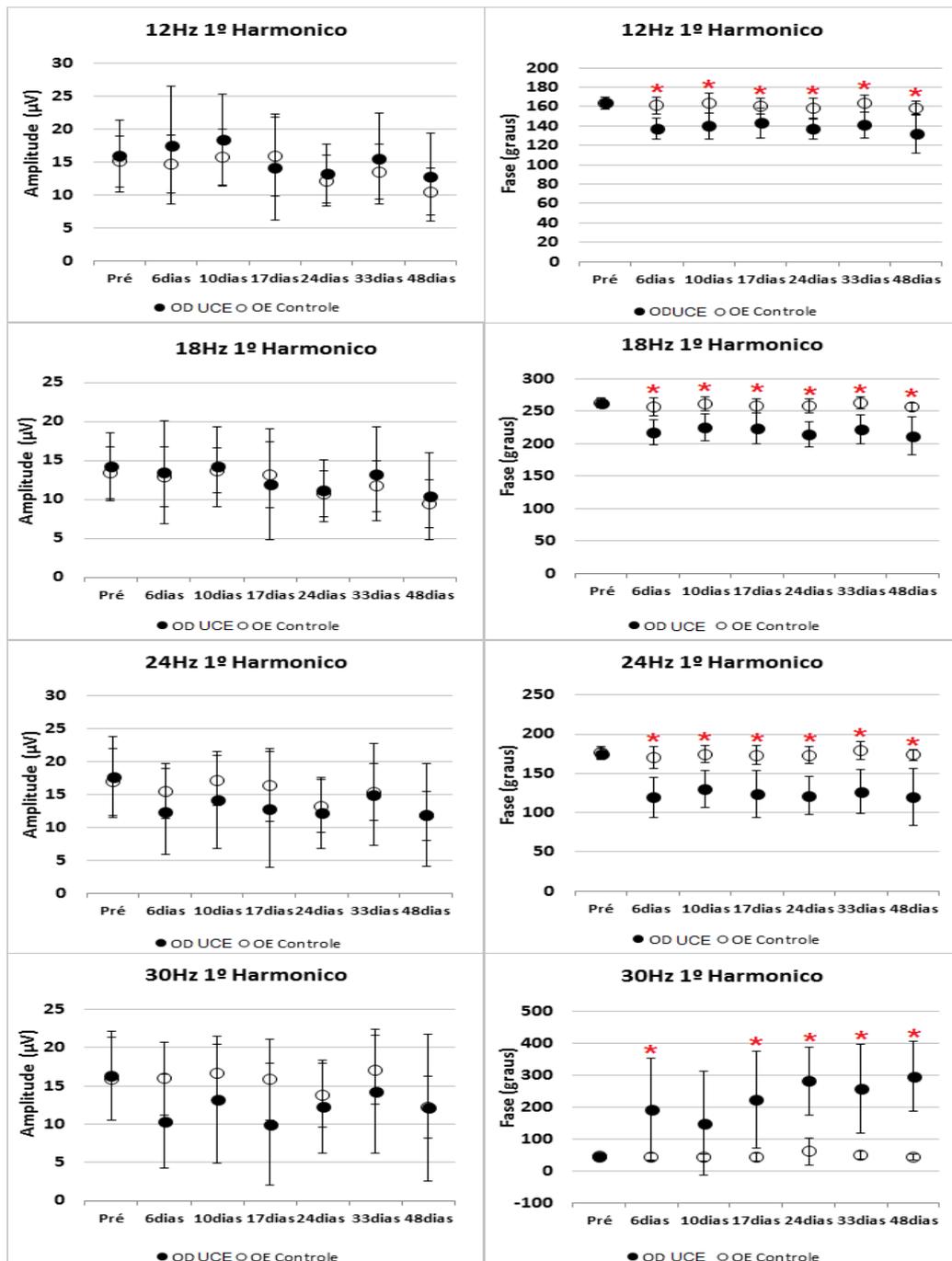
O ERG em resposta à estimulação luminosa intermitente (flicker) é apresentado na Figura 20 nas quatro frequências testadas: 12, 18, 24 e 30 Hz no modelo de UCE (olho controle – linha tracejada e olho experimental com uveíte – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-indução, 24 e 48 dias após a indução da UCE).



**Figura 20** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal modelo de UCE nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts.

A amplitude do 1º harmônico da onda foi obtida através da transformada de Fourier com o auxílio do programa Matlab (The Math Works, EUA). Na figura 21 podemos comparar as médias das amplitudes e das fases em resposta as frequências 12, 18, 24, e 30 Hz no modelo de UCE. A análise estatística não mostrou diferenças para a amplitude do primeiro harmônico porem evidenciou as seguintes diferenças para a fase do 1º. harmônico: 12 Hz para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 ( $F=3,98$ ,  $P= 0,001$ ), 18 Hz para os dias 6, 10 17, 24, 33 e 48 ( $F= 5,29$ ,  $P= 0,007$ ), 24 Hz para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 ( $F= 5,80$ ,  $P=0,001$ ) e 30 Hz para os

dias 6, 17, 24, 33 e 48 ( $F=4,97$ ,  $P=0,001$ ). Há uma aceleração da resposta do olho com UCE relativa ao controle em todas as frequências (diminuição da fase) com exceção de 30 Hz, em que a resposta do olho com UCE se torna mais lenta que a do controle.

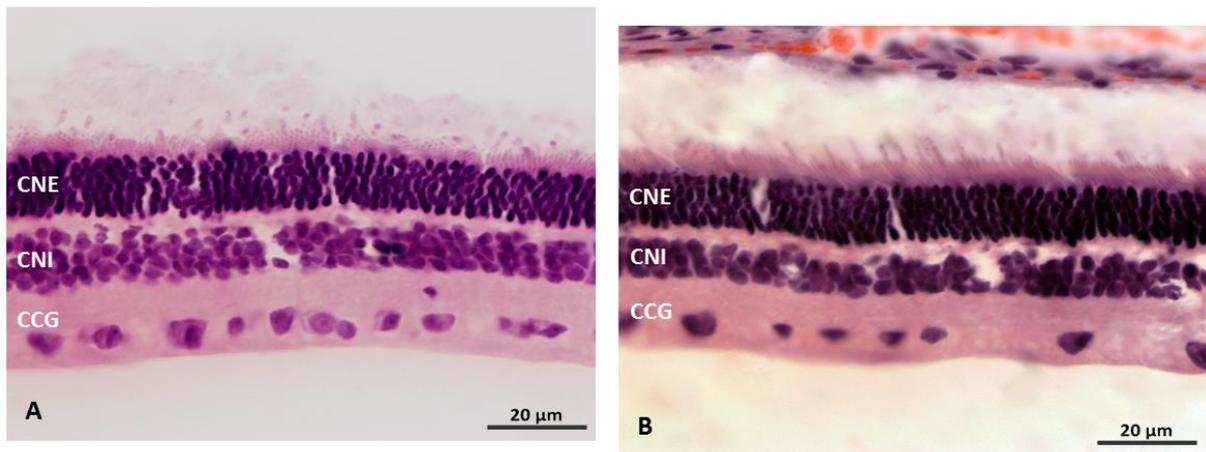


**Figura 21** – Valores médios das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz), para a UCE. Barras verticais: desvio padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*= $P<0,05$ ).

### 5.1.4 Análise Morfológica

#### 5.1.4.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

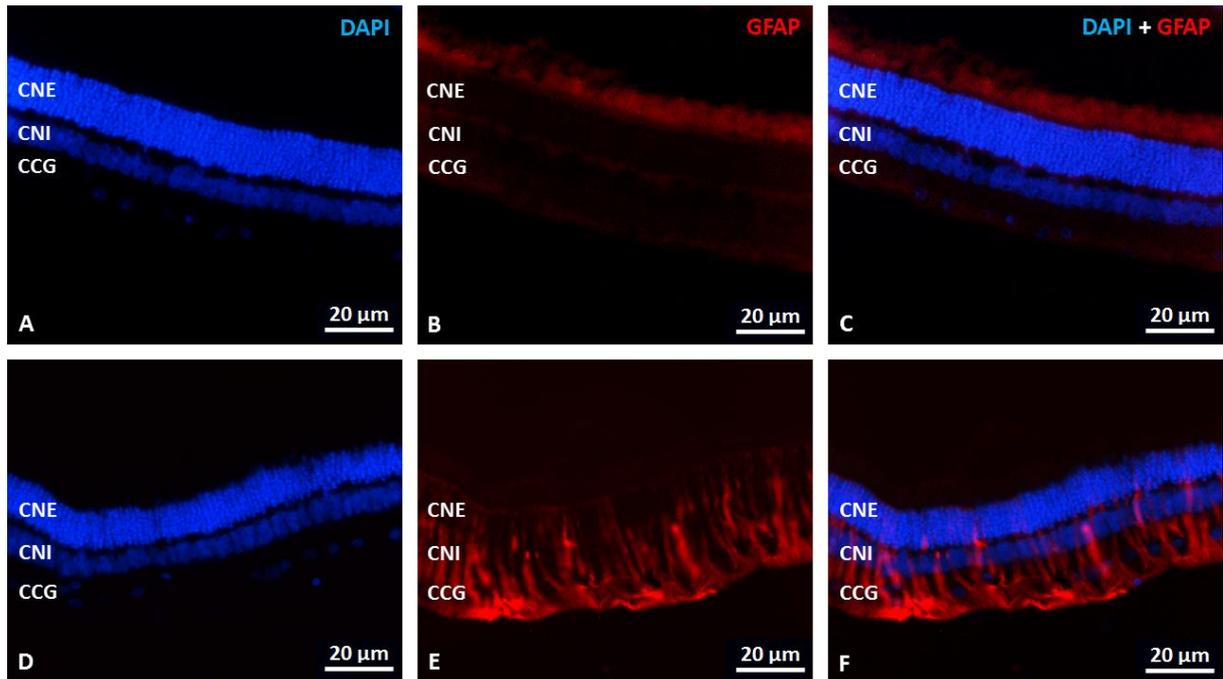
A análise morfológica feita por meio da técnica de hematoxilina e eosina não evidenciou alterações na estrutura retiniana. Cortes radiais do eixo dorso-ventral dos olhos com UCE e olhos controles foram analisados e não apresentaram diferenças na região analisada. É importante ressaltar que não temos como saber se houve algum dano pontual em alguma região retiniana específica, pois somente foi analisada a região central, tendo o nervo óptico como referência. A figura 22 mostra um exemplo de um olho com UCE e um controle corados com HE.



**Figura 22** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – com UCE. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20μm (micrometros).

#### 5.1.4.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP

A imunomarcagem para a proteína GFAP foi positiva somente para os olhos com UCE como podemos ver na figura 23, temos os núcleos celulares marcados com DAPI em azul e as células de Müller marcadas em vermelho para a proteína GFAP.



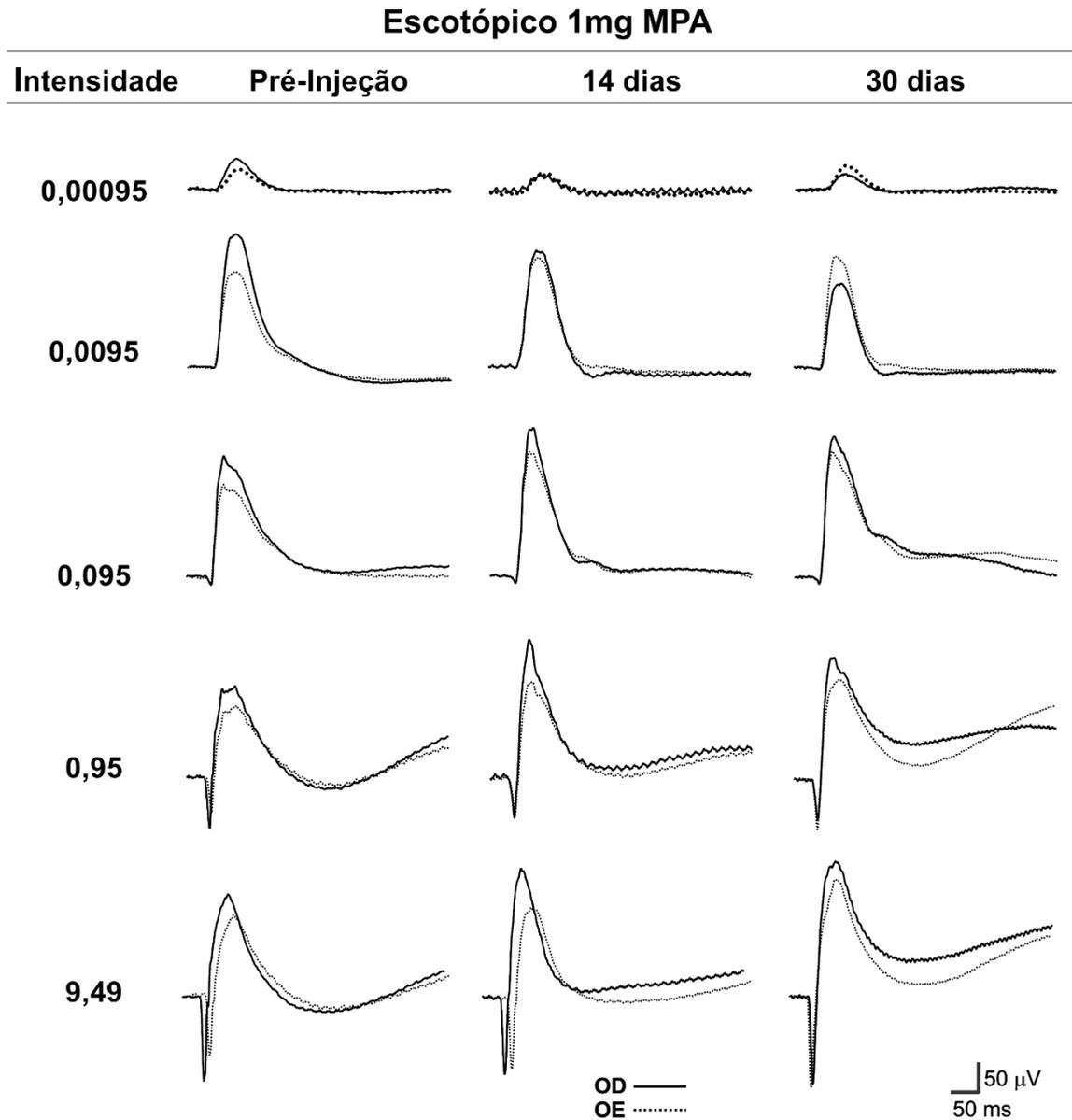
**Figura 23** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle, e D, E F, cortes do olho com uveíte – direito. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado negativamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com UCE marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com UCE imunomarcado para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrometros).

Como podemos observar na figura 23, as camadas nucleares continuam preservadas, assim como ocorreu com os cortes corados com HE, porém o olho com UCE foi marcado positivamente para a proteína GFAP, o que indica uma gliose das células de Müller e configura um processo inflamatório, mesmo 48 dias depois da indução da uveíte.

## 5.2 Estudo de toxicidade do MPA

### 5.2.1 Eletroretinograma

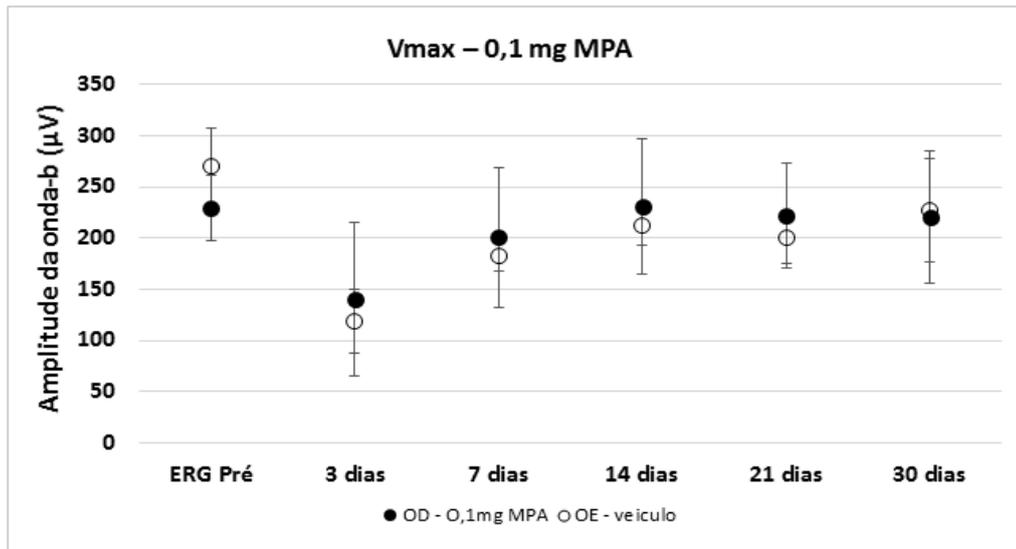
A figura 24 apresenta as respostas escóticas nas intensidades testadas na dose de 1mg MPA (olho controle – tracejada e olho experimental com MPA –linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-injeção, 14 e 30 dias após injeção de MPA).



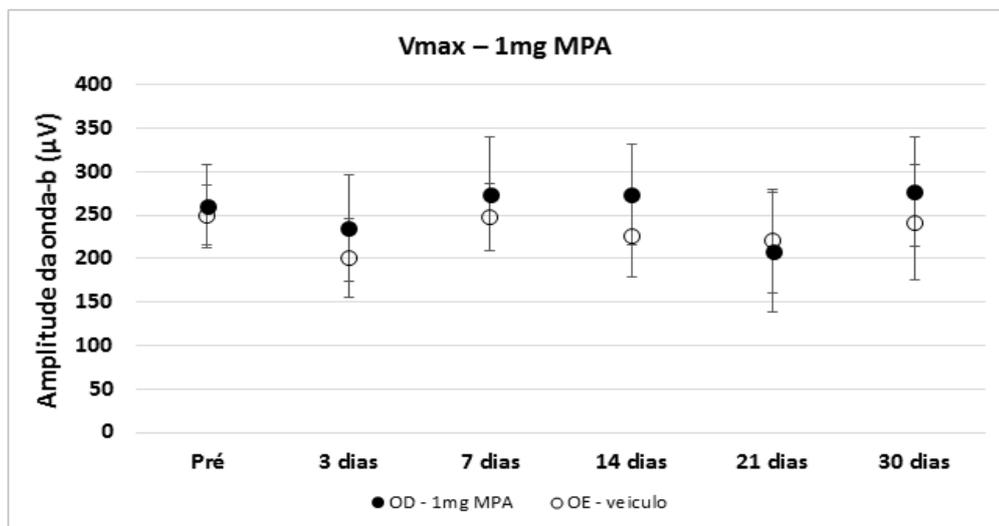
**Figura 24** - ERGs escotópicos de um mesmo animal que recebeu injeção intravítrea de 1mg/mL de MPA, em três dias distintos, pré-injeção, 14 e 30 dias após a injeção de MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; μV: microvolts.

A comparação entre olhos com MPA e olhos com veículo, realizada no teste estatístico descrito, não foi significativa para nenhuma das doses de MPA testadas, não tendo havido diferenças entre as doses de MPA e o veículo utilizado como controle.

A figura 25 apresenta as médias da amplitude de saturação da onda-b ( $V_{max}$ ) para o dia pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga na dose de 0,1mg/mL MPA e a figura 26 apresenta a dose de 1mg/mL de MPA, mostrando também o registro pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga.

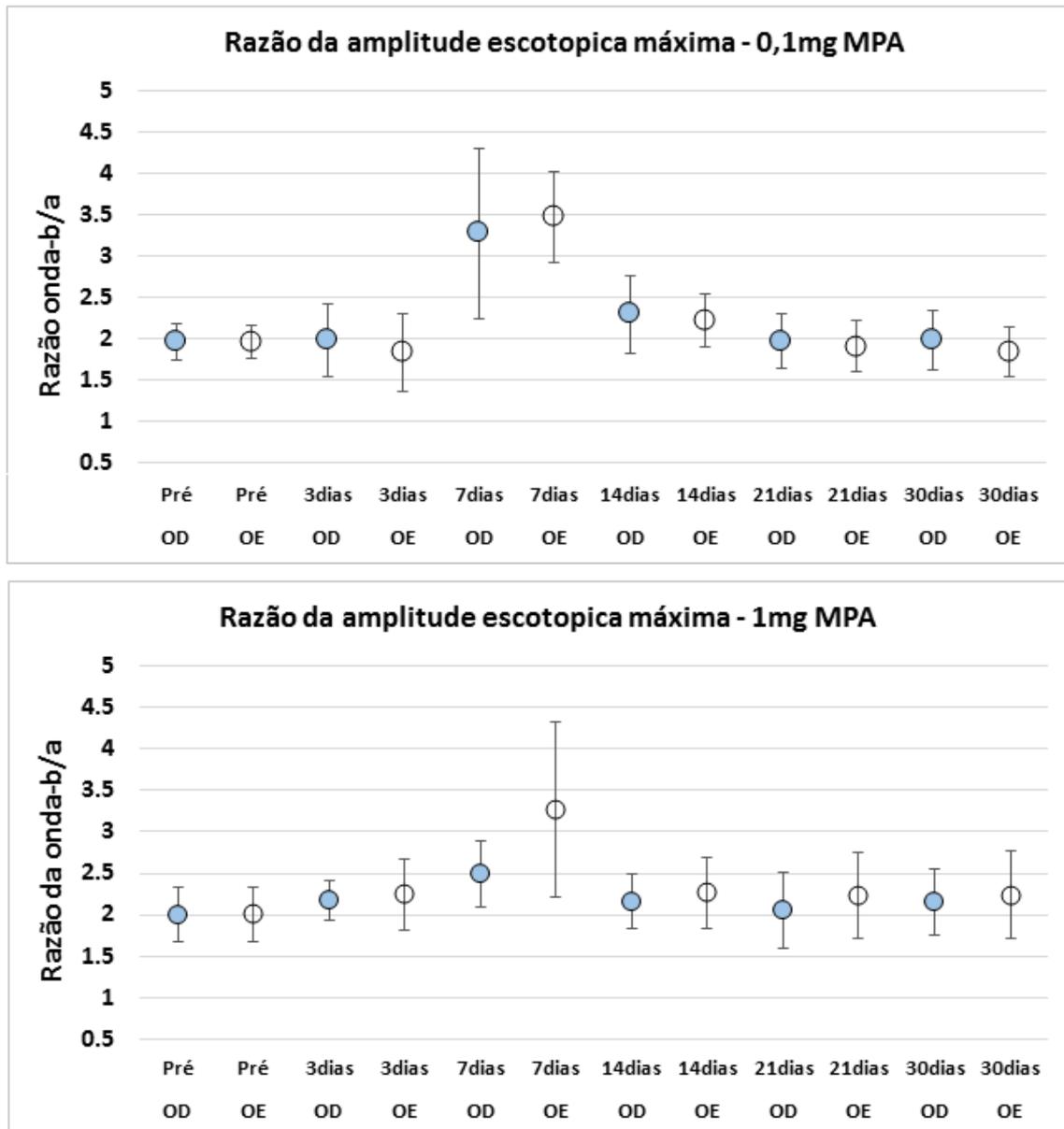


**Figura 25** – Médias da resposta saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) no dia pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga no olho, dose de 0,1mg/mL MPA. Círculos fechados correspondem ao olho com MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho com veículo (OE: olho esquerdo). Barras verticais: desvio padrão.



**Figura 26** – Médias e desvios padrão da amplitude de saturação da onda-b ( $V_{max}$ ) no dia pré-injeção e ao longo dos 30 dias de ação da droga no olho, dose de 1mg/mL MPA. Círculos fechados correspondem ao olho com MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho com veículo (OE: olho esquerdo). Barras verticais: desvio padrão.

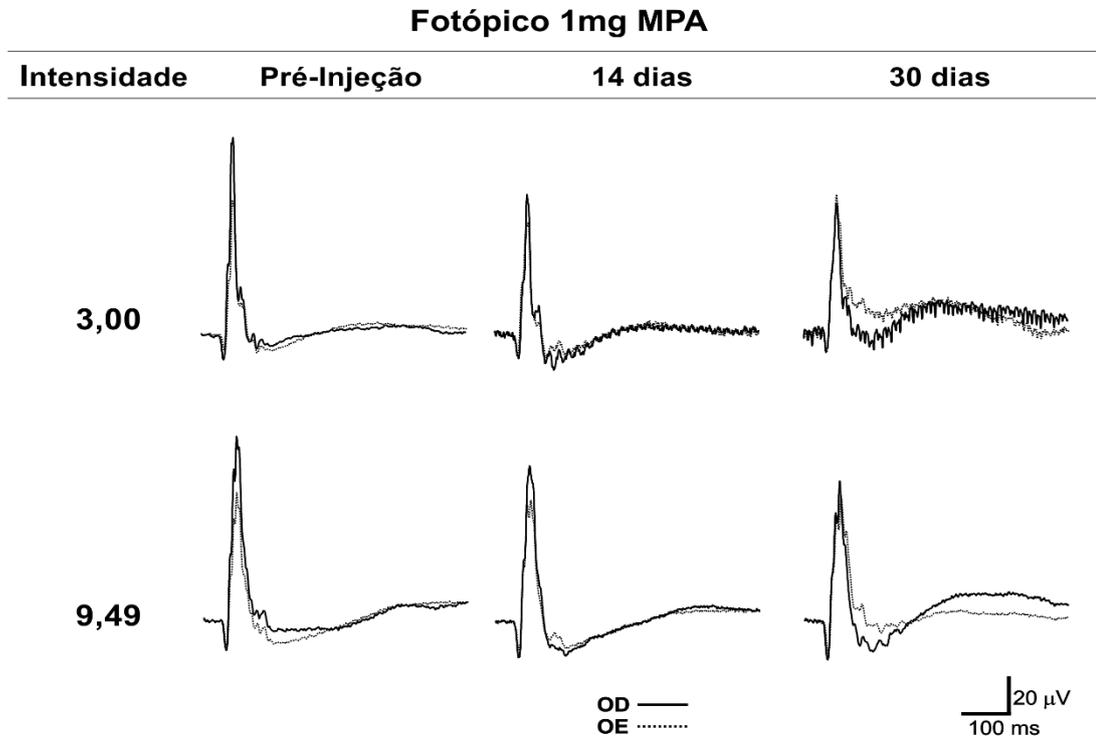
Médias da razão da amplitude escotópica máxima da onda-b sobre a amplitude da onda-a (b/a) nas doses de 0,1 e 1mg de MPA (Figura 27) não apresentaram diferenças estatística.



**Figura 27** – Média da razão da amplitude escotópica máxima de b/a nas doses de 0,1mg/mL (gráfico superior) e 1mg/mL (gráfico inferior) de MPA, pré-injeção e ao longo de 30 dias. OD: olho direito; OE: olho esquerdo. Barras verticais: desvio padrão.

Os ERGs fotópicos nas intensidades testadas no estudo de toxicidade do MPA na dose de 1mg (olho controle – linha tracejada e olho experimental com MPA –linha contínua)

durante 3 sessões do ERG (pré-injeção, 14 e 30 dias após a indução intravítrea de MPA) são reproduzidos na Figura 28.

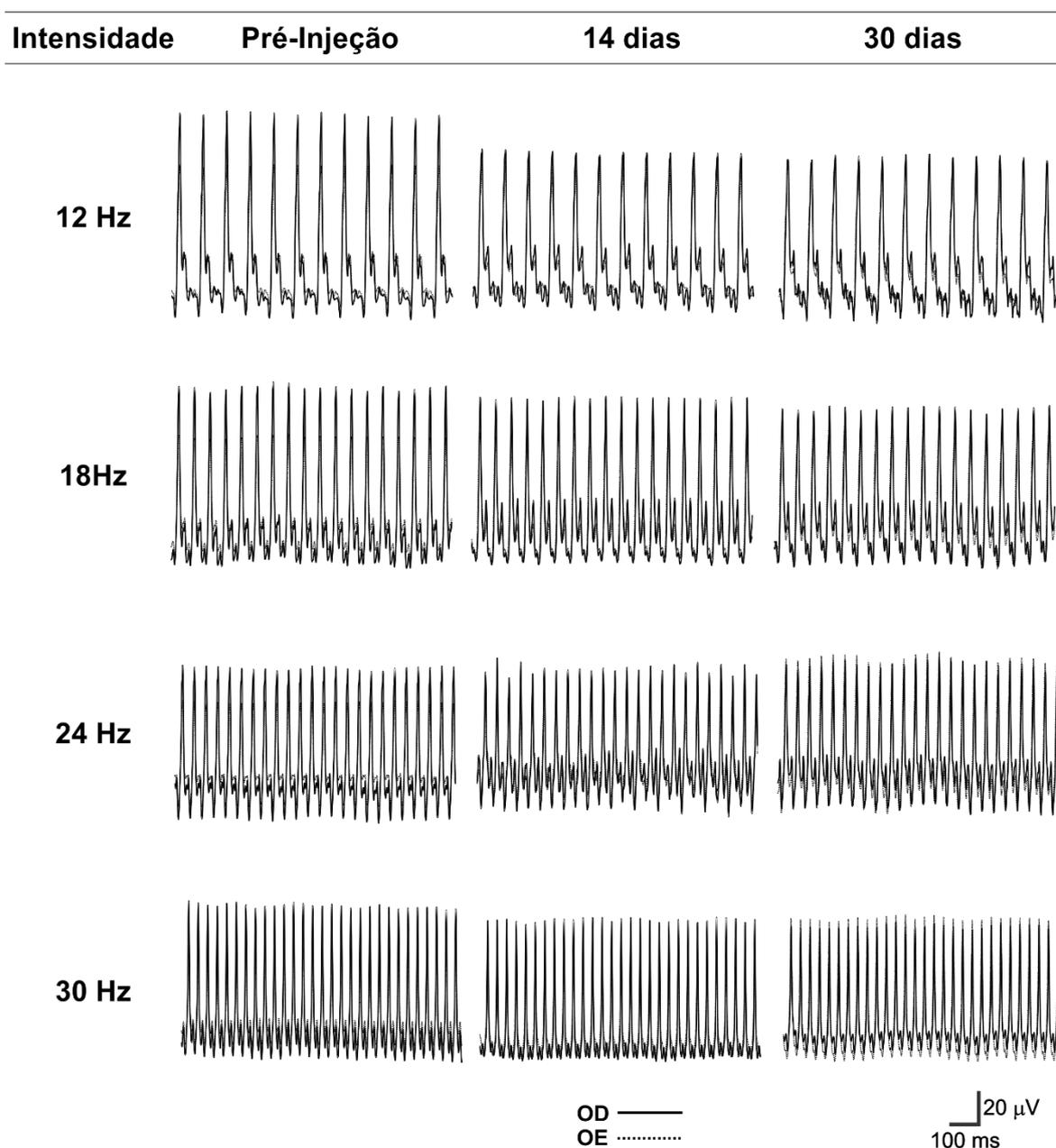


**Figura 28** – ERGs fotópicos de um mesmo animal em que foi injetado com 1mg/mL de MPA na cavidade vítrea, para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro, pré-injeção, 14 e 30 dias após a injeção de MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

A comparação entre olhos com MPA e olhos com veículo, realizada no teste estatístico descrito, não foi significativa para nenhuma das doses de MPA testadas, não havendo diferenças entre as doses de MPA e o veículo utilizado como controle.

Na figura abaixo (fig.29) são apresentados os traçados do ERG em resposta a estímulos intermitentes (flicker) nas quatro frequências testadas: 12, 18, 24 e 30 Hz no estudo de toxicidade do MPA, na dose de 1mg (olho controle – linha tracejada e olho experimental com MPA – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-injeção, 14 e 30 dias após a injeção intravítrea de MPA).

### Flicker 1mg MPA



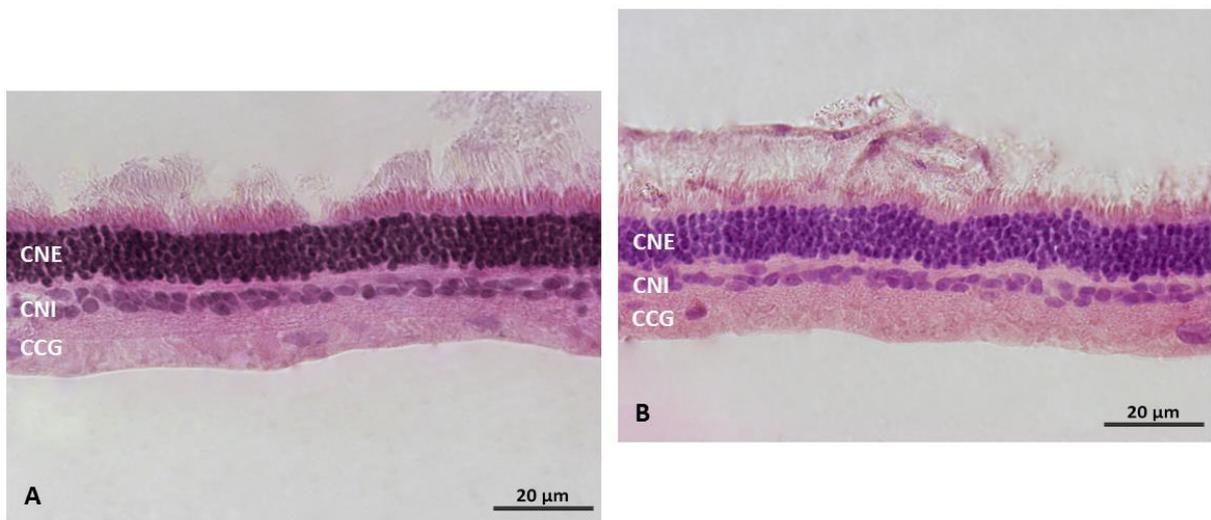
**Figura 29** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal injetado com a dose de 1mg/mL de MPA nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

A amplitude do 1<sup>o</sup> harmônico da onda foi obtida através da transformada de Fourier com o auxílio do programa MatLab (The Math Works, EUA) para o grupo de estudo da toxicidade do MPA (doses de 0,1 e 1mg). A análise estatística não mostrou diferenças para a análise do primeiro harmônico (amplitude e fase) em ambas doses testadas, não havendo assim diferenças entre os olhos injetados com MPA e os injetados com veículo.

## 5.2.2 Análise Morfológica

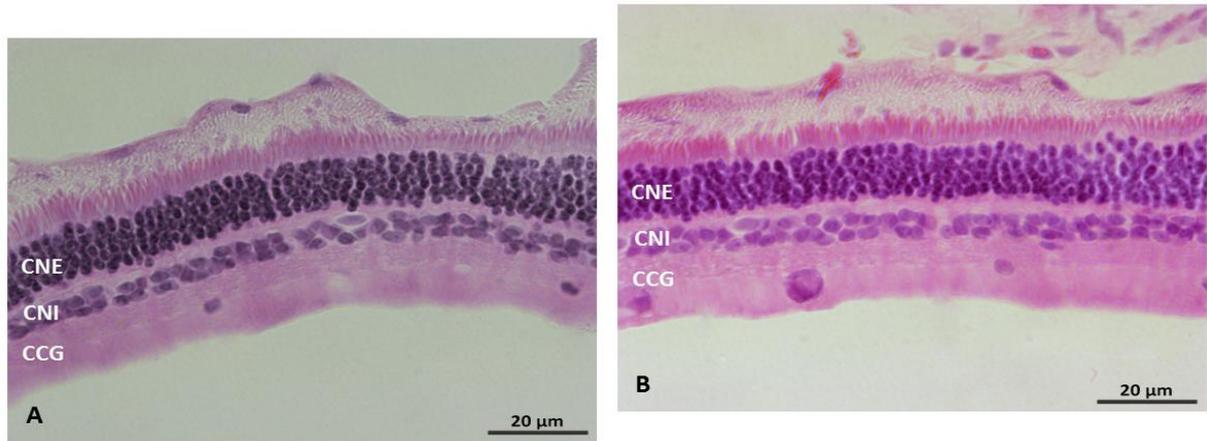
### 5.2.2.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

A análise morfológica feita por meio da técnica de hematoxilina e eosina não evidenciou alterações na estrutura retiniana, cortes radiais do eixo dorso-ventral dos olhos em que foram injetados MPA (doses de 0,1 e 1mg) e olhos controles em que foram injetados veículo, foram analisados e não apresentaram diferenças na região analisada. É importante ressaltar que não temos como dizer se houve algum dano pontual em alguma outra região retiniana específica, pois somente foi analisada a região central, tendo o nervo óptico como referência. A figura 30 apresenta um exemplo de um olho injetado com a dose de 0,1mg de MPA e um olho controle injetado com veículo, corados com HE.



**Figura 30** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – dose de 0,1mg de MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20µm (micrometros).

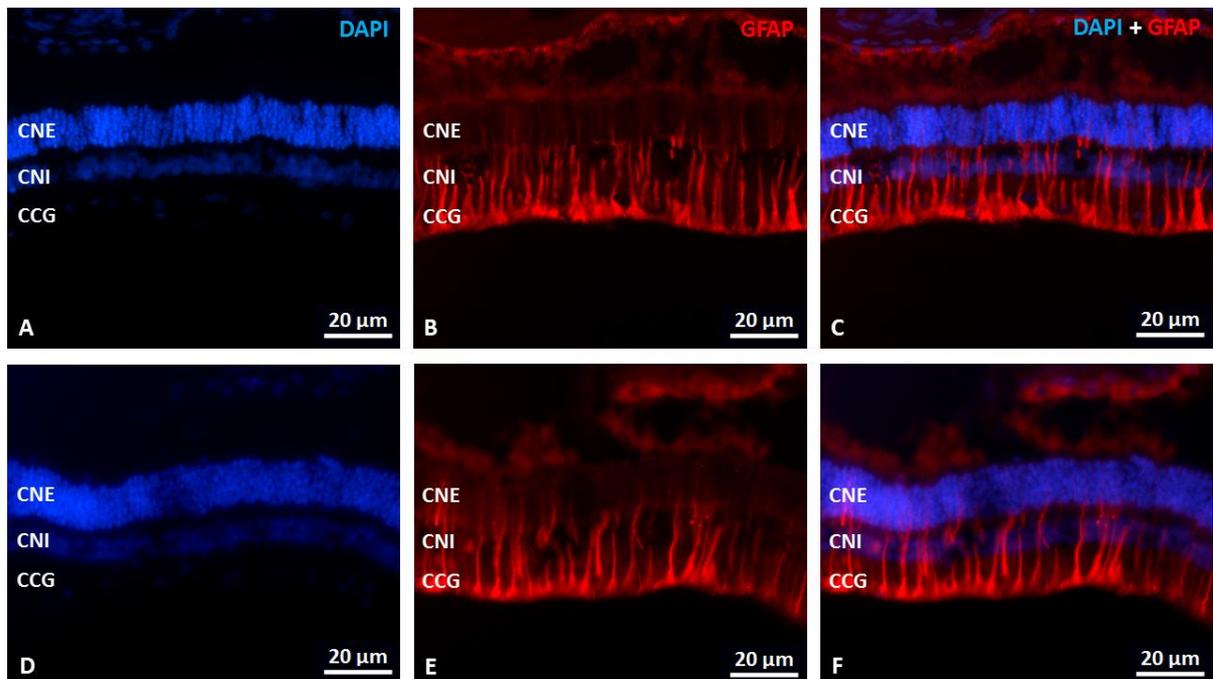
A figura 31 apresenta um exemplo de um olho injetado com a dose de 1mg de MPA e seu respectivo controle, corados com HE.



**Figura 31** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – dose de 1mg de MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20µm (micrometros).

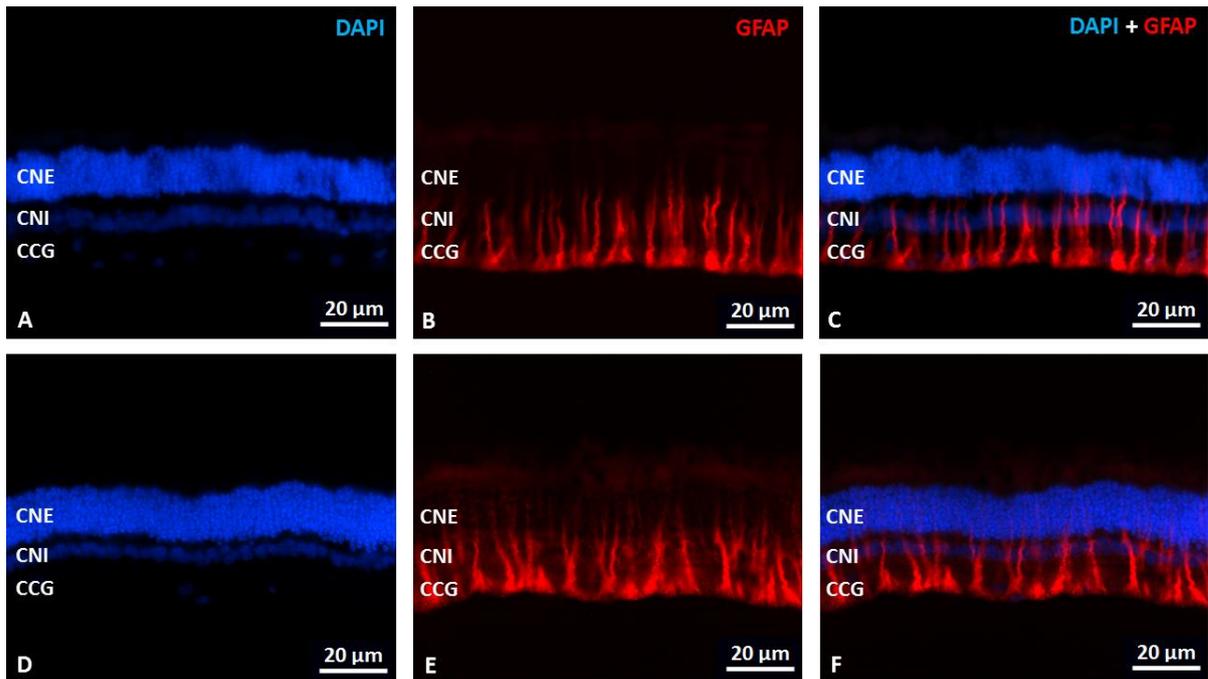
### 5.2.2.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP

A imunomarcagem para a proteína GFAP foi positiva para os olhos injetados com MPA 0,1 e 1mg/mL e para os olhos injetados com veículo, apresentados respectivamente nas Figuras 32 e 33, nas quais temos núcleos celulares marcados com DAPI em azul e as células de Müller marcadas em vermelho para a proteína GFAP.



**Figura 32** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado no estudo de toxicidade do MPA. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle, que receberam veículo. D, E, F - cortes do olho experimental (direito) – dose de 0,1mg/mL de MPA. **A)**

corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado positivamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com 0,1mg de MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com 0,1mg de MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrometros)



**Figura 33** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado no estudo de toxicidade do MPA. A, B, C - os cortes do olho esquerdo – controle, que receberam veículo. D, E, F - cortes do olho experimental (direito) – dose de 1mg de MPA. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado positivamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com 1mg de MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com 1mg de MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrometros).

Como podemos ver nas figuras acima, as camadas nucleares continuam preservadas, assim como ocorreu com os cortes corados com HE, porém tanto os olhos injetados com MPA (0,1 e 1mg) como seus respectivos controles, foram imunomarcados positivamente para a proteína GFAP, o que indica uma gliose das células de Müller, configurando um processo inflamatório, mesmo 30 dias após a injeção do MPA.

### 5.3 Modelo de Uveíte tratado com MPA

#### 5.3.1 Achados clínicos

A Tabela 2 resume os achados clínicos para o grupo com UCE tratado com 0,1mg/mL de MPA.

Seis dias após a indução da uveíte (e 3 dias após a injeção intravítrea de MPA), foi realizado o primeiro exame clínico (os mesmos exames foram realizados antes da indução da UCE, não apresentando nenhuma alteração), 13% dos animais apresentaram hiperemia conjuntival intensa (3+), 40% apresentaram hiperemia moderada (2+) e os outros 40% apresentaram hiperemia leve (1+), que se manteve moderada até o período de pico da inflamação, a partir do 24º dia, a quantidade de células passou a diminuir, apresentando hiperemia leve (1+) em 28% dos animais no 48º dia, enquanto, 71% dos animais apresentavam conjuntiva calma.

Todos animais apresentaram córnea clara durante todo o experimento, porém 35% dos animais apresentaram neovascularização da córnea no 24º dia. Tal neovascularização foi observada até o 33º dia, onde somente um animal apresentava discretos neovasos. Ao fim dos experimentos não foram observados a presença de neovasos.

A reação inflamatória da câmara anterior foi considerada intensa em 53% dos animais, devido a presença de células (inflamatórias) (3+) e moderada (2+) em 40% dos animais. No 24º dia, 35% dos animais se mantiveram classificados de forma severa (3+) e 57% como moderada (2+). A partir de então o número de células começou a regredir e no 33º dia 50% dos animais foram classificados como moderado (2+) e 50% como leve (1+). Ao final dos experimentos 57% dos animais permaneceram classificados como moderado (2+) e 21% dos animais apresentaram total ausência de células. A presença de flare também se mostrou severa (3+) em 26% dos animais e moderada (2+) em 53% dos animais, porém 20% dos animais apresentou total ausência de células. Assim como ocorrido com a presença de células, a presença de flare se manteve estável durante o pico de inflamação. No 24º dia foi classificado como moderado (2+) em 35% dos animais e leve (1+) em 42% dos animais e 21% dos animais continuaram apresentando total ausência de flare. A partir do 33º dia o flare foi classificado como moderado (2+) em 14% dos animais e leve (1+) em 28% dos animais, porém 57% dos animais já apresentavam total ausência de flare. No final dos experimentos o flare se manteve classificado como leve (1+) em 28% dos animais, somente um animal apresentava flare moderado (2+) e 64% dos animais apresentaram total ausência de flare.

Quatorze dos quinze animais apresentaram catarata subcapsular no primeiro exame realizado, no 24º dia, todos animais apresentavam catarata, que é irreversível, se mantendo dessa forma até o final dos experimentos.

Foi observado ingurgitamento venoso da íris (obstrução dos vasos sanguíneos) em 86% dos animais na primeira avaliação, o mesmo regrediu e foi observado em 50% dos animais no 24º dia. Sendo observado em somente 14% dos animais no final dos experimentos.

Sinequias posteriores (aderência da íris ao cristalino) também foram observadas na íris, cerca de 20% dos animais apresentaram sinequias logo na primeira semana. No 24º dia esse número subiu para 57% e do 33º dia em diante se manteve em 42% até o termino dos experimentos.

Não foi observado a presença de hipópio (acumulo de pus na câmara anterior) em nenhum dos animais durante os 48 dias em que os mesmos foram avaliados.

A fundoscopia foi considerada normal, não havendo relato da presença de células inflamatórias no vítreo ou danos na retina e nervo óptico, contudo 6 animais apresentaram descolamento parcial da retina, em dois deles, o descolamento foi iniciado no 24º dia através da tração das fibras nervosas, seguidos de elevação das fibras no 33º dia e descolamento do feixe de fibras peripapilares no 48º dia, totalizando 6 animais. Nenhuma alteração foi encontrada nos olhos controles (olhos esquerdos).

O exame clínico do grupo tratado com MPA sugere que a UCE gerada é uma uveíte anterior, uma vez que a avaliação fundoscópica não demonstrou a presença de células inflamatória na câmara posterior (corpo vítreo). Mesmo tendo ocorrido o descolamento parcial da retina em 6 dos 15 animais utilizados.

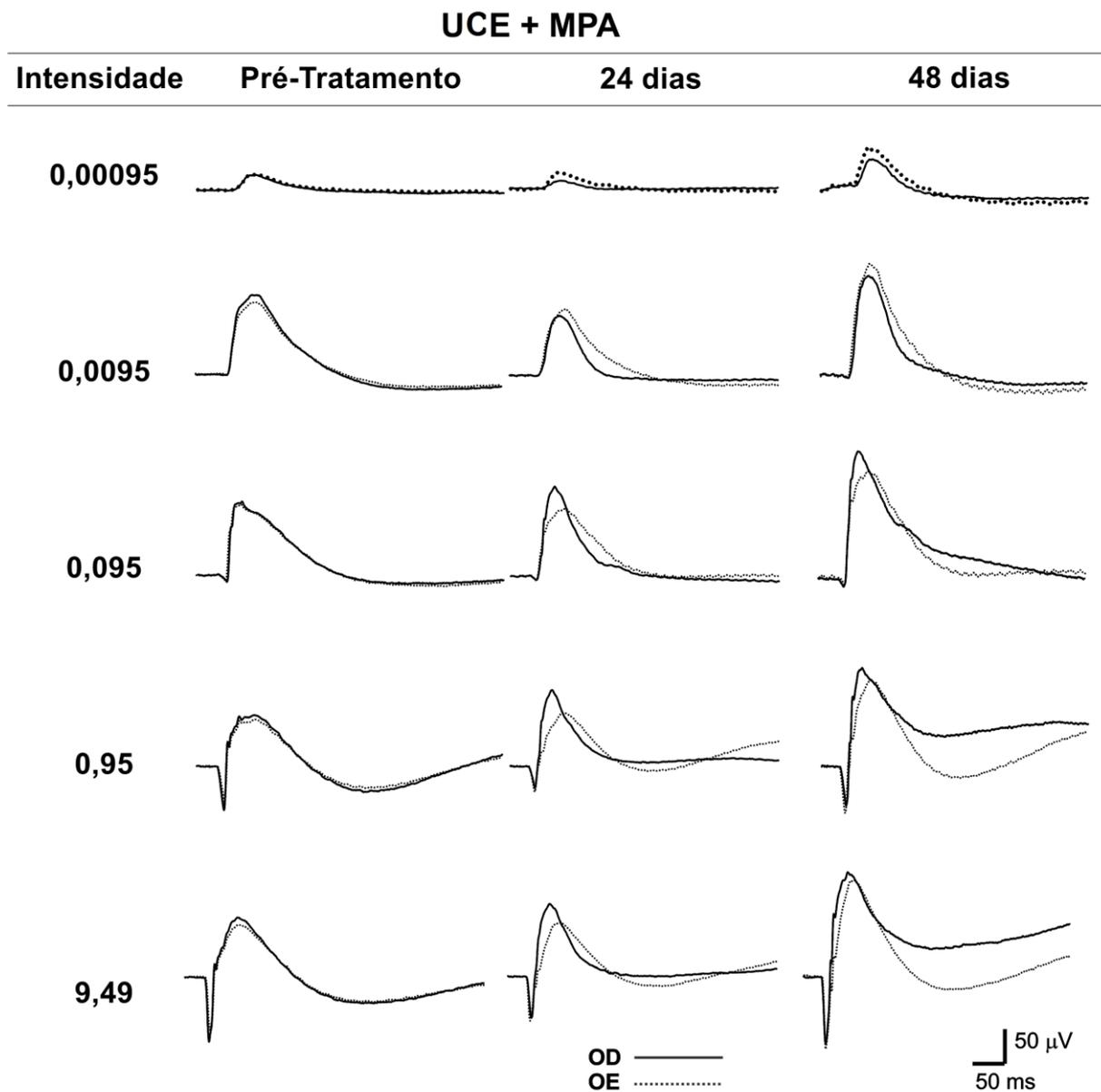
Infelizmente não foi possível realizar os exames clínicos no 17º dia, que seria o início do pico da inflamação, porém de acordo com o que foi observado no grupo de UCE, o período do pico se estende por alguns dias de forma estável, sendo assim, o 24º dia teria condições de reproduzir sem grandes diferenças o que estaria acontecendo a partir do 17º dia, lembrando-se que os processos inflamatórios começam a regredir após o 24º dia.

**Tabela 2** – Achados clínicos do modelo de uveíte crônica experimental tratado com MPA, mostrando o desenvolvimento do quadro clínico.

Dias	Conjuntiva			Córnea		células			Flare			Cristalino		Inquirtamento - Iris		Sinequia		Hipópio		
	calma	1+	2+ 3+	clara	neovasos	ausente	1+	2+ 3+	ausente	1+	2+ 3+	transparente	catarata	presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente	
06 dias (n=15)	1	6	6 2	15			1	6 8	3	8 4	1	14		13	2	3	12		15	
17 dias (n=14)																				
24 dias (n=14)	8	4	2	14	5		1	8 5	3	6 5		14		7	7	8	6			14
33 dias (n=14)	9	5		14	1		7	7	8	4 2		14		4	10	6	8			14
48 dias (n=14)	10	4		14		3	3	8	9	4 1		14		2	12	6	8			14

### 5.3.2 Eletrorretinograma

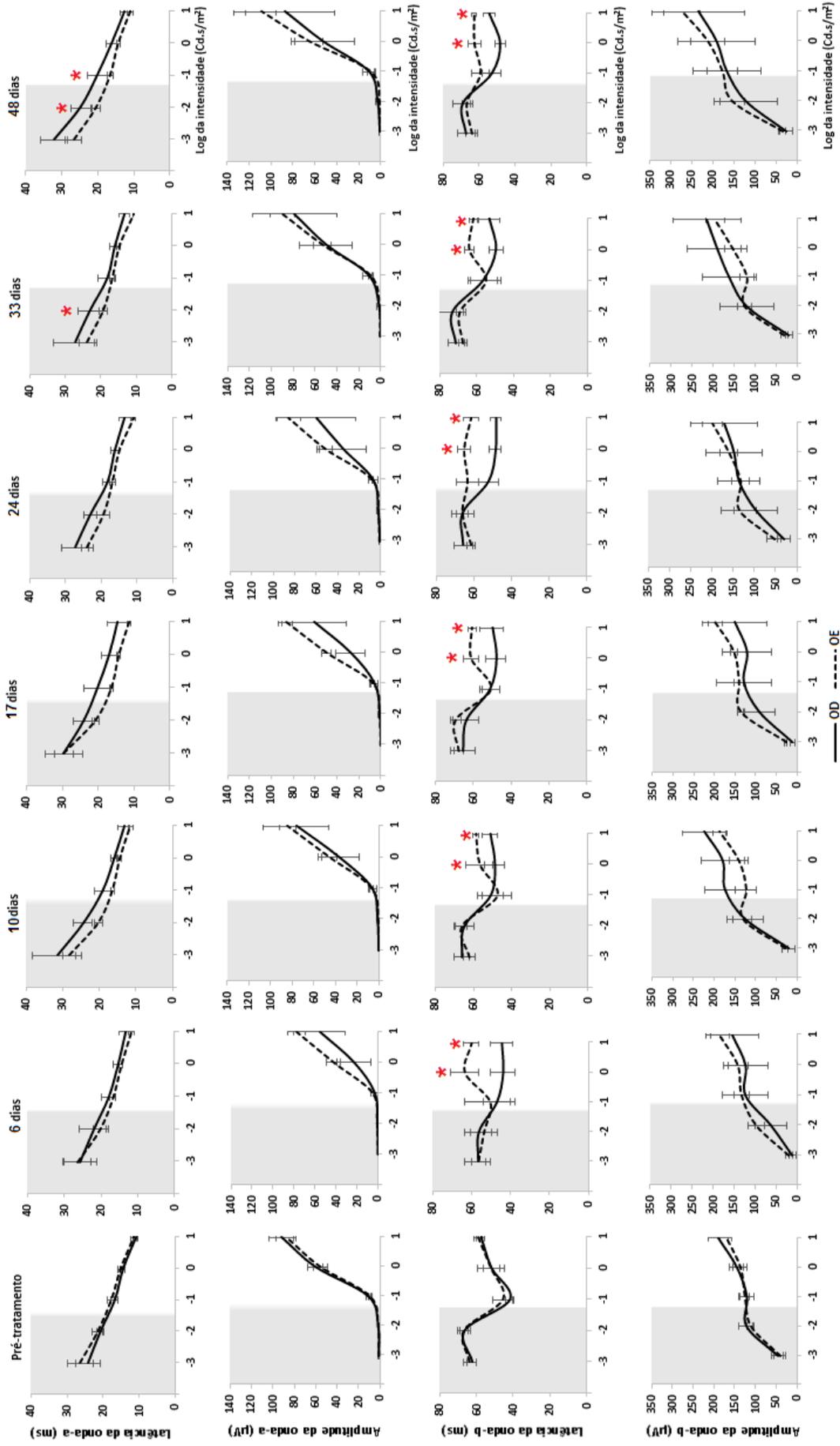
Podemos observar na figura 34 a representação das respostas escóticas nas intensidades testadas no modelo de UCE tratado com 0,1mg/mL de MPA (olho controle – linha tracejada e olho experimental com uveíte + MPA – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT).



**Figura 34** – ERGs escóticos de um mesmo animal modelo de UCE com MPA em três dias distintos, pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

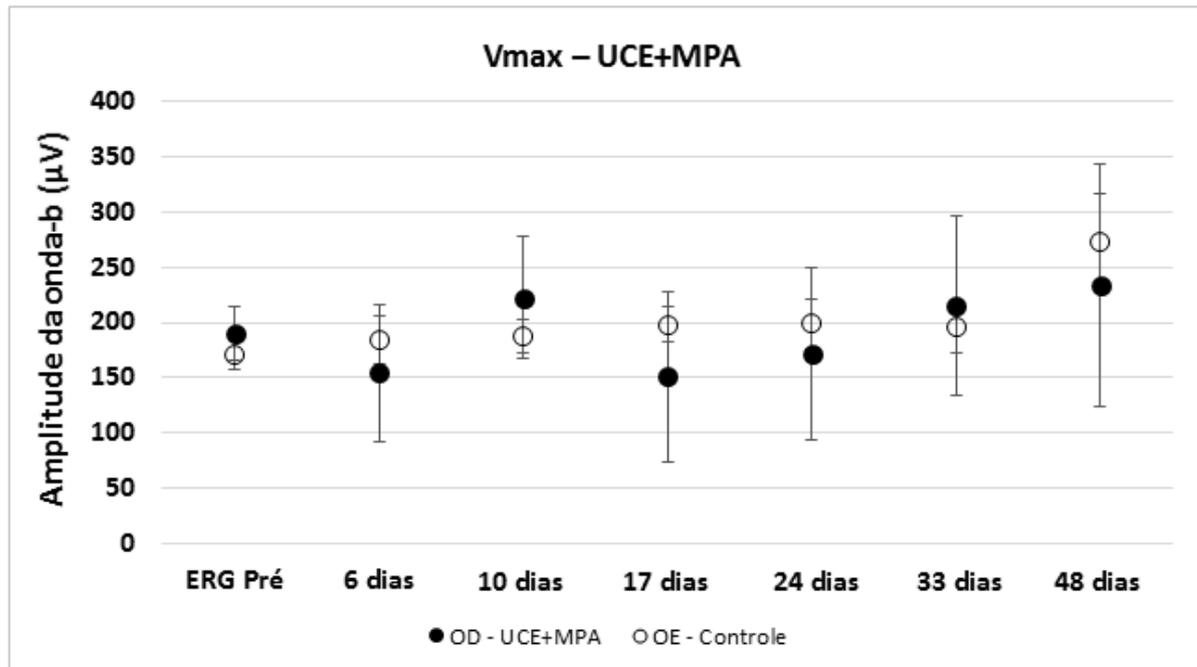
A amplitude e a latência das ondas-a e b foram descritas graficamente em média e desvio padrão, para a condição escotópica nas cinco intensidades testadas ( $0,00095 = \text{Log I} - 3$ ;  $0,0095 = \text{Log I} - 2$ ;  $0,095 = \text{Log I} - 1$ ;  $0,95 = \text{Log I} 0$  e  $9,5 \text{ cd.s/m}^2 = \text{Log I} 1$ ) em todos os dias de registro (Pré-tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção de MT) (fig.35). A comparação entre olhos com uveíte e MPA e olhos controles, realizada no teste estatístico descrito, foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciando as seguintes diferenças:

- Latência da onda-a (escotópico) para Log I -2 para os dias 33 e 48 (F= 2,57 P= 0,02);
- Latência da onda-a (escotópico) para Log I -1 para o dia 48 (F= 3,6 P= 0,003);
- Latência da onda-b (escotópico) para Log I 0 para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (F= 8,48 P= 0,001);
- Latência da onda-b (escotópico) para Log I 1 para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (F= 5,83 P= 0,003);



**Figura 35** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 logs respectivamente) no modelo de UCE com MPA, nos dias pré-Tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0,05).

A figura 36 apresenta as médias da amplitude da resposta saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) para o dia pré-injeção e ao longo dos 48 dias de ação da droga na dose de 0,1mg/mL MPA na UCE.



**Figura 36** – Médias da resposta saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) no dia pré-tratamento e ao longo dos 48 dias de ação de 0,1mg/mL MPA no olho com UCE. Círculos fechados correspondem ao olho com UCE e MPA (OD: olho direito), círculos abertos correspondem ao olho controle (OE: olho esquerdo).

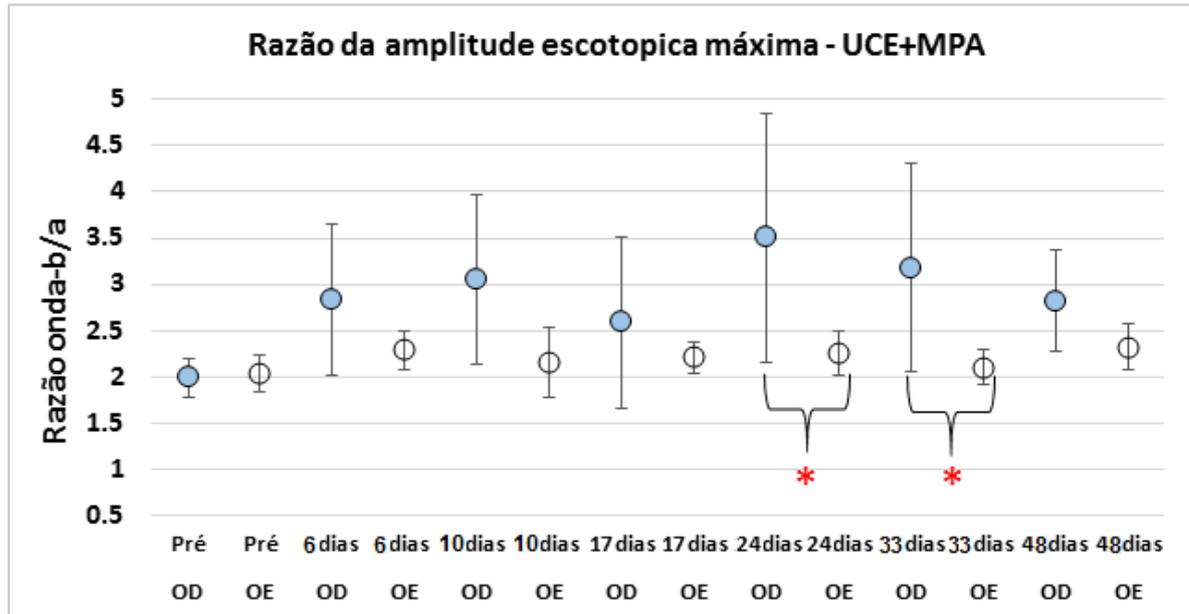
A figura 37 apresenta a razão da amplitude escotópica máxima da onda-b sobre a amplitude da onda-a ( $b/a$ ) na UCE tratado com MPA (0,1mg/mL).

A comparação estatística entre olhos com UCE tratados com 0,1mg/mL de MPA e olhos controles para a razão da amplitude de  $b/a$  mostrou diferença significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciou as seguintes diferenças:

- A razão de  $b/a$  difere nos dias 24 e 33 após a injeção intravítrea de MPA ( $F=3,80$   $P=0,0003$ );

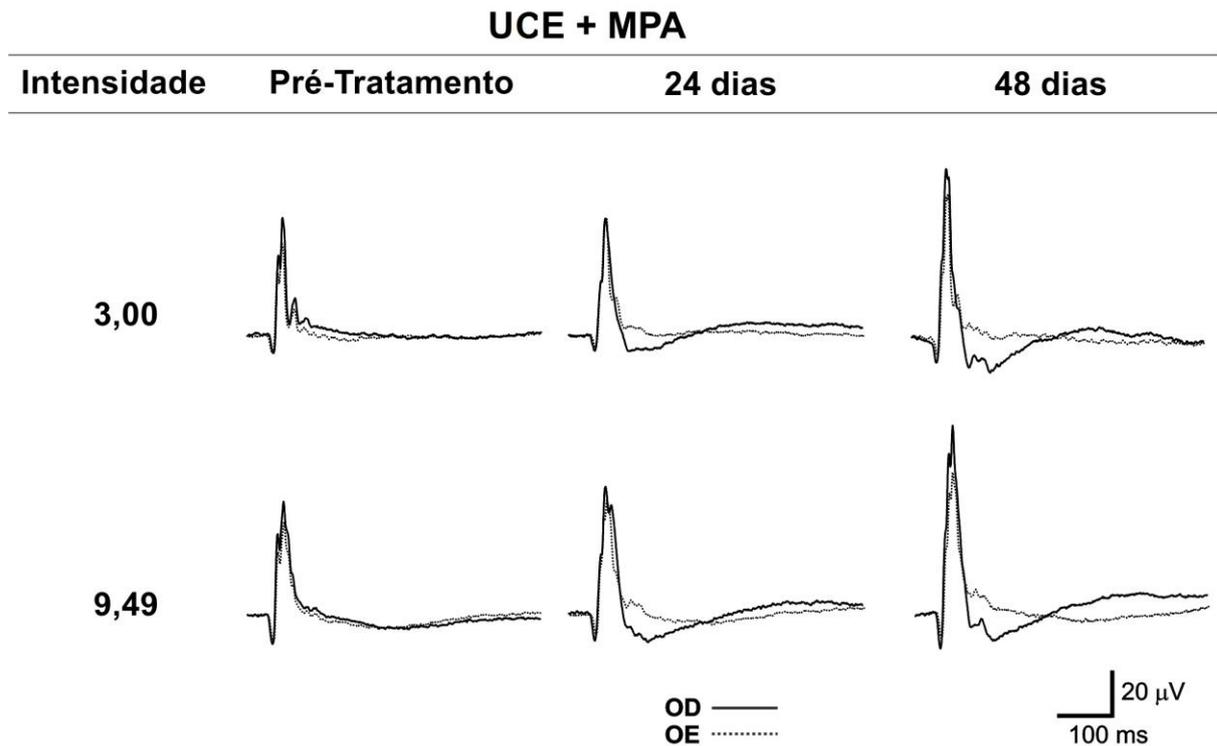
Os resultados da razão de  $b/a$  para o grupo de UCE tratado com 0,1mg de MPA, como podemos ver na Figura 37, estão bem próximos de 2 e superior a 2 na maioria dos dias de registro. Nos dias 24 e 33 as diferenças entre os dois grupos foram estatisticamente

significativas, o que nesse caso indica o acometimento da retina externa, evidenciando alterações nos fotorreceptores.



**Figura 37** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de b/a ao longo do desenvolvimento da UCE tratada com a dose de 0,1mg/mL de MPA. Barras verticais: desvio padrão; OD: olho direito (círculos fechados); OE: olho esquerdo (círculos abertos). Os asteriscos representam significância estatística: P=0,0003.

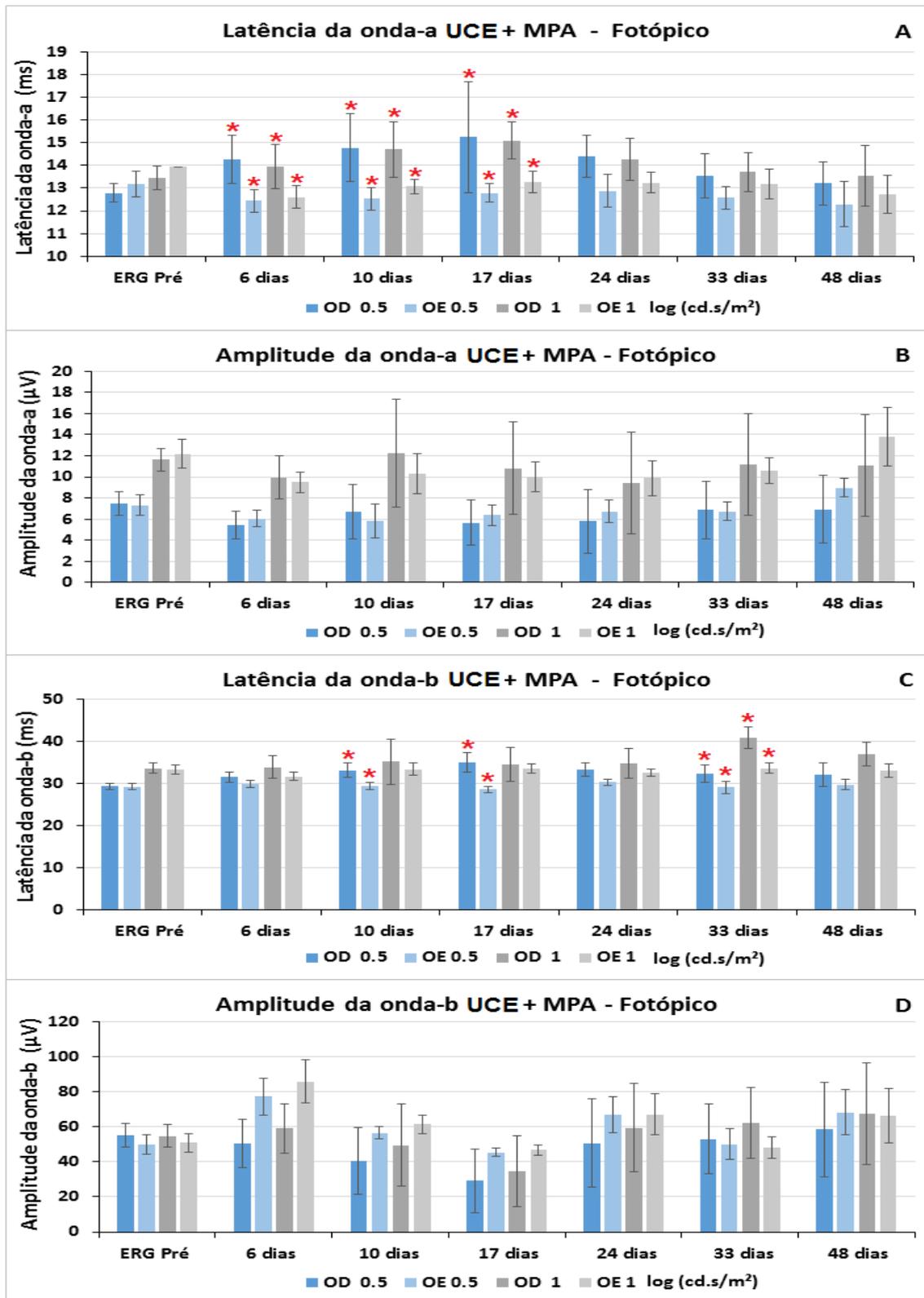
A figura 38 apresenta ERGs fotópicos das intensidades testadas no modelo de UCE tratado com MPA (olho controle – linha tracejada e olho experimental com uveíte + MPA 0,1mg/mL – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção de MPA).



**Figura 38** – ERGs fotópicos de um mesmo animal modelo de UCE tratado com 0,1mg/mL de MPA para as duas intensidades testadas em três dias distintos de registro, pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. Intensidade:  $\text{cd.s/m}^2$ ; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

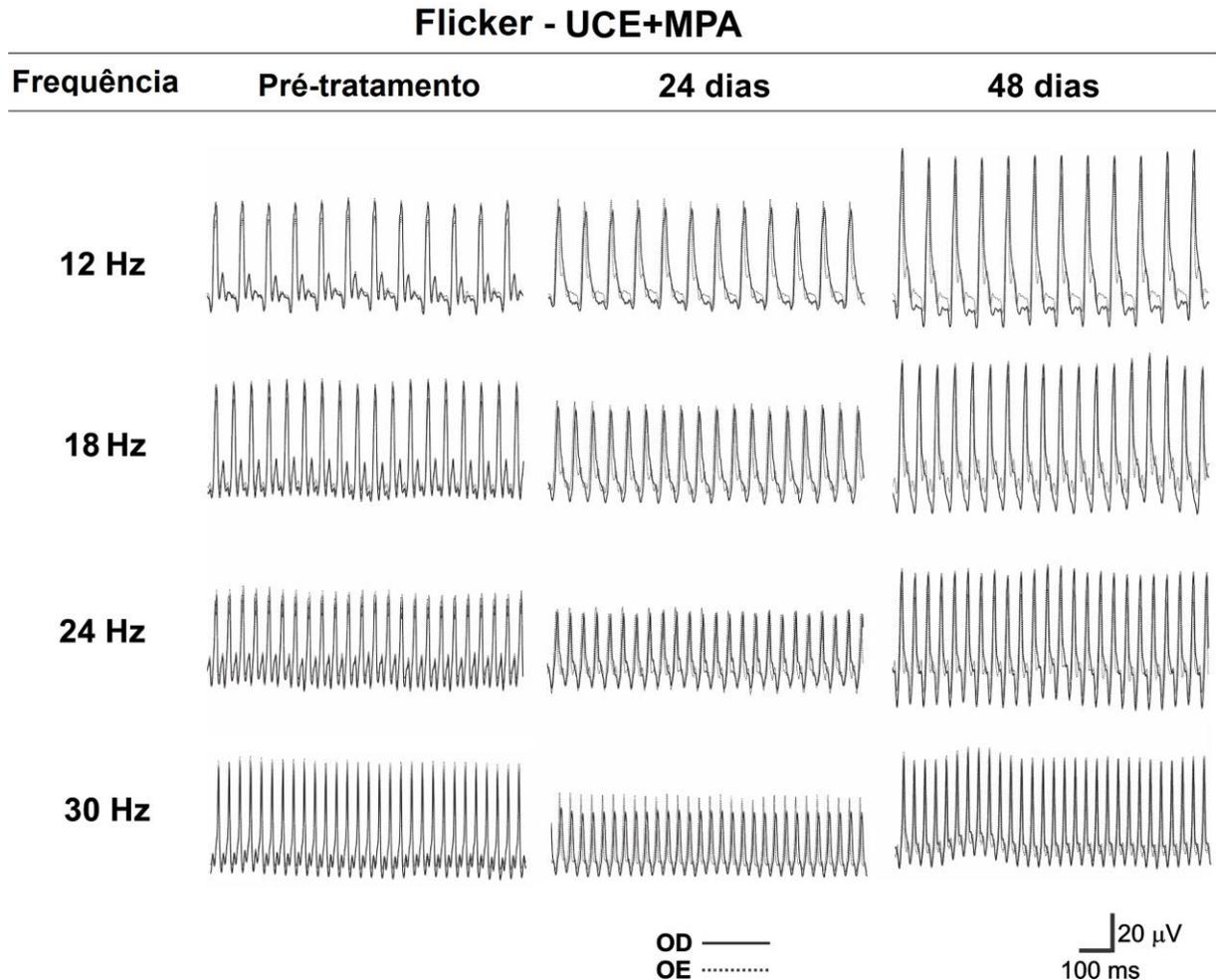
As médias e desvios padrão da amplitude e da latência das ondas-a e b para a condição fotópica nas duas intensidades testadas ( $3,0 = \text{Log I } 0,5$ ;  $9,49 \text{ cd.s/m}^2 = \text{Log I } 1$ ) em todos os dias de registro (Pré-tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT) são apresentadas na figura 39. A comparação estatística entre olhos com uveíte tratados com MPA e olhos controles, foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey test, evidenciou as seguintes diferenças:

- Latência da onda-a (fotópico) para Log I 0.5 para os dias 6, 10 e 17 ( $F= 3,5$ ,  $P= 0,003$ );
- Latência da onda-a (fotópico) para Log I 1 para os dias 6, 10 e 17 ( $F=3,6$   $P= 0,002$ );
- Latência da onda-b (fotópico) para Log I 0.5 para os dias 10, 17 e 33  $F= 7, 14$   $P=0,001$ );
- Latência da onda-b (fotópico) para log I 1 para o dia 33 ( $F= 5,3$   $P= 0,003$ );



**Figura 39** – Médias das amplitudes e latências das ondas-a e -b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49 cd.s/m<sup>2</sup> (0.5 e 1 log respectivamente) no grupo UCE com MPA, nos dias pré-tratamento, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: desvio Padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*=P<0,05).

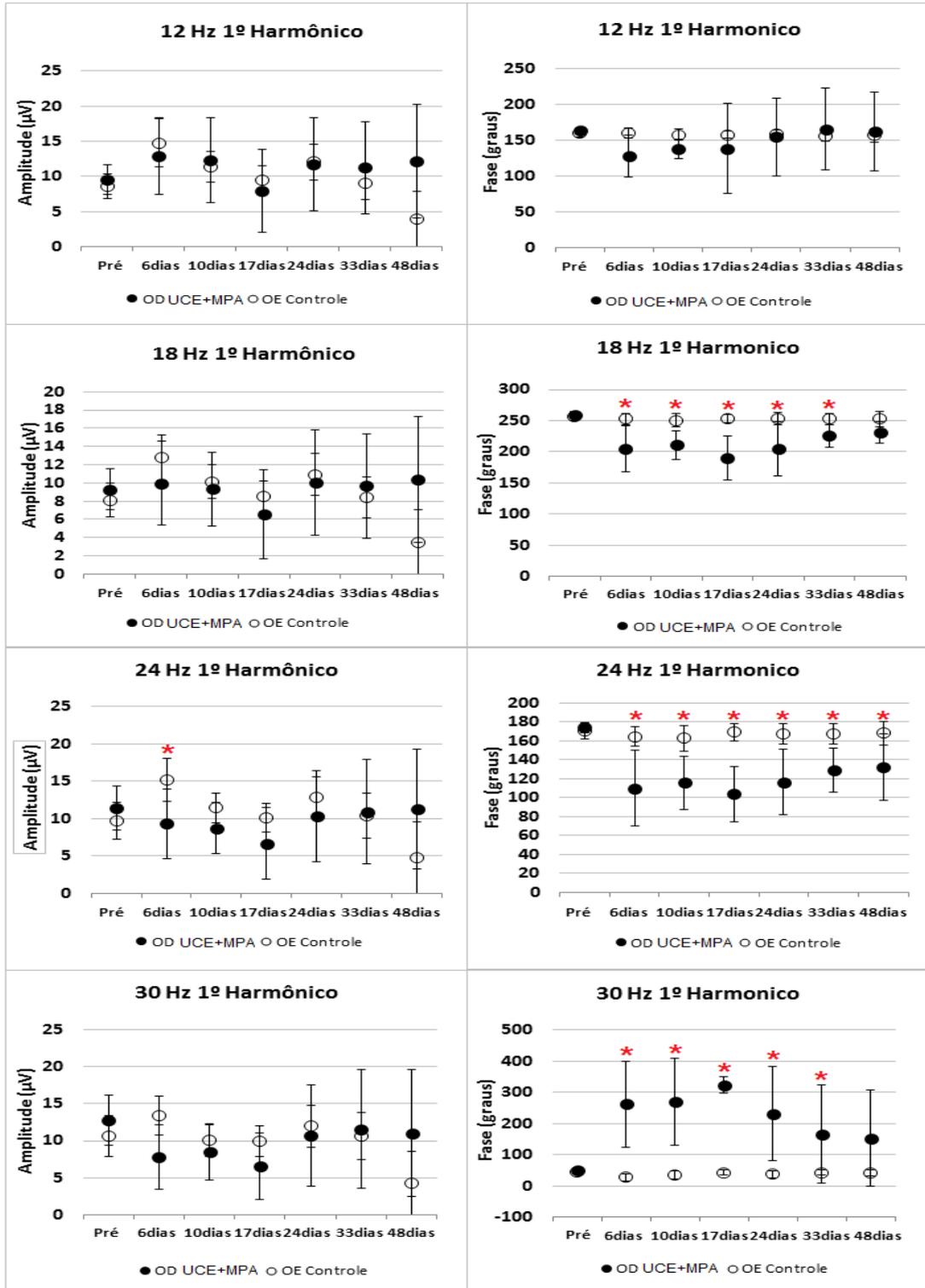
Na figura abaixo (fig.40) apresentamos os ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) nas quatro frequências testadas: 12, 18, 24 e 30 Hz no modelo de uveíte com 0,1mg/mL de MPA (olho controle – linha tracejada e olho experimental com UCE + MPA – linha contínua) durante 3 sessões do ERG (pré-tratamento, 24 e 48 dias após a injeção intravítrea de MT).



**Figura 40** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de um mesmo animal modelo de UCE tratado com MPA nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos;  $\mu\text{V}$ : microvolts.

A amplitude do 1º harmônico da onda foi obtida através da transformada de Fourier com o auxílio do programa MatLab (The Math Works, EUA). Na figura 41 podemos comparar as médias das amplitudes e fases em resposta às frequências 12, 18, 24, e 30 Hz no modelo de UCE tratado com MPA. A comparação estatística entre olhos com uveíte e MPA e olhos controles foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey test, evidenciou as seguintes diferenças para a amplitude do 1º harmônico: 24 Hz para o dia 6 ( $F= 2,40$   $P= 0,03$ )

e para a fase do 1º harmônico: 18 Hz para os dias 6, 10, 17, 24 e 33 (F=7,78 P= 0,001), 24 Hz para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (F= 7,19 P=0,001), 30 Hz para os dias 6, 10, 17, 24 e 33 (F= 8,49 P=0,001).



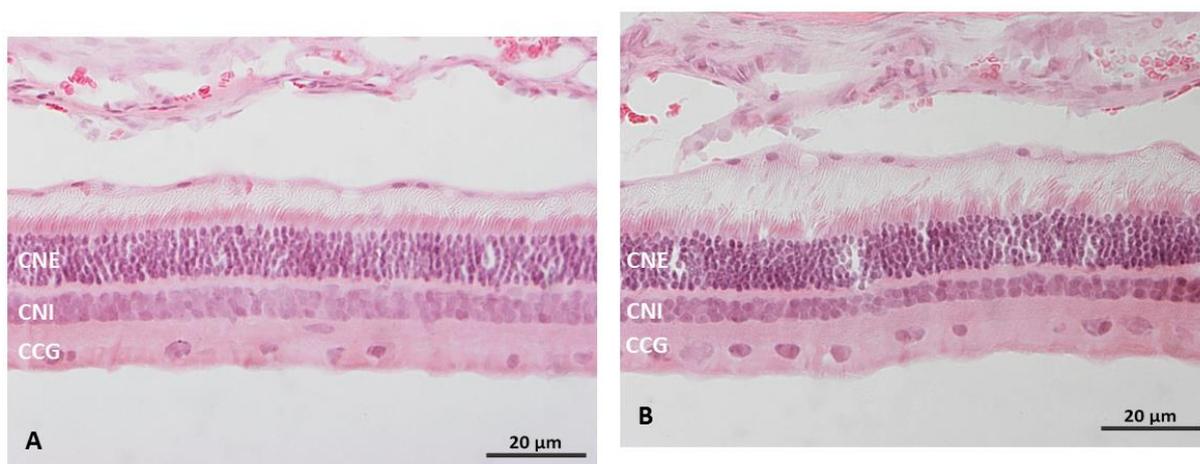
**Figura 41** – Valores médios e respectivos desvios padrão das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30

Hz) para UCE tratada com MPA. Barras verticais: desvio padrão; OD: olho direito; OE: olho esquerdo (\*= $P < 0,05$ ).

### 5.3.3 Análise Morfológica

#### 5.3.3.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

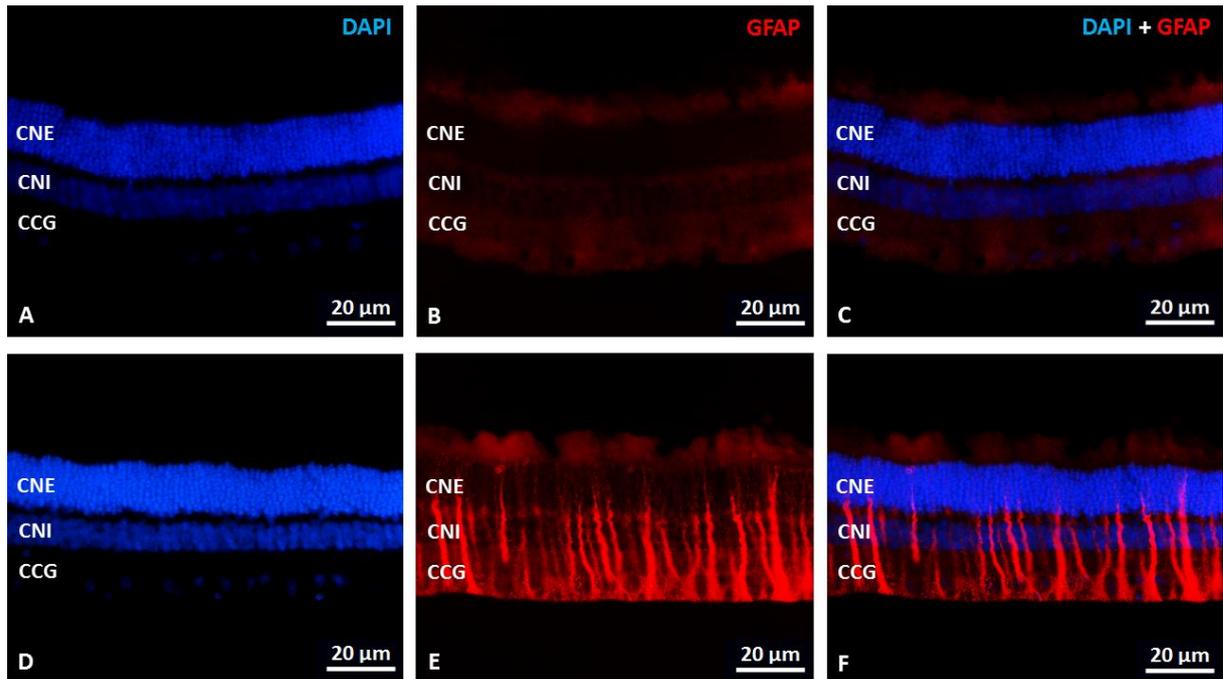
A análise morfológica feita por meio da técnica de hematoxilina e eosina não evidenciou alterações na estrutura retiniana, cortes radiais do eixo dorso-ventral dos olhos com UCE tratados com MPA na dose de 0,1mg/mL e olhos controles foram analisados e não apresentaram diferenças na região analisada. É importante ressaltar que não temos como dizer se houve algum dano pontual em alguma região retiniana específica, pois somente foi analisada a região central, tendo o nervo óptico como referência. A figura 42 mostra um exemplo de um olho com UCE tratado com MPA e um controle, corados com HE.



**Figura 42** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE tratados com MPA. **A)** corte radial do olho esquerdo – controle. **B)** corte radial do olho experimental – com UCE e MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20µm (micrometros).

#### 5.3.3.2 Imunohistoquímica para proteína GFAP

A imunomarcagem para a proteína GFAP foi positiva somente para os olhos com UCE tratados com MPA (não foi positiva para o controle). Como podemos ver na figura 43 temos núcleos celulares marcados com DAPI em azul e as células de Müller marcadas em vermelho para a proteína GFAP.



**Figura 43** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de um coelho albino utilizado como modelo de UCE tratado com MPA. A, B, C - cortes do olho esquerdo – controle. D, E, F - cortes de um olho direito – com UCE + MPA. **A)** corte radial do olho controle marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **B)** mesmo corte radial do olho controle imunomarcado negativamente para a proteína GFAP; **C)** Sobreposição das imagens A e B. **D)** corte radial do olho com UCE + MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; **E)** mesmo corte radial do olho com UCE + MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; **F)** Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrômetros).

Como podemos ver na figura 43, as camadas nucleares continuam preservadas, assim como ocorreu com os cortes corados com HE, porém o olho com UCE tratado com MPA foi imunomarcado positivamente para a proteína GFAP, o que indica uma gliose das células de Müller, apresentando um processo inflamatório, mesmo 48 dias após a indução da uveíte.

## 5.4 Avaliação do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de UCE

### 5.4.1 Achados Clínicos – Grupo tratado x não tratado

Podemos dizer que a progressão da inflamação do grupo de UCE não tratado comparado ao grupo de UCE tratado com MPA foi semelhante, ambos reproduziram uma UCE limitada que tende a regredir sozinha com o passar do tempo, porém algumas diferenças podem ser ressaltadas, que poderiam indicar um possível efeito terapêutico da dose de 0,1mg/mL de MPA utilizada.

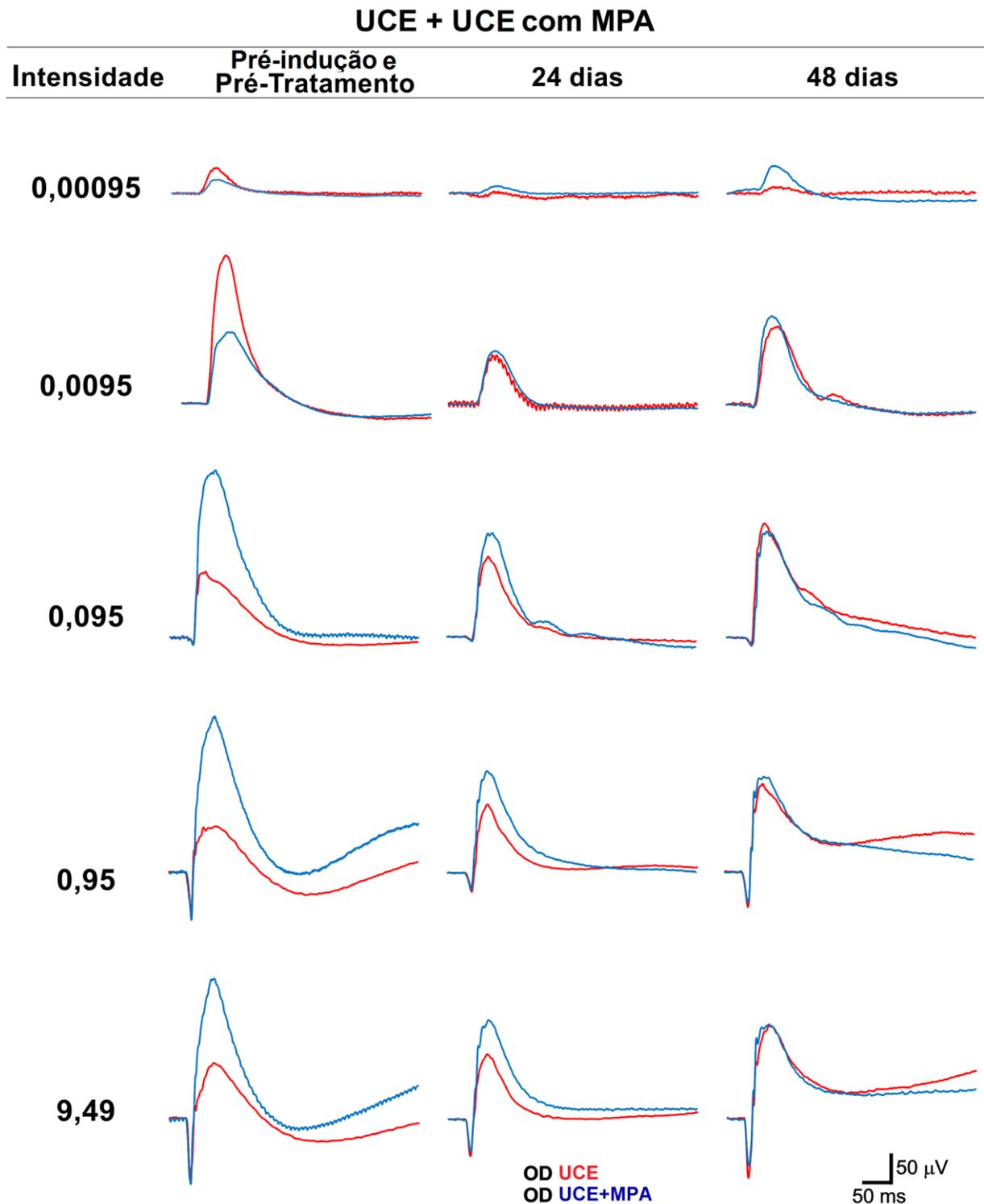
Os dois grupos apresentaram uma progressão similar, com uma inflamação moderada na câmara anterior, porém o grupo tratado com MPA apresentou uma inflamação mais intensa logo no início (primeira avaliação) se comparada com o grupo sem tratamento (presença de células inflamatórias e flare) e o tempo de surgimento de catarata foi menor, porém o grupo tratado com MPA mostrou uma recuperação mais rápida e efetiva a partir do pico de inflamação, apresentando uma menor incidência, assim como melhora significativa do ingurgitamento venoso da íris e sinequias. A melhora das sinequias pode ser vista de forma significativa diminuindo de 57% para 42% no final dos experimentos.

As sinequias sem o tratamento adequado, cursam para a piora do quadro clínico, sendo necessário em alguns casos de intervenção cirúrgica. O tratamento é realizado por meio de colírios de corticoide associados a agentes miométricos (tropicamida), para reduzir o processo inflamatório e manter a íris dilatada, consequentemente, mais afastada do cristalino, na tentativa de evitar a formação de sinequias. A melhora e menor incidência das sinequias observada no grupo tratado, pode ser explicada pelo uso da medicação contra a uveíte (MPA), juntamente com o uso contínuo do colírio miométrico a base de tropicamida, que foi utilizado durante todo experimento, tanto nos ERGs, como para biomicroscopia e injeções intravítreas.

O grupo tratado com MPA apresentou descolamento dos feixes das fibras peripapilares da retina em 6 animais, o que progressivamente acarretaria no descolamento total da retina. O descolamento foi observado logo após o período de pico de inflamação, o que não foi observado no grupo sem tratamento. Uma hipótese para explicar esse fato, seria de que o olho já estaria debilitado devido ao processo inflamatório, que após a injeção intravítrea de MPA, ainda recebeu mais uma injeção intravítrea com a segunda dose de MT, para reproduzir uma inflamação crônica recidivante. O olho estava extremamente sensível, após receber três injeções intravítreas em um curto espaço de tempo, o que pode ter favorecido o descolamento de retina.

#### **5.4.2 Eletroretinograma**

A figura 44 apresenta as respostas escóticas nas intensidades testadas, comparando o modelo de UCE (em vermelho) com o modelo tratado com 0,1mg/mL MPA (em azul), durante 3 sessões do ERG (pré-indução/pré-tratamento, 24 e 48 dias após injeção intravítrea de MT).



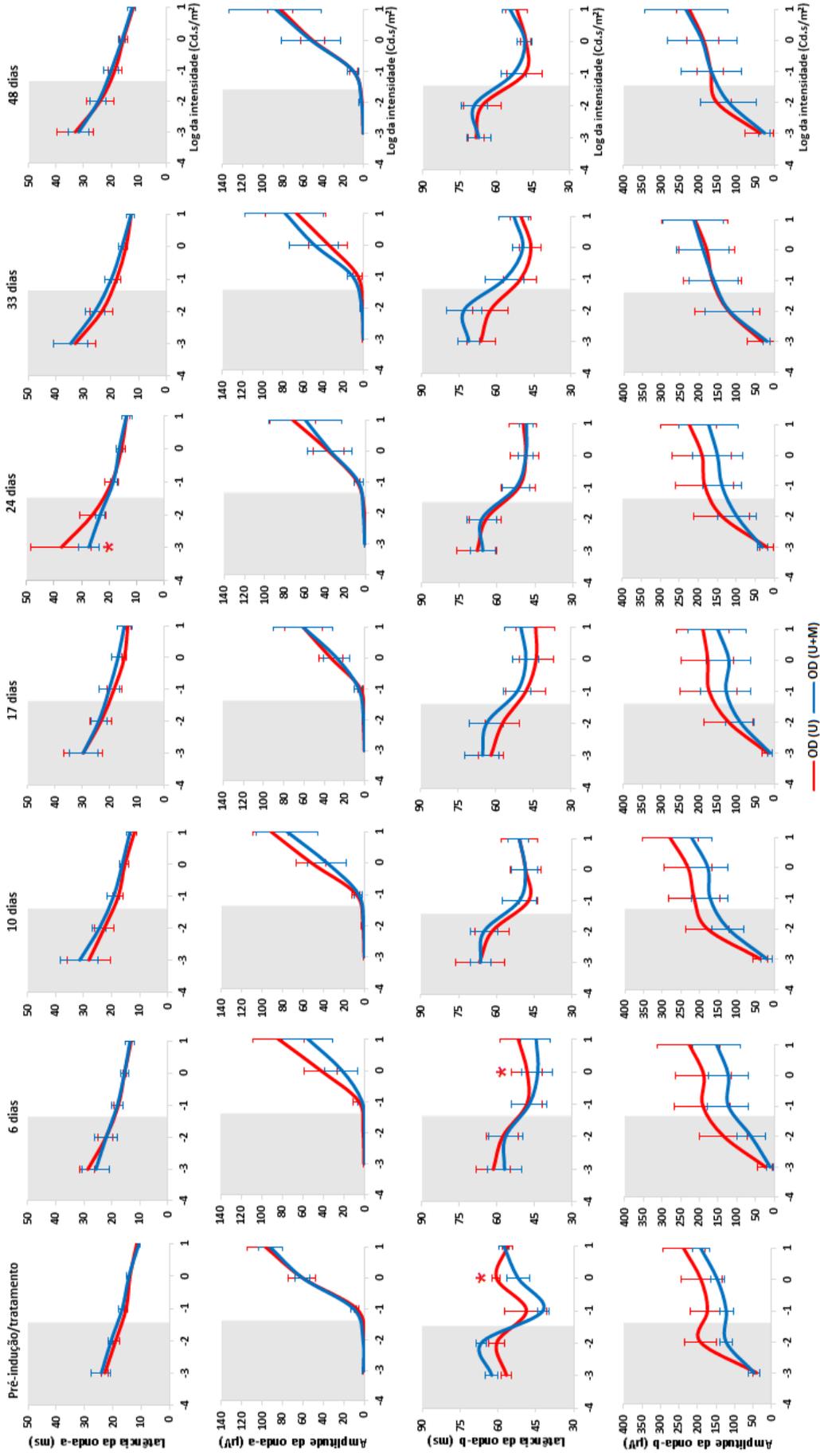
**Figura 44** - ERGs escotópicos de dois animais registrados em três dias distintos: pré-indução/pré-tratamento, 24 dias e 48 dias após a indução da UCE. Em vermelho o modelo de UCE e em azul modelo de UCE tratado com MPA. Intensidade: cd.s/m<sup>2</sup>; OD: olho direito; OE: olho esquerdo; ms: milissegundos; μV: microvolts.

Como podemos observar na figura 44, os dados possuem uma grande variabilidade, mesmo sem a realização de nenhum procedimento experimental, nesse caso a variabilidade é

maior que nos outros grupos porque os registros são de animais diferente e tempos diferentes, mas mesmo assim, no final dos experimentos podemos observar uma sobreposição das ondas.

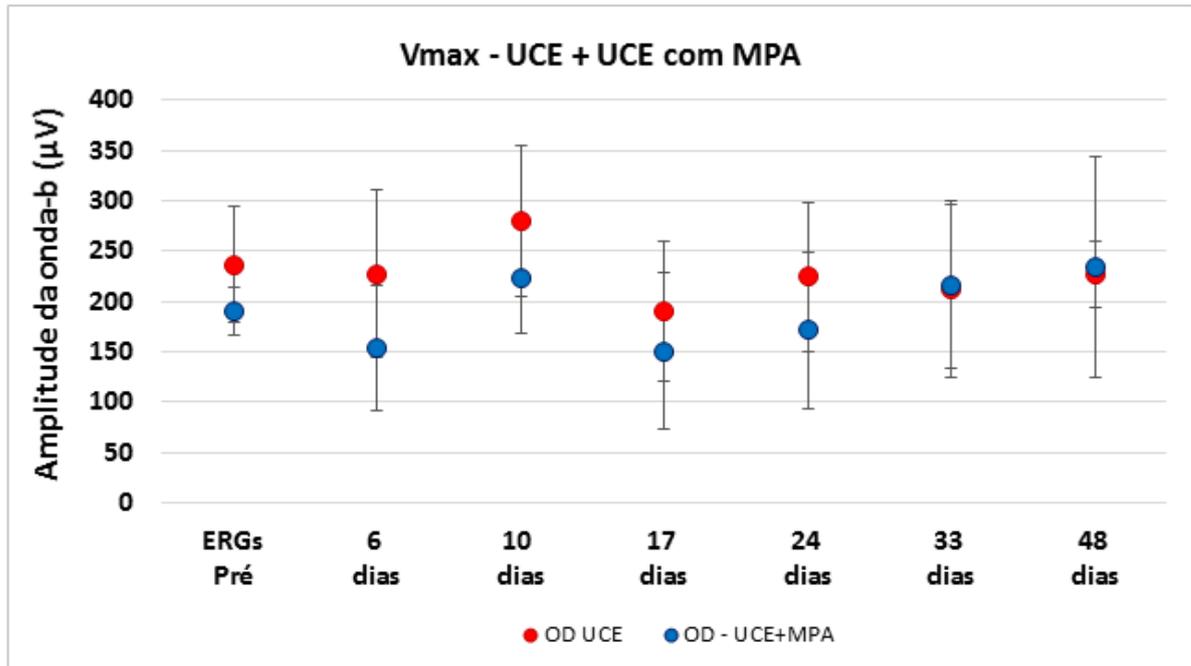
As amplitudes e latência médias e respectivos desvios padrão das ondas-a e b para a condição escotópica nas cinco intensidades testadas ( $0,00095 = \text{Log I -3}$ ;  $0,0095 = \text{Log I -2}$ ;  $0,095 = \text{Log I -1}$ ;  $0,95 = \text{Log I 0}$  e  $9,5 \text{ cd.s/m}^2 = \text{Log I 1}$ ) em todos os dias de registro (Pré-indução/pré-tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE) são apresentadas na figura 45. A comparação entre olhos com UCE e os olhos com UCE tratados com MPA, realizada no teste estatístico descrito, foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciando as seguintes diferenças:

- Latência da onda-a (escotópico) para Log I -3 para o dia 24 ( $F= 3,34$   $P= 0,004$ );
- Latência da onda-b (escotópico) para Log I 0 para os dias pré e 6 ( $F= 2,64$   $P= 0,01$ );



**Figura 45** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas cinco intensidades escotópicas testadas: 0,00095, 0,0095, 0,095, 0,95 e 9,5 cd.s/m<sup>2</sup> (-3, -2, -2, 0, 1 log respectivamente) no modelo de UCE x modelo de UCE tratado com MPA, nos dias pré-indução/pré-Tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A**) Latência da onda-a; **B**) amplitude da onda-a; **C**) latência da onda-b e **D**) amplitude da onda-b. Barras verticais = Desvio Padrão. OD (U): olho direito UCE; OD (U+M): olho direito UCE+MPA (\*=P<0.05).

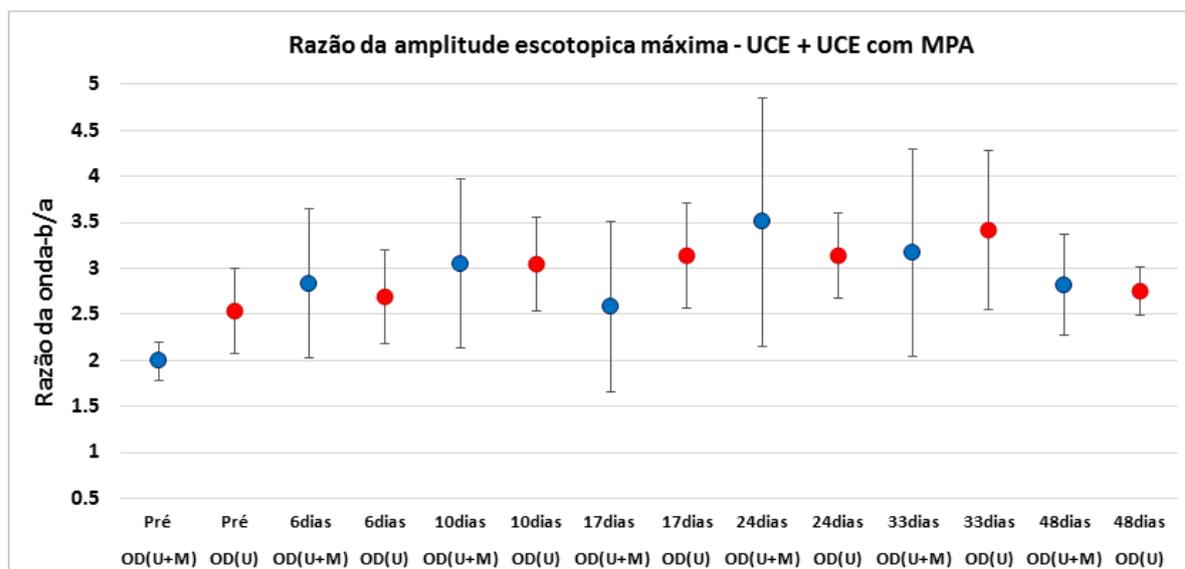
A figura 46 apresenta as médias e desvios padrão da amplitude saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) para o dia pré-indução/pré-tratamento e ao longo dos 48 dias de desenvolvimento da inflamação da uveíte no modelo de UCE e no modelo tratado com MPA.



**Figura 46** – Médias da resposta saturada da onda-b ( $V_{max}$ ) no dia pré-indução/pré-tratamento e ao longo do desenvolvimento do grupo tratado com MPA e não tratado. Círculos vermelhos correspondem ao olho com UCE (OD: olho direito) e círculos azuis, correspondem ao olho com UCE tratado com MPA (OE: olho esquerdo).

Podemos observar a mesma variabilidade observada na figura 44, porém mesmo os registros tendo sido realizados em tempos e animais diferentes, no final dos experimentos, também ocorre a sobreposição dos dois grupos.

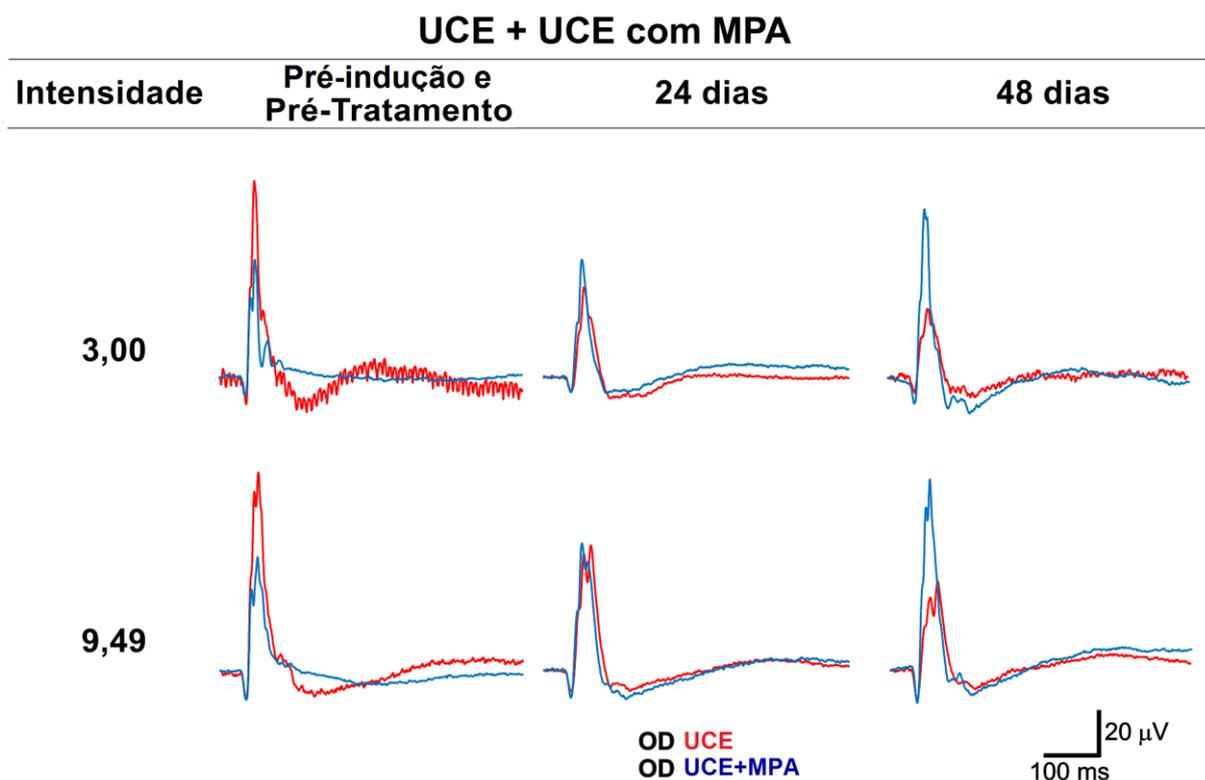
A figura 47 representa a razão da amplitude escotópica máxima da onda-b sobre a amplitude da onda-a ( $b/a$ ) para grupo sem tratamento e o grupo tratado com MPA.



**Figura 47** – Médias da razão da amplitude escotópica máxima de b/a ao longo do desenvolvimento da UCE (círculos em vermelho) e da UCE tratada com MPA (círculos em azul). Barras verticais: desvio padrão; OD (U): olho direito UCE; OD (U+M): olho direito UCE + MPA.

A análise da razão da amplitude b/a para o modelo de UCE comparado ao modelo de UCE tratado com MPA, não apresentou diferença estatística.

Os ERGs fotópicos nas intensidades testadas no modelo de UCE (linha vermelha) e no modelo tratado com MPA (linha azul) durante 3 sessões do ERG (pré-indução/pré-tratamento, 24 e 48 dias após a indução da UCE) são apresentados na figura 48.



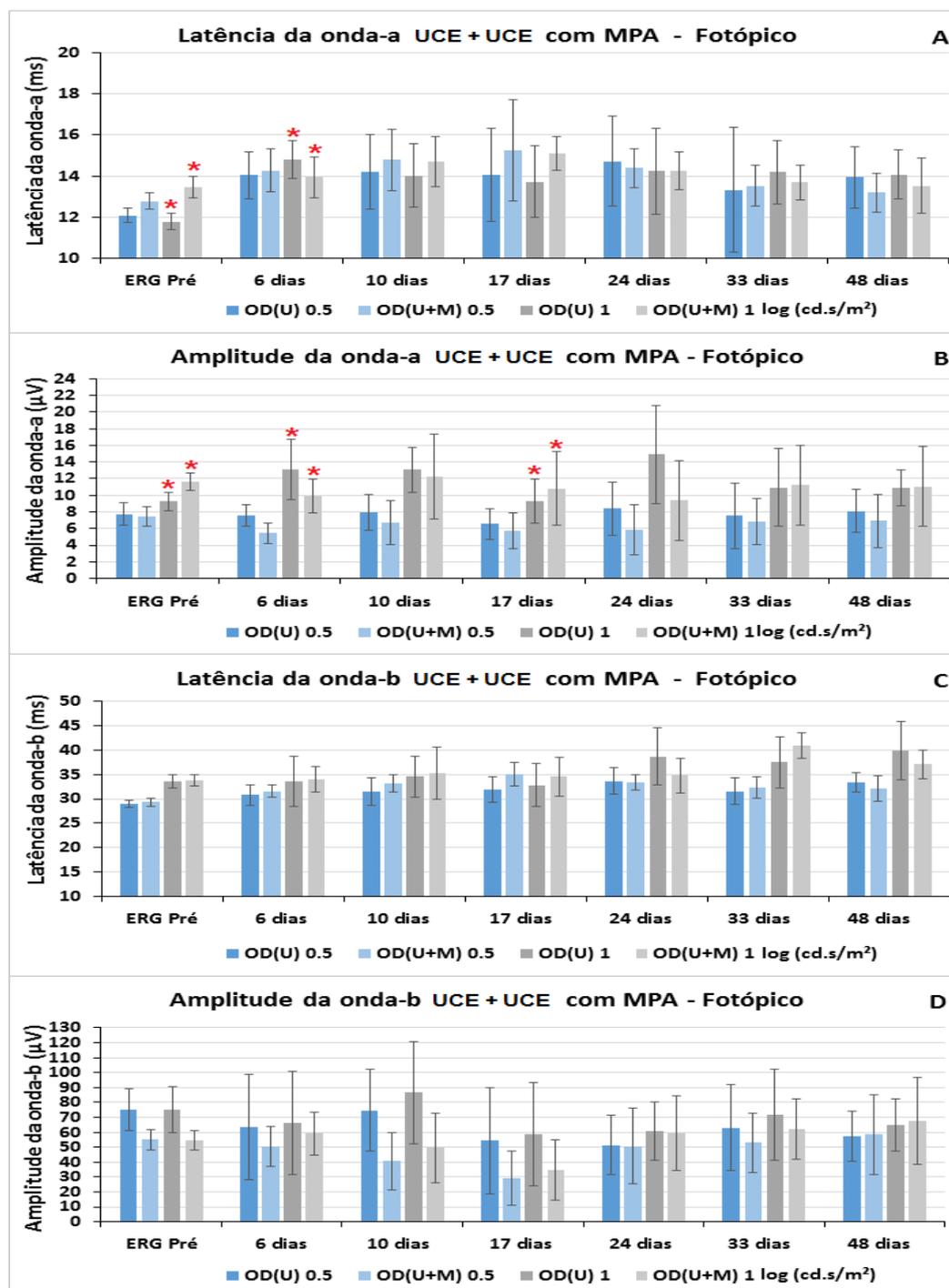
**Figura 48** – ERGs fotópicos de dois animais registrados em três dias distintos: pré-indução/pré-tratamento, 24 e 48 dias após a indução da UCE. Em vermelho o modelo de UCE e em azul o modelo de UCE tratado com MPA. Intensidade:  $\text{cd.s/m}^2$ ; OD: olho direito; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

Apesar de serem registros de animais diferentes realizados em dias diferentes, a variabilidade foi menor do que a que ocorreu com os registros escotópicos, porém, nas duas situações houve uma equiparação entre as ondas, no caso dos registros fotópicos, o olho tratado demonstra uma amplitude maior. Podemos inferir de forma precoce a partir de tais observações que a injeção de MPA pode exercer algum efeito terapêutico no modelo de UCE.

A média e desvio padrão da amplitude e da latência das ondas-a e b estão apresentadas na figura 49, para a condição fotópica nas duas intensidades testadas ( $3,0 = \text{Log I } 0,5$ ;  $9,49 \text{ cd.s/m}^2 = \text{Log I } 1$ ) em todos os dias de registro (Pré-indução/pré-tratamento 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UC). A comparação entre olhos com UCE sem tratamento e UCE tratados com MPA, realizada com o teste estatístico descrito, foi significativa. A análise *post hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciou as seguintes diferenças:

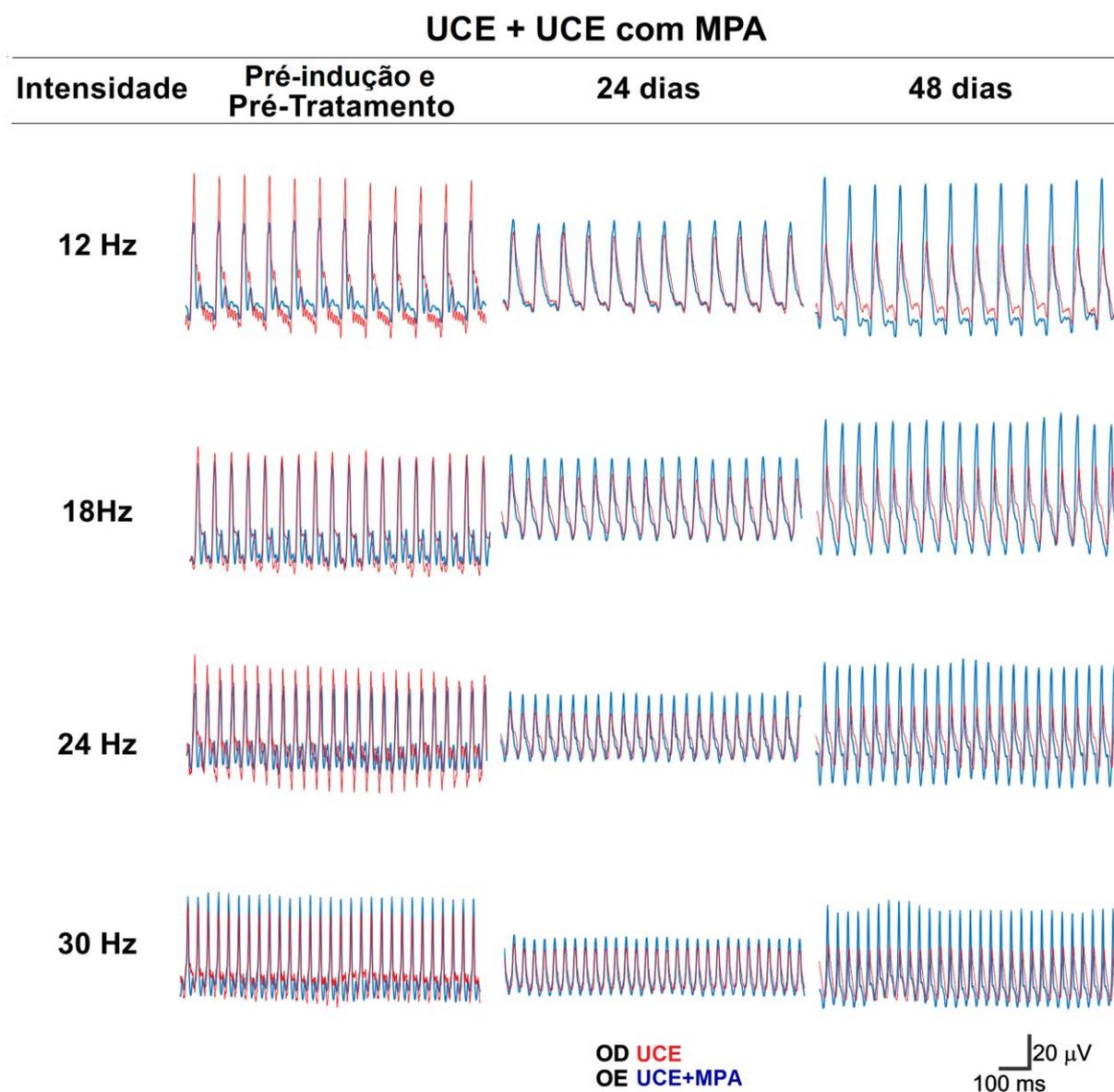
- Latência da onda-a (fotópico) para Log I 1 para os dias ERGs pré, 6 ( $F= 3,1$ ,  $P= 0,006$ );

- Amplitude da onda-a (fotópico) para Log I 1 para os dias ERGs pré, 6 e 17 (F=2,43 P= 0,02);



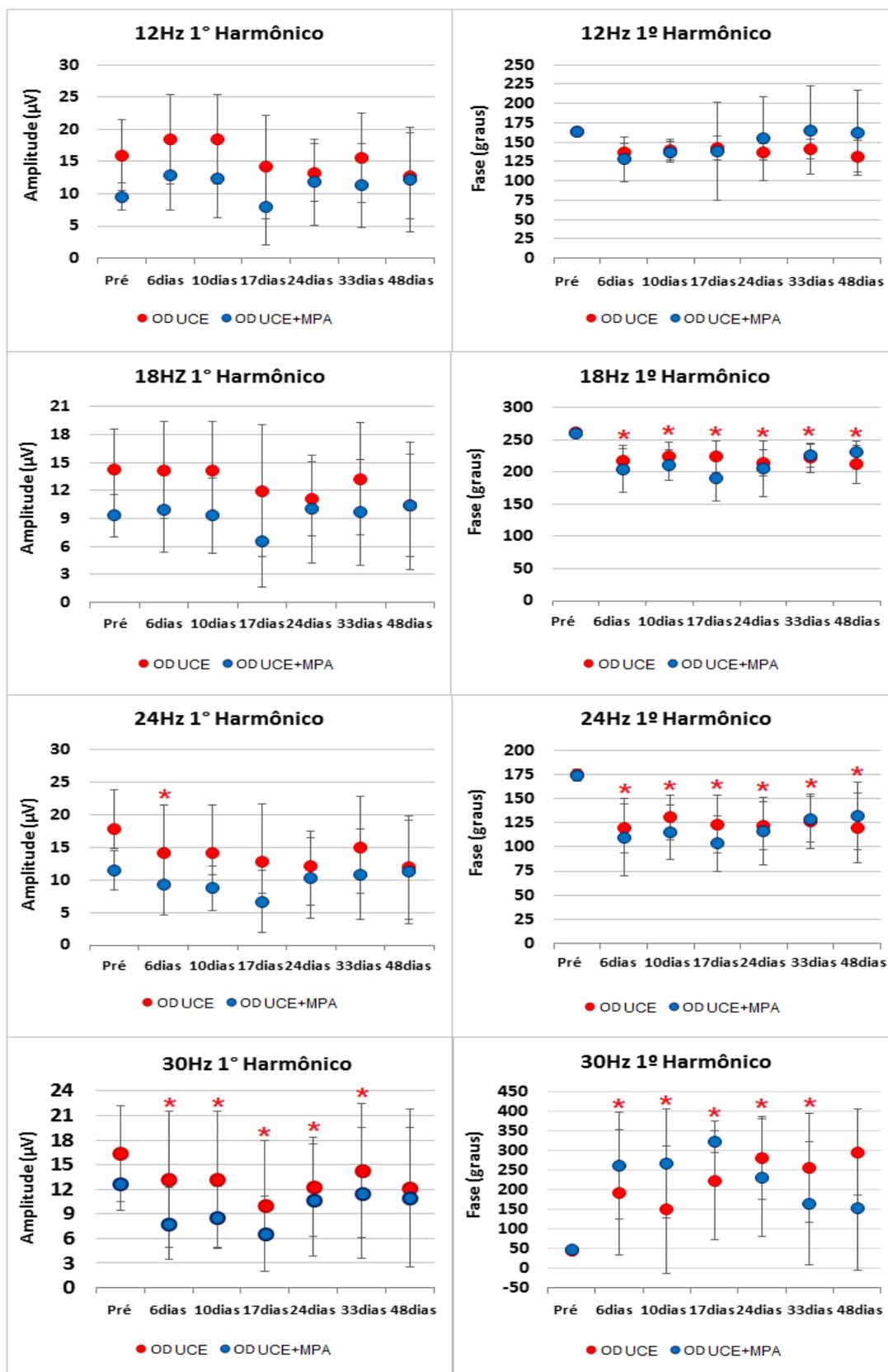
**Figura 49** – Médias das amplitudes e latências das onda-a e b nas duas intensidades fotópicas testadas: 3,0 e 9,49 cd.s/m<sup>2</sup> (0.5 e 1 log respectivamente) no grupo de UCE sem tratamento e tratado com MPA, nos dias pré-indução/pré-tratamento, 6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias após a indução da UCE. **A)** Latência da onda-a; **B)** amplitude da onda-a; **C)** latência da onda-b e **D)** amplitude da onda-b. Barras verticais: Desvio Padrão; OD (U): olho direito; OD (U+M): olho direito UCE+MPA (\*=P<0,05).

O ERG em resposta à estimulação luminosa intermitente (flicker) é apresentado na Figura 50 nas quatro frequências testadas: 12, 18, 24 e 30 Hz no modelo de UCE (linha vermelha) e no modelo de UCE tratado com 0,1mg/mL de MPA (linha azul) durante 3 sessões do ERG (pré-indução/pré-tratamento, 24 e 48 dias após a indução da UCE).



**Figura 50** – ERGs em resposta a estímulos luminosos intermitentes (flicker) de dois animais, modelo de UCE (linha vermelha) modelo tratado com MPA (linha azul) nas quatro frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz). OD: olho direito; ms: milissegundos;  $\mu$ V: microvolts.

A amplitude do 1º harmônico da onda foi obtida através da transformada de Fourier com o auxílio do programa Matlab (The Math Works, EUA). Na figura 51 podemos comparar as médias das amplitudes e fases em resposta as frequências 12, 18, 24, e 30 Hz no modelo de UCE e no modelo tratado com 0,1mg de MPA. A comparação entre olhos com UCE e os olhos tratados com MPA, realizada com o teste estatístico descrito, foi significativa. A análise *pos hoc* feita pelo Tukey *test*, evidenciou as seguintes diferenças para a amplitude do 1º harmônico: 24 Hz para o dia 3 (F= 2,40) P= 0,029), 30 Hz para os dias 6, 10, 17, 24 e 33 (F= 8,45 P=0,001) e para a fase do 1º harmônico: 18 Hz para os dias 6, 10, 17, 24, 33 e 48 (F= 7,19 P= 0,001), 24 Hz para os dias 6, 17, 24, 33 e 48 (F= 7,19 P= 0,001) e 30 Hz para os dias 6, 10, 17, 24 e 33 (F=8,45 P=0,001).

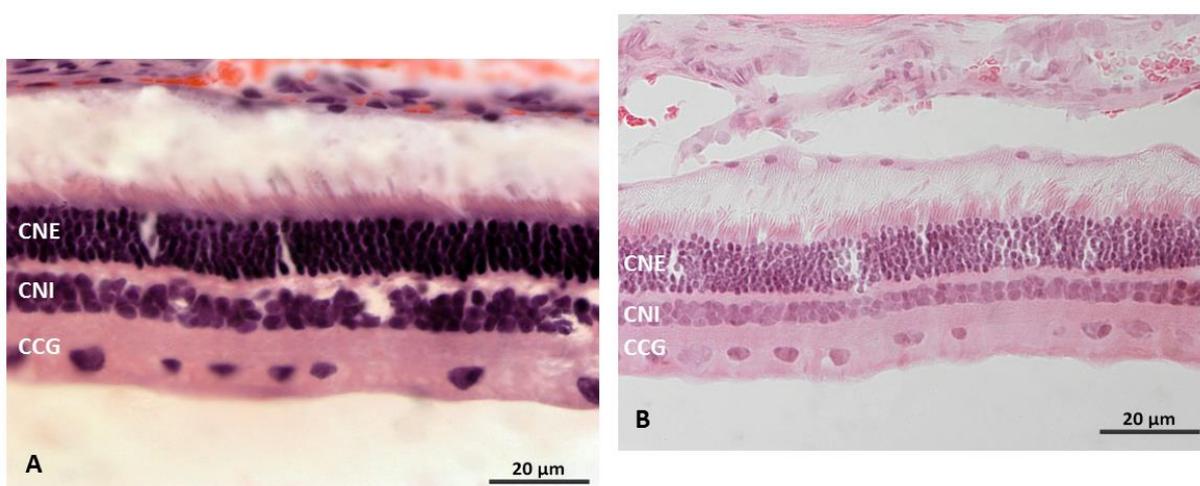


**Figura 51** – Valores médios e respectivos desvios padrão das amplitudes e fases do 1º harmônico dos ERGs em resposta a estimulação intermitente, a partir da transformada de Fourier, nas frequências testadas (12, 18, 24 e 30 Hz) para UCE (círculos em vermelho) e UCE tratada com MPA (círculos em azul). OD: Olho direito (\*= $P < 0,05$ ).

### 5.4.3 Análise Morfológica

#### 5.4.3.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

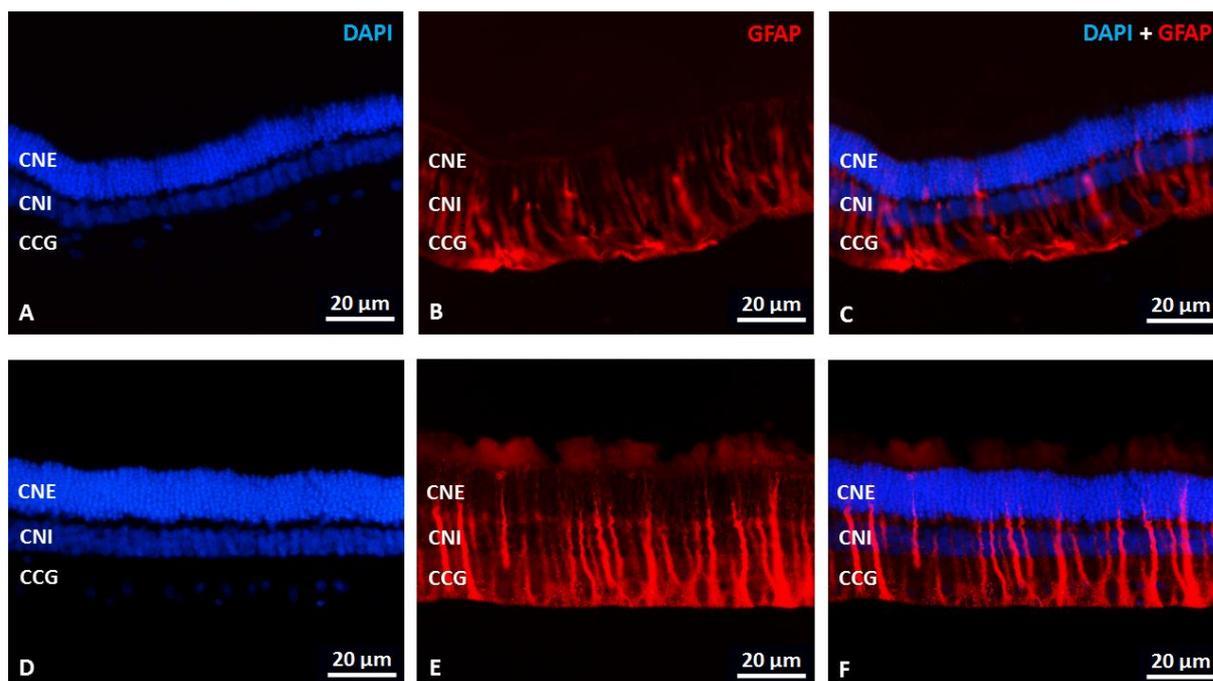
A análise morfológica feita por meio da técnica de hematoxilina e eosina não evidenciou alterações na estrutura retiniana. Cortes radiais do eixo dorso-ventral dos olhos com UCE e dos tratados com MPA com a dose de 0,1mg/mL foram analisados e não apresentaram diferenças na região central. É importante ressaltar que não temos como dizer se houve algum dano pontual em alguma região retiniana específica, pois somente foi analisada a região central, tendo o nervo óptico como referência. A figura 52 mostra um exemplo de um olho com UCE e um olho tratado com MPA, ambos corados com HE.



**Figura 52** – Cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de coelhos albinos utilizados como modelo de UCE. **A)** corte radial de um olho direito com UCE. **B)** corte radial de um olho direito com UCE tratado com MPA. CNE = camada nuclear interna, CNI = camada nuclear externa e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x (oil). Escala = 20μm (micrômetros).

#### 5.4.3.2 Imunohistoquímica para a proteína GFAP

A imunomarcagem para a proteína GFAP foi positiva para os olhos com UCE e para os olhos com UCE tratados com 0,1mg/mL de MPA. Como podemos observar na figura 53, temos núcleos celulares marcados com DAPI em azul e as células de Müller marcadas em vermelho para a proteína GFAP.



**Figura 53** – Imunohistoquímica para proteína GFAP em cortes radiais da região central da retina, eixo dorso-ventral, de coelhos albinos utilizados como modelo de UCE. A, B, C - cortes de um olho com UCE. D, E F - cortes de um olho com UCE tratado com MPA. A) corte radial do olho com UCE marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; B) mesmo corte radial do olho com UCE imunomarcado positivamente para a proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; C) Sobreposição das imagens A e B; D) corte radial do olho com UCE tratado com MPA marcado com DAPI, evidenciando os núcleos das camadas CNE, CNI e CCG; E) mesmo corte radial do olho com UCE tratado com MPA imunomarcado positivamente para proteína GFAP – células de Müller marcadas em vermelho; F) Sobreposição das imagens D e E. CNE = camada nuclear Externa, CNI = camada nuclear interna e CCG = camada de células ganglionares. Aumento: 40x. Escala = 20µm (micrômetros).

Como podemos ver na figura 53, as camadas nucleares continuam preservadas, assim como ocorreu com os cortes corados com HE, porém os olhos com UCE e os com UCE tratados com MPA foram imunomarcados positivamente para a proteína GFAP, o que indica uma gliose das células de Müller, configurando um processo inflamatório. O grupo com UCE continua apresentando sinais de inflamação de acordo com a marcação positiva para o GFAP, mesmo que a análise clínica e eletrofisiológica tenha demonstrado uma melhora ao longo do desenvolvimento da UCE, durante o período em que os animais foram acompanhados, o grupo tratado com MPA, também apresentou sinais de inflamação após 48 dias de indução da UCE.

## **VI Discussão**

### **6.1 Modelo de Uveíte Crônica Experimental**

O modelo de uveíte descrito por Dong e colaboradores (2006), foi reproduzido e uma uveíte anterior foi gerada em 100% dos animais induzidos, porém, nossos resultados não foram os mesmos descritos por Dong e colaboradores. Não foi possível realizar a vitrectomia nos animais utilizados como modelo de uveíte, e possivelmente devido a isto, não conseguimos desenvolver a inflamação crônica proposta. A inflamação descrita por Dong, foi difusa, caracterizando uma panuveíte com presença de células no vítreo e opacidade vítrea, demonstrando decréscimo da amplitude da onda-b no ERG. Entretanto, desenvolvemos uma uveíte anterior com um pico de inflamação onde foi possível evidenciar possíveis melhoras ocasionadas pelo MPA.

Os resultados obtidos com o eletrorretinograma e os exames clínicos realizados demonstraram uma recuperação da uveíte ao longo do tempo, os resultados morfológicos obtidos com a coloração de HE, não demonstraram alterações estruturais na retina, já a imunohistoquímica realizada para a proteína GFAP foi positiva, marcando células de Müller nos olhos experimentais, acometidos pela uveíte. O olho controle não apresentou marcação para GFAP. A imunomarcação positiva para proteína GFAP caracteriza uma gliose das células de Müller, e foi a única ferramenta que demonstrou haver um processo inflamatório ainda no final dos experimentos.

A análise clínica mostrou que a inflamação gerada pelo modelo de uveíte utilizado afeta somente a parte anterior do olho, existindo uma recuperação espontânea com o passar do tempo, porém o modelo se mostrou consistente e útil para o estudo terapêutico proposto pelo trabalho, reproduzindo diversos aspectos pertinentes a uma uveíte. A inflamação apresenta um pico que se inicia por volta do 17º dia após a indução da uveíte e se mantém até cerca do 24º dia, a partir de então é possível notar a regressão da inflamação. Tal pico inflamatório pode ser explicado devido à segunda injeção intravítrea de MT, realizada 15 dias após a primeira injeção intravítrea, para simular uma uveíte crônica recidivante. A fundoscopia foi considerada normal, não havendo relato da presença de células inflamatórias no vítreo, descolamento de retina ou algum tipo de comprometimento da retina ou nervo óptico. Porém, todos os animais desenvolveram catarata subcapsular a partir do 17º dia após a indução. A catarata é comum em inflamações como a uveíte e nesse modelo se faz mais comum ainda devido as injeções intravitreas realizadas, que aumentam o risco da ocorrência de catarata.

A catarata presente, no entanto, foi pontual e foi uma catarata branca, o que não interferiu nos registros dos ERGs e análises clínicas realizadas ao longo do experimento.

Em humanos a presença de catarata pode alterar o registro do eletrorretinograma devido a opacidade do cristalino, provocando respostas subestimadas ou superestimadas. Esses efeitos vão depender do tipo de catarata. A opacidade do cristalino causa atenuação da intensidade luminosa que chega à retina provocando subestimação das respostas; por outro lado, resultados superestimados ocorrem devido à dispersão de luz que pode ser ocasionada pela catarata (Gallowey, 1988; Ratanapakorn et al., 2010).

Os resultados funcionais (ERG) obtidos para o modelo de uveíte mostraram poucas diferenças comparando os olhos acometidos pela inflamação com os olhos controles, o que é plausível já que a uveíte gerada, foi uma uveíte anterior, preservando a câmara posterior do olho, não ocasionando alterações na retina.

A amplitude da onda-a do grupo com uveíte, mostrou-se mais baixa para intensidade de 0 log (0,95 cd.s/m<sup>2</sup>) durante o pico de inflamação, já a latência da onda-b para mesma intensidade se mostrou mais rápida durante todos os dias de registro (6, 10, 17, 24, 33 e 48 dias), não sofrendo alterações em sua amplitude. A latência da onda-a fotópica se comportou de forma inversa para intensidade de 1 log (9,49 cd.s/m<sup>2</sup>) nos dias 6 e 33 depois da indução da uveíte, apresentando uma resposta mais lenta. Podemos inferir que a diminuição da amplitude da onda-a está relacionada com alterações nos fotorreceptores ao passo que o aumento da latência pode indicar uma dificuldade de recuperação prioritariamente dos bastonetes, uma vez que a recuperação dos cones é mais rápida (Stockton & Slaughter, 1989; Marmor et al., 2009). Em relação à onda-b, alterações tanto na amplitude como na latência podem estar relacionadas com dificuldade de recuperação de células bipolares-ON e disfunção da concentração de potássio (Stockton & Slaughter, 1989; Asi & Perlman, 1992; Block & Schwarz, 1998; Weymouth & Vingrys, 2008). A análise das repostas intermitentes para diferentes frequências temporais de estimulação luminosa do sistema de cones, apresentou alterações somente para a fase do 1º harmônico das frequências testadas (12, 18 24 e 30Hz) para todos os dias de registro. A fase dos olhos com uveítes ora se mostrou mais rápida (sincronizada com a estimulação), ora mais lenta. Assim, podemos inferir que a uveíte tenha alterado as propriedades temporais das células biplares-ON durante a inflamação, apresentando períodos de lentificação das respostas (Kondo & Sieving, 2001; Viswanathan et al., 2002).

Outra análise realizada foi a relação ou razão da onda-b sobre a onda-a (b/a), que avalia a integridade da retina interna e externa. Como a maior contribuição para onda-a é de fotorreceptores e para onda-b é de células bipolares-ON a dependência da onda-b em relação à onda-a pode auxiliar na identificação da integridade funcional dos fotorreceptores, das

células bipolares-ON e da transmissão do sinal entre estes tipos celulares (Perlman, 2009). Em nosso estudo, a análise da razão de b/a não mostrou diferenças para o modelo de uveíte, sugerindo que neste modelo, tanto as funções de receptores como a das camadas mais internas da retina estão preservadas.

Em relação às análises morfológicas do modelo de uveíte, não foram encontrados danos na estrutura da retina por meio da técnica de HE, porém foi demonstrada gliose das células de Müller, através de imunomarcação positiva para a proteína GFAP. A presença de um processo patológico na retina é facilmente detectável pela indução da expressão de GFAP pelas células de Müller, que funciona como um indicador não específico, porém altamente sensível e precoce na sinalização de uma vasta variedade de doenças e lesões da retina (Bignami & Dahl, 1979). Nas uveítes essa ativação está associada com o aumento da regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias de interferon gama, que são produzidas por linfócitos T, o que foi comprovado através da marcação de citocinas pró-inflamatórias de interferon gama somente em retinas com uveíte (Hauck et al., 2007). As Citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por um aumento considerável da expressão de GFAP, o que sugere que desempenhem um papel importante no controle da expressão de GFAP, podendo estar envolvidas na modulação da inflamação (Boyen et al., 2004).

A maior parte das alterações demonstradas pelo eletrorretinograma aconteceram durante o pico de inflamação descrito para o modelo de uveíte em questão, mostrando que a inflamação gerada causa alterações temporárias na retina sem acometer a estrutura da mesma, como visto na coloração de HE. Porém foi demonstrado um processo inflamatório através da ativação das células de Müller, mesmo após a melhora e regressão de alguns sintomas descritos pelas análise clínica.

Até o momento na literatura, este é o terceiro trabalho que faz uso de tal modelo de uveíte, além de Dong e colaboradores (2006), Ioshimoto (2015), também utilizou o mesmo modelo (sem realizar a vitrectomia), obtendo resultados muito próximos aos descritos neste trabalho, o que reforça nossos achados.

## **6.2 Estudo de toxicidade do MPA**

Esta etapa do presente trabalho avaliou os possíveis efeitos tóxicos de duas doses de MPA. As doses testadas foram a de 1mg/mL (maior concentração da droga que pode ser mantida em suspensão) e a de 0,1mg/mL.

Os resultados funcionais descritos pelo eletrorretinograma, não mostraram diferenças entre olhos que receberam as doses de MPA testadas e olhos que receberam veículo, através

das análises das amplitudes e latências das ondas-a e b em respostas escotópicas e fotópicas, além das amplitudes e fases do 1º Harmônico das respostas ao estímulo intermitente, em diferentes frequências, calculadas a partir da transformada de Fourier. Dessa forma, concluímos que ambas as doses e o veículo não apresentaram toxicidade para as células da retina.

Esta ausência de toxicidade também ficou evidente na análise da relação ou razão da onda-b escotópica máxima sobre a onda-a, que não mostrou nenhuma diferença entre ERGs registrados em olhos injetados com droga comparados com os injetados com veículo.

Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por Aguiar (2011) e Gasparin e colaboradores (2014) que avaliaram a toxicidade de diferentes doses de MPA através do ERG. Aguiar (2011), também avaliou a relação da amplitude da onda-b sobre a onda-a, descrevendo os mesmos resultados obtidos no presente trabalho. O trabalho de Aguiar também avaliou a toxicidade do veículo utilizado para diluição do MPA, não encontrando sinais de toxicidade.

Em relação à morfologia, nosso trabalho fez uso da técnica de HE e imunomarcação para GFAP. Ambas as técnicas analisaram somente a região central da retina, eixo dorso-ventral. Os cortes corados com HE, não evidenciaram nenhuma mudança estrutural na retina em nenhuma das doses testadas (nem pelo veículo), o mesmo foi demonstrado por Gasparin e colaboradores (2014), que também avaliaram a estrutura retiniana por meio da técnica de HE.

A imunomarcação para GFAP foi positiva em ambas as doses testadas, assim como nos controles (veículo). A ativação das células de Muller pode configurar uma gliose, porém tais células são extremamente sensíveis e uma de suas funções, entre muitas outras, é manter e cuidar da homeostase da retina. Dessa forma, é compreensível que as mesmas sejam ativadas, pois além do olho receber uma injeção, uma substância estranha, com compostos totalmente diferentes aos presentes no olho, foi introduzida no mesmo. A ativação do GFAP pode ser considerada inespecífica e ser causada por trauma mecânico, isquemia, descolamento de retina entre outros (Guerin et al., 1990; Fisher and Lewis, 1995; Steinberg et al., 1995, 1997; Bringmann & Reichenbach, 2001; Reichenbach et al., 2009).

Tais resultados nos permitem inferir que as doses de MPA testadas devem ser seguras para administração intravítrea em olhos de coelhos, para testar seu efeito terapêutico em inflamações oculares.

### 6.3 Modelo de Uveíte Crônica Experimental tratado com MPA

O grupo de uveíte tratado com 0,1mg/mL MPA apresentou um quadro evolutivo semelhante ao grupo não tratado, apresentando os mesmos sintomas durante a avaliação clínica, apresentando uma inflamação mais intensa na câmara anterior, avaliada pela presença de células inflamatórias, pelo aparecimento mais precoce de catarata que no grupo não tratado, por apresentar descolamento de retina (fibras peripapilares) ao longo da inflamação em 6 dos 15 animais utilizados no grupo tratado. Porém temos que levar em consideração a maior vulnerabilidade em que se encontrava o olho tratado, pois injeções intravítreas aumentam o risco de descolamento de retina e a própria uveíte torna esse fato suscetível. O grupo tratado com MPA, recebeu uma injeção intravítrea a mais que o grupo não tratado, totalizando três injeções intravítreas em um curto período de tempo. Dentro deste quadro, o modelo tratado com MPA também apresentou uma regressão natural após seu pico de inflamação, apresentando uma melhora mais rápida e significativa dos efeitos clínicos logo após o pico de inflamação, demonstrando também a melhora das sinéquias da íris. Os resultados da morfologia foram idênticos aos do grupo não tratado, tanto para coloração com HE quanto para imunomarcação para a proteína GFAP.

Os resultados funcionais (ERG) obtidos para o modelo de uveíte tratado com MPA mostraram diferenças somente para as latências das ondas-a e b escotópicas e fotópicas, não mostrando alterações para as amplitudes, quando comparado com os olhos controles. A latência da onda-a escotópica foi maior que o controle apresentando uma resposta mais lenta sugerindo dano na transmissão de informação. A latência da onda-b escotópica foi menor que no controle, apresentando uma resposta mais rápida, o que sugere uma possível hipersensibilização das células. A análise das repostas intermitentes para diferentes frequências do sistema de cones, apresentou alterações para a amplitude do 1º Harmônico na frequência de 24Hz somente para o dia 30 após a injeção intravítrea de MPA, apresentando uma amplitude menor que a do controle. Podemos supor neste caso que, mesmo com um processo inflamatório menor, a eficácia do MPA aos 30 dias possa estar diminuída, é importante ressaltar que o MPA administrado intravítrealmente na dose de 1mg/mL foi detectado por até 29 dias no vítreo de coelhos saudáveis, como mostrado por Gasparin e colaboradores (2014).

Uma observação importante a ser feita é que não se sabe como o MPA age em olhos inflamados, em relação à meia vida e farmacocinética, tais dados se fazem necessários já que o vítreo de um olho inflamado é completamente diferente do de um olho sadio, tendo suas composições físico e químicas totalmente alteradas.

Os resultados da razão de b/a foram significantes para o grupo tratado nos dias 24 e 33, mostrando resultados bem próximos ou superiores à 2 para cada animal, o que demonstra que um possível dano ocorreu nos fotorreceptores.

De acordo com os resultados encontrados no grupo tratado, podemos inferir que a uveíte tenha alterado por um determinado período as propriedades temporais das células bipolares-ON (kondo & Sieving, 2001; Viswanathan et al., 2002) em relação as repostas intermitentes do sistema de cones, o que reforça o resultado da razão de b/a, que demonstra alterações nos fotorreceptores, além de dificultar a recuperação das células bipolares-ON (Stockton & Slaughter, 1989; Asi & Perlman, 1992; Weymonuth & Vingrys, 2008), devido as alterações da latência da onda-b.

#### **6.4 Avaliação do efeito da injeção intravítrea de MPA no modelo de uveíte crônica experimental**

Para avaliar se a injeção intravítrea de MPA mostrou efeito terapêutico comparamos os dados obtidos no modelo de uveíte com e sem o tratamento com MPA, dentro do objetivo de que possa vir a ser uma alternativa eficaz para o tratamento de uveítes.

Em relação aos exames clínicos, como já descrito, ambos os grupos apresentaram uma evolução semelhante da inflamação, porém o grupo tratado apresentou uma inflamação da câmara anterior mais intensa e mostrou uma recuperação mais rápida e efetiva a partir do pico de inflamação. As melhoras e a regressão mais rápida da inflamação, observadas no grupo tratado, podem ser explicadas como possíveis efeitos da dose de MPA testada. Entretanto o grupo tratado apresentou descolamento de retina em alguns animais, como descrito anteriormente, porém, o grupo tratado recebeu mais injeções intravitreas do que o grupo não tratado, o que deixaria o olho mais sensível e susceptível ao descolamento de retina.

A análise da razão b/a comparando os grupos tratado e não tratado, não apresentou diferenças.

A coloração com HE não apresentou diferenças estruturais na retina, tanto no grupo tratado com no grupo não tratado. A imunomarcção para proteína GFAP foi positiva para ambos os grupos, como era esperado, já que os olhos apresentavam uma inflamação.

Os resultados funcionais (ERG) obtidos para o grupo tratado comparado ao não tratado, mostraram diferenças para as latências da onda-a e b escotópica e para latência e amplitude da onda-a fotópica. A latência das ondas-a e b escotópicas no grupo sem tratamento apresentou uma latência maior, respondendo de forma mais lenta.

A latência da onda-a fotópica no grupo sem tratamento apresentou uma latência menor no dia pré, respondendo mais rápido, e no dia 6, apresentou uma resposta maior, respondendo de forma mais lenta e a amplitude da onda-a fotópica apresentou uma resposta menor para o dia pré e dia 17, respondendo de forma mais rápida, e no dia 6, respondeu de forma mais lenta.

A análise das repostas intermitentes para diferentes frequências temporais de estimulação luminosa do sistema de cones, apresentou alterações para amplitude do 1º harmônico para 24 Hz e 30 Hz onde o grupo sem tratamento apresentou uma amplitude maior em todos os dias. A fase do 1º harmônico apresentou um comportamento semelhante para as frequências de 18, 24 e 30 HZ, o grupo sem tratamento mostrou diferenças em quase todos os dias, quando comparado com o grupo tratado, sendo maior até o dia 24, respondendo de forma lenta e nos dias 33 e 48 passou a ser menor, respondendo de forma mais rápida. Observamos claramente uma mudança do estado de hipersensibilização das células para o de redução de transmissão de informação entre os dias 24 e 33, sugerindo uma modificação do efeito do MPA, que pode estar relacionado com o tempo em que a droga fica disponível no vítreo.

Uma possível melhora pode ser vista no grupo tratado em relação ao grupo sem tratamento, as diferenças mostradas comparando os dois grupos não passaram do 24º dia, o que coincide com o pico de inflamação, e após este pico, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada o que coincide com os achados clínicos, mostrando uma melhora do processo inflamatório ao final dos experimentos. Ouve uma melhora na latência da onda-a e b de forma geral diminuindo nos dias em que apresentavam diferenças no modelo tratado com MPA quando comparado com o controle ao invés do grupo com uveíte sem tratamento. Somente a onda-a fotópica sofreu alterações na amplitude, até o início do pico de inflamação.

Tais resultados demonstram um possível efeito terapêutico ocasionado pela dose de MPA testada.

Estudos que avaliaram os efeitos terapêuticos do MPA foram iniciados por Ioshimoto (2015) que testou um implante biodegradável de MPA no mesmo modelo utilizado em nosso trabalho, encontrando resultados semelhantes, reforçando nossos achados e reforçando a necessidade de novos estudos.

Nenhum outro estudo havia sido feito com MPA, porem existem estudos clínicos e em modelos animais como modelo de uveítes, que utilizaram o MMF por via sistêmica, demonstrando a eficácia desse imunossupressor.

De acordo com os resultados discutidos até aqui, podemos fazer as seguintes observações:

- O modelo de Uveíte Crônica Experimental reproduzido apresenta uma inflamação recorrente que regride, apresentando melhora de forma natural, o que limita a avaliação do efeito terapêutico durante seu pico de inflamação;
- Estudos com um maior número de animais são necessários a fim de diminuir a variabilidade encontrada e melhorar a padronização dos resultados;
- Os exames clínicos reforçaram os achados funcionais evidenciados pelo ERG, mostrando uma melhora durante o pico de inflamação da uveíte gerada;
- Experimentos que avaliem a meia vida e a farmacocinética do MPA em olhos inflamados são necessários;
- Experimentos morfológicos mais estruturados do modelo de uveíte proposto, assim como do modelo tratado com MPA, são necessários para avaliar a morfologia da retina de forma mais detalhada, analisando todas as regiões retinianas, fazendo uso de outras ferramentas ou marcadores envolvidos no processo inflamatório, assim como investigação de possível morte celular e neuroplasticidade retiniana, uma vez que as células de Müller são capazes de se diferenciar em novas células, além de apresentarem um papel importante como marcador neuronal para a inflamação;
- Seria interessante testar a maior dose de MPA disponível (1mg), já que a mesma não se mostrou tóxica para a retina de coelhos;
- Mesmo o modelo apresentando algumas limitações, o mesmo se mostrou estável e reproduz alterações de uma uveíte anterior parecida com a que ocorre em humanos, sendo assim uma opção viável para o estudo desta inflamação;
- O modelo apresentado pelo presente trabalho, se melhor caracterizado, pode ser um novo modelo para o estudo de uveítes anteriores;
- Possivelmente, uma eficácia mais acentuada do MPA seria melhor demonstrada em um modelo de uveíte posterior;

Apesar dos resultados não serem específicos e conclusivos, frente às limitações do presente trabalho e dos tratamentos sistêmicos das uveítes disponíveis hoje, com tratamentos longos, com altas dosagens e combinações de drogas que acarretam diversos efeitos colaterais, cursando com o abandono do tratamento, tornando real o risco de perda visual e ainda levando em consideração a incidência das uveítes no Brasil e no mundo, o presente estudo demonstra que injeções intravítreas de MPA possuem um potencial promissor no tratamento de inflamações oculares.

## VII Conclusões

O presente trabalho foi dividido em três etapas e de acordo com os resultados obtidos conseguimos:

- 1) Reproduzir o modelo de Uveíte Crônica Experimental em coelhos albinos com o auxílio de injeções intravítreas de *M. tuberculosis*, baseado no protocolo descrito por Dong e seu colaboradores. Obtivemos um modelo de uveíte anterior e avaliamos suas alterações clínicas, funcionais e morfológicas, estabelecendo fatores importantes durante sua evolução clínica, definindo seu pico de inflamação;
- 2) Realizar um estudo de toxicidade, no qual duas doses de MPA (0,1 e 1mg/mL), foram avaliadas funcionalmente e morfológicamente, não sendo encontrado nenhum sinal de toxicidade retiniana em ambas as doses testadas, após serem administradas intravítrealmente em olhos de coelhos albinos saudáveis;
- 3) Avaliar a eficácia terapêutica da injeção intravítrea da dose de 0,1mg/mL de MPA no modelo de uveíte crônica experimental apresentado, no qual, através de avaliações funcionais, clínicas e morfológicas, observamos uma melhora na inflamação, demonstrando um possível efeito terapêutico ocasionado pela dose de MPA testada, que ocorreu durante o pico da inflamação gerada pela uveíte;

Os resultados clínicos e funcionais apresentaram grande variabilidade e o conhecimento da meia vida e farmacocinética do MPA em olhos de coelhos com uveíte se faz necessário para delimitar com maior segurança a dose terapêutica funcional em olhos inflamados, além de novos experimentos com um maior número de animais para melhor padronização dos resultados, são também necessários novos experimentos morfológicos para avaliar a integridade de todas as regiões retinianas e ainda, seria interessante avaliar a eficácia do MPA em um modelo que seja caracterizado por uma uveíte posterior.

## VIII Referências Bibliográficas

ADAMUS, G.; CHAN, C. C. Experimental autoimmune uveitides: multiple antigens, diverse diseases. **Int Rev Immunol.**, v. 21, p. 209-29, 2002.

AGARWAL, R. K.; CASPI, R. R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. **Methods Mol Med.** v. 102, p. 395-419, 2004.

AGARWAL, R, K.; PHYLLIS B. SILVER, P, B.; CASPI, R, R.. Rodent Models of Experimental Autoimmune Uveitis. **Methods Mol Biol.** V.900, p. 443 – 469, 2012.

AGUIAR, Renata Genaro. **Estudo eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico (MPA) na retina de coelhos.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ALBERT, C.; BIEGEL, M. D. Effect of cortisone on horse serum uveitis in rabbits. **AMA Arch. Ophthalmol.**, v. 45, n. 3, p. 258-273, 1995.

ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. **Immunol Rev**, v. 136, n. 1, p. 5-28, 1993.

ALLISON, A. C.; KOWALSKI, W. J.; MULLER, C. J.; WATERS, R. V.; EUGUI, E. M. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. **Transplant Proc**, v. 25, n. 3 Suppl 2, p. 67-70, 1993.

ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 85-118, 2000.

ALVES, L. S. Causas de cegueira e visão subnormal no Centro Louis Braille - Porto Alegre. **Arq Bras Oftalmol**, v. 48, p. 65-7, 1985.

ANDERKA, M, T.; LIN, A, E.; ABUELO, D, N.; MITCHELL, A, A.; RASMUSSEN, S, A. Reviewing the evidence for mycophenolate mofetil as a new teratogen: Case report and review of the literature. **Am J Med Genet Part A.** v.149A, p. 1241 – 1248, 2009.

ARMSTRONG, V. W.; TENDERICH, G.; SHIPKOVA, M.; PARSA, A.; KOERFER, R.; SCHRODER, H.; OELLERICH, M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolic acid after intravenous administration and oral administration of mycophenolate mofetil to heart transplant recipients. **Ther Drug Monit**, v. 27, n. 3, p. 315-21, 2005.

ASI, H; PERLMAN, I. Relationships between the electroretinogram a-wave, b-wave and oscillatory potentials and their application to clinical diagnosis. **Doc Ophthalmol.**V.79, n.2, p. 125 – 39, 1992.

AVICHEZER, A.; PHYLLIS B. SILVER, B, P.; CHAN, C.; WIGGERT, B.; CASPI, R, R. Identification of a New Epitope of Human IRBP that Induces Autoimmune Uveoretinitis in Mice of the H-2b Haplotype. **IOVS.** V.41, N.1, 2000.

BAGGIA, S.; LYONS, J. L.; ANGELL, E.; BARKHUINZEN, A.; HAN, Y. B.; PLANCK, S. R.; TAUROG, J. D.; ROSENBAUM, J. T. A novel model of bacterially-induced acute anterior uveitis in rats and the lack of effect from HLA-B27 expression. **Journal of Investigative Medicine: the Official Publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 45, n. 5, p. 295-301, 1997.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: Application to human pharmacokinetic studies. **Clinica Chimica Acta**, v.370, p. 185 – 190, 2006.

BALTATZIS, S.; TUFAIL, F.; YU, E. N.; VREDEVELD, C. M.; FOSTER, C. S. Mycophenolate mofetil as an immunomodulatory agent in the treatment of chronic ocular inflammatory disorders. **Ophthalmology**, v. 110, p. 1061-5, 2003.

BEHAR-COHEN, F. F. B.; PAREL, J. M.; POULIQUEN, Y.; THILLAYE-GOLDENBERG, B.; GOUREAU, O.; HEYDOLPH, S.; COURTOIS, Y.; KOZAK, Y. Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. **Experimental Eye Research**, v. 65, n. 4, p. 533-45, 1997.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. Na immunofluorescence study with antibodies to glial fibrillary acidic (GFA) protein. **Exp Eye Res**. V.28, p. 63 – 69, 1979.

BLOCK, F.; SCHWARZ, M. The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. **Gen. Pharmac**. V. 30, n.3, p. 281 – 287, 1998.

BOUMPAS, D. T.; KRITIKOS, H. D.; DASKALAKIS, N. G. Perspective on future therapy of vasculitis. **Curr Rheumatol Rep**, v. 2, p. 423-9, 2002.

BOYEN, G, T, B, V.; STEINKAMP, M.; REINSHAGEN, M.; SCHAFER, K-H.; ADLER, G.; KIRSH, J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**.v.53, p. 22 – 228, 2004.

BRITO, B. E.; O'ROURKE, L. M.; PAN, Y.; ANGLIN, J.; PLANCK, S. R.; ROSENBAUM, J. T. IL-1 and TNF receptor-deficient mice show decreased inflammation in an immune complex model of uveitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 11, p. 2583-9, 1999

BROWNING, D, J. Anatomy and Pathologic Anatomy of Retinal Vein Occlusions. **In Retinal Vein Occlusions**, Springer New York, p. 1-31, 2012.

BUI, B. V.; SINCLAIR, A. J.; VINGRYS, A. J. Electroretinograms of albino and pigmented guinea-pigs (*Cavia porcellus*). **Australian and New Zealand journal of ophthalmology**, v. 26, n. S1, p. 98-100, 1998.

BULLINGTON, S. J.; BYRON, H.; WAKSMAN, M. D. Uveitis in rabbits with experimental allergic encephalomyelitis results produced by injection of nervous tissue and adjuvants. **AMA Arch Ophthalmol**, v. 59, n. 3, p. 435-45, 1958.

CAO, W.; WEN, R.; LI, F.; LAVAIL, M. M.; STEINBERG, R. H. Mechanical Injury Increases bFGF and CNTF mRNA Expression in the Mouse Retina. **Exp. Eye Res.** V.65, p. 241- 248, 1997.

CASPI, R. R.; ROBERGE, F. G.; CHAN, C. C.; WIGGERT, B.; CHADER, G. J.; ROZENSZAJN, L. A.; LANDO, Z.; NUSSENBLATT, R. B. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1490-5, 1988.

CASPI, R. R.; CHI-CHAO, C.; WIGGERT, B.; CHADER, G. J. The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). **Current Eye Research**, v. 9, n. s1, 1990.

CASPI, R. R. Animal models of autoimmune and immune-mediated uveitis. **Drug discovery today: disease models**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2006.

CASPI, R. R.; SILVER, P. B.; LUGER, D.; TANG, J.; CORTES, L. M.; PENNESI, G.; MATTAPALLIL, M. J.; CHAN, C. C. Mouse models of experimental autoimmune uveitis. **Ophthalmic Res.**, v. 40, p. 169-74, 2008.

CASPI, R. R. Understanding autoimmune uveitis through animal models. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 52, n. 3, p. 1871-9, 2011.

CHAN, T. M.; LI, F. K.; TANG, C. S.; WONG, R. W.; FANG, G. X.; JI, Y. L.; LAU, C. S.; WONG, A. K.; TONG, M. K.; CHAN, K. W.; LAI, K. N. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. **N Engl J Med**, v. 343, p. 1156-62, 2000.

CHANAUD, N. P. 3RD.; VISTICA, B. P.; EUGUI, E.; NUSSENBLATT, R. B.; ALLISON, A. C.; GERY, I. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by mycophenolate mofetil, an inhibitor of purine metabolism. **Exp Eye Res**, v. 61, n. 4, p. 429-34, 1995.

COMMODARO, A. G.; PERON, J. P. S.; LOPES, C. T.; ARSLANIAN, C.; BELFORT-JR, R.; RIZZO, L. V.; BUENO, V. Evaluation of Experimental Autoimmune Uveitis in Mice Treated with FTY720. **IOVS**. V.51, n.5, 2010.

D'AMICO, D. J.; PATEL, M.; ADAMIS, A. P.; CUNNINGHAM, E. T. J. R.; GUYER, D. R.; KATZ, B. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group; Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: two-year safety results of the two prospective, multicenter, controlled clinical trials. **Ophthalmology**, v. 113, p. 993-1001, 2006.

DARRELL, R. W.; WAGENER, H. P.; KURLAND, L. T. Epidemiology of uveitis. Incidence and prevalence in a small urban community. **Arch Ophthalmol**, v. 68, p. 502-14, 1962.

DEEG, C. A.; THURAU, S. R.; GERHARDS, H.; EHRENHOFER, M.; WILDNER, G.; KASPERS, B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 9, p. 2598-2606, 2002.

DEEG, C. A.; REESE, S.; GERHARDS, H.; WILDNER, G.; KASPERS, B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 45, n. 7, p. 2286-92, 2004.

DEEG, C. A.; HAUCK, S. M.; AMANN, B.; POMPETZKI, D.; ALTMANN, F.; RAITH, A.; SCMALZL, T. STANGASSINGER, M.; UEFFING, M. Equine Recurrent Uveitis – A Spontaneous Horse Model of Uveitis. **Ophthalmic research**, v. 40, n. 3-4, p. 151-3, 2008.

DE SMET, M. D.; CHAN, C. C. Regulation of ocular inflammation - what experimental and human studies have taught us. **Progress in retinal and eye research**, v. 20, p. 761-97, 2001.

DE SMET, M. D.; TAYLOR, S. R.; BODAGHI, B.; MISEROCCHI, E.; MURRAY, P. I.; PLEYER, U.; ZIERHUT, M.; BARISANI-ASENBAUER, T.; LEHOANG, P.; LIGHTMAN, S. Understanding uveitis: the impact of research on visual outcomes. **Progress in retinal and eye research**, v. 30, n. 6, p. 452-70, 2011.

DICK, D.; CHENG, Y, F.; LIVERSIDGE, J.; FORREST, J, V. Immunomodulation of experimental autoimmune uveoretinitis: a model of tolerance induction with retinal antigens. *Eye*. v.8, p. 52-59, 1994.

DONG, X.; SHI, W.; YUAN, G.; XI, L.; WANG, S.; LIN, P. Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporin A drug delivery system for experimental chronic uveitis. **Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 244, n. 4, p. 492 – 7, 2006.

DURRANI, O. M.; TEHRANI, N. N.; MARR, J. E.; MORADI, P.; STAVROU, P.; MURRAY, P. I. Degree, duration, and causes of visual loss in uveitis. **BR J Ophthalmol.**, v. 88, n. 9, p. 1159-62, 2004

ECKER, J, L.; DUMITRESCU, O, N.; WONG, K, Y. ALAM, N, M.; CHEN, S; LEGATES, T.; RENNA, J, M.; PRUSKY, G, T.; BERSON, D, M.; HATTAR, S. Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion-Cell Photoreceptors: Cellular Diversity and Role in Pattern Vision. **Neuron**. V.67, p.49 – 60, 2010.

FAUSER, S.; KALBACHER, H.; ALTEHELD, N.; KOIZUMI, K.; KROHNE, T. U.; JOUSSEN, A. M. Pharmacokinetics and safety of intravitreally delivered etanercept. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 242, p. 582-6, 2004.

FERNANDES, L. C.; OREFICE, F. Aspectos clínicos e epidemiológicos das uveítes em serviços de referência em Belo Horizonte, de 1970 a 1993. Parte I e II. **Revista Bras Oftal.**, v. 55, p. 9-32, 1996.

FIALHO, S. L.; REGO, M. B.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; HADDAD, A.; RODRIGUES, A. L.; HADDAD, A.; RODRIGUES, A. L.; MAIA-FILHO, A.; SILVA-CUNHA, A. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Current eye research**, v. 31, p. 525-34, 2006.

FIGUEROA, M. W.; SOARES, I. P.; ORÉFICE, F. Sinais e sintomas nas uveítes. In: ORÉFICE, F. **Uveíte: clínica e cirúrgica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Cultura Medica, 2005. V. 1, 2 ed., p. 31-44.

FISHER, S, K.; LEWIS, G, P. Photoreceptors and beyond: cellular and molecular effects of retinal detachment. **2nd Great Basin Visual Science Symposium**, II, University of Utah Press. 1995.

FORRESTER, J. V. Uveitis: pathogenesis. **Lancet**, v. 338, p. 1498-501, 1991.

FREEMAN, G.; MATOS, K.; PAVESIO, C. E. Cystoid macular oedema in uveitis: an unsolved problem. **Eye (Lond)**, v. 15, p. 12-7, 2001.

GAMLIN, P, D, R.; MCDUGAL, D, H.; POKORNY, J.; SMITH, V, C.; YAU, K.; DACEY, M, D. Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. **Vision Research** v.47, p. 946 – 954, 2007.

GAO, H.; PENNESI, M. E.; OIAO, X.; IYER, M. N.; WU, S. M.; HOLZ, E. R.; MIELER, W. F. Intravitreal moxifloxacin: retinal safety study with electroretinography and histopathology in animal models. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, p. 1606-11, 2006.

GASPARIN, Fábio. **Estudo farmacológico, eletrofisiológico e morfológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico em coelhos**. 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Oftalmologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GASPARIN, F.; AGUIAR, R. G.; IOSHIMOTO, G. L.; CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; LIBER, A. M.; NAGY, B. V.; OIWA, N. N.; COSTA, M. F.; JOSELEVITCH, C.; VENTURA, D. F.; DAMICO, F. M. Pharmacokinetics, electrophysiological and morphological effects of the intravitreal injection of mycophenolic acid in rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 00, n. 00, p. 1-10, 2014.

GÉHL, Z.; KULCSÁR K.; KISS, H, J, M.; NÉMETH, J.; MANESCHG, O, A.; RESCH, M, D. Retinal and choroidal thickness measurements using spectral domain optical coherence tomography in anterior and intermediate uveitis. **BMC Ophthalmology**. V.14, n.103, 2014.

GAUDREAU, J.; FEI, D.; BEYER, J. C.; RYAN, A.; RANGELL, L.; SHIU, V.; DALMICO, L. A. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. **Retina**, v. 27, n. 9, p. 1260-6, 2007.

GERY, I.; EGWUAGU, C, E. Central tolerance mechanisms in control of susceptibility to autoimmune uveitic disease. **Int Rev Immunol**. V. 21, n.(2-3), p. 89-100, 2002.

GIANSANTI, F.; RAMAZZOTTI, M.; VANNOZZI, L.; RAPIZZI, E.; FIORE, T.; IACCHERI, B.; DEGL', I. D.; MENCHINI, U. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 49, n. 3, p. 1151-6, 2008.

GOMI, C. F.; MAKDISSI, F. F.; OLIVALVES, E.; YAMAMOTO, J. H. Estudo epidemiológico das uveítes. **Rev Med (São Paulo)**, v. 76, p. 101-8, 1997.

GOUTELLE, S.; MAURIN, M.; ROUGIER, F.; BARBAUT, X.; BOURGUIGNON, L.; DUCHER, M.; MAIRE, P. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 633-48, 2008.

GOUVEIA, E. B.; ABDALLA, M.; YAMAMOTO, J. H.; HIRATA, C. E.; KUBO, P.; OLIVALVES, E. Causas das uveítes em serviço terciário em São Paulo, Brasil. **Arq Bras Oftalmol**, v. 67, p. 139-45, 2004.

GOLDBLUM, R. Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil. **Clin Exp Rheumatol**, v. 11, n. 8, p. 117-9, 1993.

GOLDBLUM, R.; FAUSCH, K.; FRUEH, B. E.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W.; ZIMMERLI, S. Ocular penetration of caspofungin in a rabbit uveitis model. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 245, n. 6, p. 825-33, 2007

GRAGOUDAS, E. S.; ADAMIS, A. P.; CUNNINGHAM, E. T. JR.; FEINSOD, M.; GUYER, D. R. VEGF Inhibition study in ocular neovascularization clinical trial group. pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**, v. 351, p. 2805-16, 2004.

GRAILER, A.; NICHOLS, J.; HULLET, D.; SOLLINGER, H. W.; BURLINGHAM, W. J. Inhibition of human B cell responses in vitro by RS-61443, cyclosporine A and DAB486 IL-2. **Transplant Proc**, v. 23, n. 1 Pt 1, p. 314-5, 1991.

GUERIN, C. J.; ANDERSON, D. H.; FISHER, S. K. Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.** V.31, p.1474 - 1482, 1990.

HAUCK, S. M.; SCHOEFFMANN, S.; AMANN, B.; STANGASSINGER, M.; GERHARDS, H.; UEFFING, M.; DEEG, C. A. Retinal mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. **J. Proteome Res.**, v. 6, n. 6, p. 2121-31, 2007.

HEILWEIL, G.; KOMAROWSKA, I.; ZEMEL, E.; LOEWENSTEIN, A.; PERLMAN, I. Normal physiological and pathophysiological effects of trypan blue on the retinas of albino rabbits. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, p. 4187-94, 2010.

Ioshimoto, Gabriela Lourençon. **Estudo terapêutico do implante intravitreo de ácido micofenólico em uveíte autoimune experimental**. 2015. 95 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ITURRALDE, D.; SPAIDE, R. F.; MEYERLE, C. B.; KLANCNIK, J. M.; YANNUZZI, L. A.; FISHER, Y. L.; SORENSON, J.; SLAKTER, J. S.; FREUND, K. B.; COONEY, M.; FINE, H. F. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. **Retina**, v. 26, p. 279-84, 2006.

ISHIKAWA, T.; HOKAMA, H.; KATAGIRI, Y.; GOTO, H.; USUI, M. Effects of intravitreal injection of tacrolimus (FK506) in experimental uveitis. **Curr Eye Res**, v. 30, p. 93-101, 2005.

JABS, D. A.; ROSENBAUM, J. T.; FOSTER, C. S. Guidelines for the the use of immunossupresive drugs in patients with ocular inflammattory disorders: recomendations of an expert panel. **Am J Ophthalmol.**, v. 130, p. 492-513, 2000.

JABS, D. A.; NUSSENBLATT, R. B.; ROSENBAUM, J. T. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. **Am J Ophthalmol**, v. 140, p. 509-16, 2005.

KARA-JOSÉ, N.; CARVALHO, K. M.; PEREIRA, V. L.; VENTURINI, N. H.; GASPARETTO, M. E.; GUCHIKEN, M. T. Estudo retrospectivo dos primeiros 140 casos atendidos na clínica de visão sub-normal do Hospital das Clínicas da Unicamp. **Arq Bras Oftalmol**, v. 51, p. 65-9, 1988.

KEMPEN, J. H.; DANIEL, E.; DUNN, J. P.; FOSTER, C. S.; GANGAPUTRA, S.; HANISH, A.; HELZLSOUER, K. J.; JABS, D.A.; KACMAZ, R. O.; LEVY-CLARKE, G. A.; LIESEGANG, T. L.; NEWCOMB, C. W.; NUSSENBLATT, R. B.; PUJARI, S. S.; ROSENBAUM, J. T.; SUHLER, E. B.; THORNE, J. E. Overall and cancer related mortality among patients with ocular inflammation treated with immunosuppressive drugs: retrospective cohort study. **BMJ**, v. 339, p. b2480, 2009.

KILMARTIN, D. J.; FORRESTER, J. V.; DICK, A. D. Rescue therapy with mycophenolate mofetil in refractory uveitis. **Lancet**, v. 352, p. 35-6, 1998.

KHOSCHSORUR, G.; ERWA, W. Liquid chromatographic method for simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenol- and acylglucuronide metabolites in plasma. **Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 799, p. 355-60, 2004.

KIVILCIM, M.; PEYMAN, G. A.; KAZI, A. A.; DELLACROCE, J.; GHOBRIAL, R. N.; MONZANO, R. Intravitreal toxicity of high-dose etanercept. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics:the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 57-62, 2007.

KOGISO, M.; TANOUCHI, Y.; MIMURA, Y.; NAGASAWA, H.; HIMENO, K. Endotoxin-induced uveitis in mice. 1. Induction of uveitis and role of T lymphocytes. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 36, n. 3, p. 281-90, 1992.

KOMAROWSKA, I.; HEILWEIL, G.; ROSENFELD, P. J.; PERLMAN, I.; LOEWENSTEIN, A. Retinal toxicity of commercially available intravitreal ketorolac in albino rabbits. **Retina**, v. 29, p. 98-105, 2009.

KULKARNI, P. S. Steroidal and nonsteroidal drugs in endotoxin-induced uveitis. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 329-34, 1994.

KUO, H. K.; LAI, I. C.; FANG, P. C.; TENG, M. C. Ocular complications after a sub-tenon injection of triamcinolone acetonide for uveitis. **Chang Gung medical journal**, v. 28, p. 85-9, 2005.

KWAK, H. W.; D'AMICO, D. J. Evaluation of the retinal toxicity and pharmacokinetics of dexamethasone after intravitreal injection. **Arch Ophthalmol**, v. 110, p. 259-66, 1992.

LAKE, J. R.; SHORR, J. S.; STEFFEN, B. J.; CHU, A. H.; GORDON, R. D.; WIESNER, R. H. Differential effects of donor age in liver transplant recipients infected with hepatitis B, hepatitis C and without viral hepatitis. **Am J Transplant**, v. 5, p. 549-57, 2005.

LARDENOYE, C. W.; VAN KOOIJ, B.; ROTHOVA, A. Impact of macular edema on visual acuity in uveitis. **Ophthalmology**, v. 113, p. 1446-9, 2006.

LARKIN, G.; LIGHTMAN, S. Mycophenolate, mofetil. A useful immunosuppressive in inflammatory eye disease. **Ophthalmology**, v. 106, p. 370-4, 1999.

LAU, C. H.; COMER, M.; LIGHTMAN, S. Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in the control of severe intraocular inflammation. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 31, p. 487-91, 2003.

MANZANO, R. P.; PEYMAN, G. A.; KHAN, P.; KIVILCIM, M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). **Retina**, v. 26, p. 257-61, 2006.

MANZANO, R. P.; PEYMAN, G. A.; CARVOUNIS, P. E.; KIVILCIM, M.; KHAN, P.; CHEVEZ-BARRIOS, P.; *et al.* Ocular toxicity of intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie**, v. 246, p. 907-11, 2008.

MANZANO, R. P.; PEYMAN, G. A.; CARVOUNIS, P. E.; DAMICO, F. M.; AGUIAR, R. G.; IOSHIMOTO, G. L.; VENTURA, D. F.; CURSINO, S. T. Toxicity of high-dose intravitreal adalimumab (Humira) in the rabbit. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 27, n. 4. P. 327-31, 2011.

MARMOR, M. F.; ZRENNER, E. Standard for clinical electroretinography (1994 update). **Doc Ophthalmol.**, v. 89, p. 199-210, 1995.

MARMOR, M. F.; HOLDER, G. E.; SEELIGER, M. W.; YAMAMOTO, S. Standard for clinical electroretinography (2004 update). **Documenta Ophthalmologica**, v. 108, p. 107-114, 2004.

MARMOR, M. F.; FULTON, A. B.; HOLDER, G. E.; MIYAKE, Y.; BRIGELL, M.; BACH, M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Doc Ophthalmol.**, v. 118, p. 69-77, 2009.

MEIRA, D. M.; ROCHA, M. L. R.; ORÉFICE, F. Conceito e classificação das uveítes. In: ORÉFICE, F. **Uveíte: clínica e cirúrgica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Cultura Medica, 2005, v. 1, 2 ed., p. 17-20.

MOCHIZUKI, M.; NUSSENBLATT, R. B.; KUWABARA, T.; GERY, I. Effects of cyclosporine and other immunosuppressive drugs on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 26, p. 226-32, 1985.

MORRIS, R. E.; HOYT, E. G.; MURPHY, M. P.; EUGUI, E. M.; ALLISON, A. C. Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. **Transplant Proc**, v. 22, p. 1659-62, 1990.

NORONHA, I, L.; OLIVEIRA A, C.; ARAÚJO, M, R, T.; ABENSUR, H.; QUINTAES, P, S, L.; GENZINI, T.; PEROSA, M.; CAMPAGNARI, J, C.; MARCONDES, M.; ROMÃO JR, J, E. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos **J. Bras. Nefrol.** v. 19, n.4, p. 39 - 406, 1997.

NUSSENBLATT, R. B.; RODRIGUES, M. M.; WACKER, W. B.; CEVARIO, S. J.; SALINAS-CARMONA, M. C.; GERY, I. Cyclosporin a. inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J Clin Invest.*, v. 67, n. 4, p. 1228-31, 1981.

NUSSENBLATT, R. B.; RODRIGUES, M. M.; SALINAS-CARMONA, M. C.; GERY, I.; CEVARIO, S. J.; WACKER, W. B. Modulation of experimental autoimmune uveitis with cyclosporin A. **Arch Ophthalmol.**, v. 100, n. 7, p. 1146-9, 1982.

NUSSENBLATT, R. B. Macular alterations secondary to intraocular inflammatory disease. **Ophthalmology**, v. 93, p. 984-8, 1986.

NUSSENBLATT, R. B. The natural history of uveitis. **Int Ophthalmol**, v. 14, p. 303-8, 1990.

NUSSENBLATT, R. B. **Fundamentals and Clinical Practice**. Philadelphia: Elsevier, 2004, 3 ed.

OHIA, E. O.; MANCINO, M.; KULKARNI, P. S. Effects of steroids and immunosuppressive drugs on endotoxin-uveitis in rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 295-307, 1992.

OLIVALVES, E.; GONÇALVES, R. M.; ORÉFICE, F. Corticosteróides. In: ORÉFICE, F. **Uveíte: clínica e cirúrgica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Cultura Medica, 2005. V.1, 2 ed., p. 331-8.

OSHIMA, Y.; SAKAGUCHI, H.; GOMI, F.; TANO, Y. Regression of iris neovascularization after intravitreal injection of bevacizumab in patients with proliferative diabetic retinopathy. **Am J Ophthalmol**, v. 142, p. 155-8, 2006.

PENHA, F. M.; RODRIGUES, E. B.; MAIA, M.; DIB, E.; FIOD C. E.; FURLANI, B. A.; NUNES MORAES FILHO, M.; DREYFUSS, J. L.; BOTTÓS, J.; FARAH, M. EM. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals-part I: animal models and toxicity assays. **Ophthalmic research**, v. 44, n. 2, p. 82-104, 2010.

PERLMAN, I. Testing retinal toxicity of drugs in animal models using electrophysiological and morphological techniques. **Doc Ophthalmol.**, v., 118, p. 3-28, 2009.

PERLMAN, I. The electroretinogram: ERG. In: *Webvision: the organization of the retina and visual system*. Lake City: University of Utah Health Sciences Center, 2013. Disponível em: <<http://webvision.med.utah.edu/>> Acesso em: 10 nov. 2013.

PEYMAN, G. A.; LAD, E. M.; MOSHFEGHI, D. M. Intravitreal injection of therapeutic agents. **Retina**, v. 29, p. 875-912, 2009.

POINTER, M. A.; CHENG, C. H.; BOWMAKER, J. K.; PARRY, J. W.; SOTO, N.; JEFFREY, G.; COWING, J. A.; HUNT, D. M. Adaptations to an extreme environment: retinal organization and spectral properties of photoreceptors in antarctic notothenioid fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2363-76, 2005.

PROVENCIO, I.; RODRIGUEZ, I. R.; JIANG, G.; HAYES, W. P.; MOREIRA, E. F.; ROLLAG, M. D. A Novel Human Opsin in the Inner Retina. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n.2, p. 600 – 605, 2000.

ROSENBAUM, J. T.; McDEVITT, H. O.; GUSS, R. B.; EGBERT, P. R. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. **Nature**, v. 286, p. 611-3, 1980.

ROSENBAUM, J. T.; BONEY, R. S. Activity of an interleukin 1 receptor antagonist in rabbit models of uveitis. **Arch Ophthalmol**, v. 110, n. 4, p. 547-9, 1992.

ROSENBAUM, J. T.; BONEY, R. S. Efficacy of antibodies to adhesion molecules, CD11a or CD18, in rabbit models of uveitis. **Current Eye Research**, v. 12, n. 9, p. 827-31, 1993.

ROSENZWEIG, H. L.; MARTIN, T. M.; JANN, M. M.; PLANCK, S. R.; DANVEY, M. P.; KOBAYASHI, K.; FLAVELL, R. A.; ROSENBAUM, J. T. NOD2, the gene responsible for familial granulomatous uveitis, in a mouse model of uveitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 4, p. 1518-24, 2008.

RUDOLF, H.; WITMER, M. D. Experimental leptospiral uveitis in rabbits. **AMA Arch Ophthalmol**, v. 53, n. 4, p. 547-59, 1955.

SCHWARZ, A. New aspects of the treatment of nephrotic syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 44-7, 2001.

SHAHAR, J.; AVERY, R. L.; HEILWEIL, G.; BARAK, A.; ZEMEL, E.; LEWIS, G. P.; JOHNSON, P. T.; FISHER, S. K.; PERLMAN, I.; LOEWENSTEIN, A. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). **Retina**, v. 26, n. 3, p. 262-9, 2006.

SOBRIN, L.; CHRISTEN W.; FOSTER, C. S. Mycophenolate mofetil after methotrexate failure or intolerance in the treatment of scleritis and uveitis. **Ophthalmology**, v. 115, p. 1416-21, 2008.

SOLLINGER, H. W. Renal transplant mycophenolate mofetil study group. mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. **Transplantation**, v. 60, p. 225-32, 1995.

STOCKTON, R. A.; SLAUGHTER, M. M. B-wave of the electroretinogram: a reflection of ON bipolar cell activity. **J. Gen. Physiol.** V. 93, p. 101 – 122, 1989.

SUTTROP-SCHULTEN, M. S.; ROTHOVA, A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. **Br J Ophthalmol**, v. 80, p. 844-8, 1996.

TAYLOR, S. R.; ISA, H.; JOSHI, L.; LIGHTMAN, S. New developments in corticosteroid therapy for uveitis. **Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde**, v. 224, n. S1, p. 46-53, 2010.

TENDRON, A.; GOUYON J, B.; DECRAMER, S. In utero exposure to immuno-suppressive drugs: Experimental and clinical studies. **Pediatr Nephrol** v. 17, p. 121 - 130, 2002.

THORNE, J. E.; JABS, D. A.; QAZI, F. A.; NGUYEN, Q. D.; KEMPEN, J. H.; DUNN, J. P. Mycophenolate mofetil therapy for inflammatory eye disease. **Ophthalmology**, v. 112, p. 1472-7, 2005.

VOS, A. F.; VAN HAREN, M. A.; VERHAGEN, C.; HOEKZEMA, R.; KIILSTRA, A. Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis in the rat. invest. **Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 35, n. 3, p. 1100-6, 1994.

VOS, A. F.; KLAREN, V. N.; KIILSTRA, A. Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 35, n. 11, p. 3873-83, 1994.

WARRENS, A. N. The evolving role of mycophenolate mofetil in renal transplantation. **QJM**, v. 93, p. 15-20, 2000.

WATSON, D. G.; ARAYA, F. G.; GALLOWAY, P. J.; BEATTIE, T. J. Development of a high pressure liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in small volumes of plasma from paediatric patients. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, p. 87-92, 2004.

WEN, R.; SONG, Y.; CHENG, T.; MATHEUS, M, T.; YASUMURA, D.; LAVAIL, M, M.; STEINBERG, R, H. Injury-Induced Upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the Rat Retina. **The Journal of Neuroscience**. V.15, n.11, p. 7377 – 7385, 1995.

WEYMOUTH, A, E.; VINGRYS, A, J. Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. **Prog Retin Eye Res**. V. 27, p. 1 - 44, 2008.

WHITCUP, S. M.; NUSSENBLATT, R. B. Treatment of autoimmune uveitis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 696, p. 307-18, 1993.

WIESNER, R.; RABKIN, J.; KLINTMALM, G.; MCDIARMID, S.; LANGNAS, A.; PUNCH, J.; MCMASTER, P.; KALAYOGLU, M.; LEVY, G.; FREEMAN, R.; BISMUTH, H.; NEUHAUS, P.; MAMELOK, R.; WANG, W. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients. **Liver Transpl**, v. 7, p. 442-50, 2001.

WIESNER, R. H.; STEFFEN, B. J.; DAVID, K. M.; CHU, A. H.; GORDON, R. D.; LAKE, J. R. Mycophenolate mofetil use is associated with decreased risk of late acute rejection in adult liver transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 6, p. 1609-16, 2006.

XIAO, J.; WU, S.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, S. Inhibitory effects of tetrandrine on bovine serum albumin-induced uveitis in rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 9; n. 2, p. 151-6, 1993.

YINGBIN, F.; HAINING, Z.; MIN-HUA, H, W.; DONG-GEN, L.; HSI-WEN, L.; HIDETAKA, M.; SAMER, H, L.; FRISHMAN, J.; KING-WAI, Y. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. **PNAS**. V. 102 n. 29, p. 10339 - 10344, 2005.

YU, S. Y.; DAMICO, F. M.; VIOLA, F.; D'AMICO, D. J.; YOUNG, L. H. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide: a morphological study. **Retina**, v. 26, p.531-6, 2006.

ZHANG, W.; BABAK BABAN, B, ROJAS, M.; TOFIGH, S.; VIRMANI, S, K. PATEL, C.; BEHZADIAN, M, A.; ROMERO, M, J.; CALDWELL, R, W.; CALDWELL, R. B. Arginase Activity Mediates Retinal Inflammation in Endotoxin-Induced Uveitis **The American Journal of Pathology**. V.175, n. 2, 2009.

ZEMEL, E.; LOEWENSTEIN, A.; LEI, B.; LAZAR, M.; PERLMAN, I. Ocular pigmentation protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 36, p. 1875-84, 1995.

ZHOU, Y.; ROSENTHAL, D.; DUTZ, J.; HO, V. Mycophenolate motetil (CellCept®) for psoriasis: a two-center, prospective, open-label clinical trial. **J Cutan Med Surg**, v. 7, p. 193-7, 2003.

# **Anexo**

**Anexo A** - Aceite do comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

---

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **029** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Dora Selma Fix Ventura** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudo farmacológico, morfológico e eletrofisiológico dos efeitos da injeção intravítrea de ácido micofenólico em coelhos**" do qual participou(aram) o **Pesquisador Francisco Max Damico**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA  
Secretária - Suplente  
CEEA - ICB/USP